SUT3-304-54-12-28

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาต้นแบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง

A study on the prototype of ethanol production from cassava pulp

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-54-12-28

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาต้นแบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง

A study on the prototype of ethanol production from cassava pulp

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายฐปณวัชร์ หมื่นแจ้ง และนางสาวภัทรพร พลชนะ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ. ดร. โชคชัย วนภู

บทคัดย่อ

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทนร้อน

การผลิตแอลกอฮอล์ / กระบวนการหมัก / กากมันสำปะหลัง

ในปัจจุบัน เอทานอลเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งโดยหลักจะใช้เป็นแหล่งของพลังงานทดแทนน้ำมันที่มาจากฟอสซิล อย่างไรก็ดีปัญหาอุปสรรคของการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮออล์ในส่วนของการผลิตเอทานอล คือ ปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบ และราคาวัตถุดิบขยับตัวสูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็น มันสำปะหลัง และกากน้ำตาล จึงทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลสูงจนโรงงานไม่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ การศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นไปที่การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นกากของเหลือจากกระบวนการการผลิตแป้งมัน และมีราคาถูก แต่การนำกากมันสำปะหลังไปใช้เพื่อการผลิตเอทานอลยังมีประสิทธิภาพต่ำ ทำให้วัตถุประสงค์ของการศึกษามุ่งเน้นไปที่การพัฒนากระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง ให้กลายเป็นน้ำตาล เพื่อที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยจากการศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมเพื่อการผลิตน้ำตาลสำหรับการหมักเอทานอล พบว่า ความเข้มข้นของกากมันที่ให้ปริมาณน้ำตาลที่สูงสุด อยู่ที่ 16% w/v โดยการย่อยของเอนไซม์ Termamyl ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ Amyloglucosidase ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดอยู่ที่ 90.77 g/l และให้ค่า yield ของน้ำตาลต่อกากมันเริ่มต้นอยู่ที่ 56% จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาหาชนิดและสูตรผสมของเอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยและลดขั้นตอนของกระบวนการย่อย โดยใช้เอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase พบว่าสูตรของเอนไซม์ที่ให้ปริมาณของน้ำตาลสูงสุดคือ Cellulase : Pullulanase : Amyloglucosidase ที่อัตราส่วน 0.1 : 1 : 1 โดยทำการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่งโมง ซึ่งจะให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดอยู่ที่ 99.76 g/l และให้ค่า yield ของน้ำตาลต่อกากมันเริ่มต้นอยู่ที่ 62.36% นอกจากนี้ เพื่อประสิทธิภาพของการย่อย จึงได้นำสารช่วยทำละลายซึ่งประกอบด้วยสารในกลุ่ม polyethylene glycol (PEG) ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ และสาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) มาทำการศึกษาพบว่า PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 15% w/v มีประสิทธิภาพของการย่อยด้วยเอนไซม์สูตรผสมสูงที่สุด คือ ให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดอยู่ที่ 130.6 g/l และให้ค่า yield ของน้ำตาลต่อกากมันเริ่มต้นอยู่ที่ 81.62% จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ย่อยได้จากกากมัน โดยนำของเหลวที่ได้จากการย่อยมาเติม

สารอาหาร YM ที่มีองค์ประกอบของ yeast extract (0.3%), malt extract (0.3%) และ peptone (0.5%) และทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* L3109 พบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 เจริญอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ ช่วง stationary หลังจากชั่วโมงที่ 12 ส่วนการผลิตเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 6.55 % v/v

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ……ก
บทคัดย่อ……ข
สารบัญ……ง
สารบัญตาราง……ช
สารบัญภาพ……ฌ
บทที่1 บทนำ
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย……1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……4
1.3 สมมุติฐานของการทดลอง……4
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา……6
บทที่ 2 ทบทวนงานวิจัย……7
บทที่ 3 วิธีการทดลอง
3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง……13
3.2 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์
3.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมในการผลิต Reducing sugar โดยใช้เอนไซม์ Termamyl และAmyloglucosidase……14
3.2.2 การศึกษาผลของ Co-Enzyme และ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์……14
3.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติม Co-Enzyme($CaCl_2$) และไม่เติม Co-Enzyme ต่อประสิทธิภาพในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase……14
3.2.4 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม ในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase……15
3.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และ Amyloglucosidase……17
3.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูตรผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบขั้นตอนการเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ต่อการผลิต reducing sugar……17

3.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* L3109

3.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109……18

3.3.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109……..19

3.4 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย

3.4.1 การศึกษาผลของ Polyethylene glycol(PEG4000) และ Dimethyl sulfoxide(DMSO) ต่อการผลิต reducing sugar……...19

3.4.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG และ DMSO ในยีสต์สายพันธุ์ L3109……...19

3.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนจาก PEG และ DMSO ในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ L3109.19

3.4.4 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar…….20

3.4.5 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)……20

3.4.6 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)……21

3.5 การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอล จากยีสต์สายพันธุ์ L3109 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร…..21

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง…….22

4.2 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์

4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมในการผลิต Reducing sugar โดยใช้เอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……..……..23

4.2.2 การศึกษาผลของ $CaCl_2$ และ Acetate buffer pH 5.0 ต่อการทำงานของเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase……...24

4.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อประสิทธิภาพในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase……...25

4.2.4 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม ในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase…….29

4.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และ Amyloglucosidase…….....30

4.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูตรผสม ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบขั้นตอนการเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ต่อการผลิต reducing sugar……..31

4.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* L3109

4.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109……32

4.3.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109……..33
4.4 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย
4.4.1 การศึกษาผลของ Polyethylene glycol(PEG4000) และ Dimethyl sulfoxide(DMSO) ต่อการผลิต reducing sugar……...34
4.4.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG และ DMSO ในยีสต์สายพันธุ์ L3109……...35
4.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนจาก PEG และ DMSO ในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ L3109.39
4.4.4 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar…….43
4.4.5 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)……43
4.4.6 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)……45
4.4.7 การศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG……46
4.4.8 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์ L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar และปริมาณ reducing sugar ที่เหลือจากการผลิตเอทานอล จากชนิด และปริมาณของ PEG……..49
4.5 การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอล จากยีสต์สายพันธุ์ L3109 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร…..54
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง……...…55
เอกสารอ้างอิง……58
ภาคผนวก……60
ภาคผนวก ก การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์……60
ภาคผนวก ข การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้ง โดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย……65
ประวัติผู้แต่ง……73

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 วิธีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง……...13

2 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์ ในการย่อยกากมัน……..…..15

3 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์ ในการย่อยกากมัน……..…...…….16

4 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว และแบบสองขั้นตอน ในการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase……..…...18

5 องค์ประกอบทางเคมีในกากมันแห้ง (% น้ำหนักแห้ง)…….....22

ก1 ปริมาณ reducing sugar และ %Yield ที่ได้จากการย่อยกากมัน โดยเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……..……60

ก2 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อย 0.1% amylopectin โดยเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และ Amylase……..60

ก3 ปริมาณ reducing sugar และ %Yield ที่ได้จากการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการย่อยกากมันปริมาณ 16% โดยเอนไซม์ Xylanase Hemicellulase Cellulase Pullulanse และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……61

ก4 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……...62

ก5 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase……63

ข1 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……...65

ข2 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG400, PEG600, PEG2000 และ PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5% และ 15.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……66

ข3 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……...68

ข4 ปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……..70

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ 4%, 8%, 12%, 16%, 20% และ 24% โดยเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……..23

2 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อย 0.1% amylopectin โดยเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และ Amylase……..……24

3 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยไม่เติม 2mM $CaCl_2$ และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……..…26

4 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยเติม $CaCl_2$ และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase…26

5 การเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Xylanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……27

6 การเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Hemicellulase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……27

7 การเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……...28

8 การเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Pullulanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……28

9 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase……...29

10 specific activity ของเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส……30

11 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase……..…31

12 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่อุณหภูมิ 15- 35 องศาเซลเซียส……..…32

13 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่ค่า pH 2.5-5.0……..33

14 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……34

15 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……..35

16 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG400 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...…..……36

17 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG600 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...…..…36

18 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...……..37

19 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG4000 ที่ความเข้นข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...……..37

20 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG6000 ที่ความเข้นข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...……..38

21 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมDMSO ที่ความเข้นข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...……..38

22 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG400 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...39

23 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG600 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...40

24 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG2000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……40

25 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG4000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……41

26 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG6000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……41

27 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมDMSO เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%……...……...42

28 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG400, PEG600, PEG2000 และ PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5% และ 15.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……...……43

29 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……...……44

30 ปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม……...……...45

31 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%……...……..47

32 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%……...……..47

33 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%……...……..48

34 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%……...……..48

35 ปริมาณเอทานอล ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..50

36 ปริมาณเอทานอล ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..50

37 ปริมาณเอทานอล ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..51

38 ปริมาณเอทานอล ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..51

39 ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..52

40 ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..52

41 ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..53
42 ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%..53
43 การเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109, ปริมาณเอทานอล และน้ำตาล reducing ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 15%……...……..54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เมื่อวันที่ 2 กันยายน 2546 คณะรัฐมนตรีได้รับทราบและเห็นชอบ “ยุทธศาสตร์พลังงานเพื่อการแข่งขัน” ตามที่กระทรวงพลังงานได้เสนอยุทธศาสตร์การพัฒนาพลังงานทดแทน โดยกำหนดเป้าหมายในช่วง 8 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2546-2554 จะต้องมีการใช้พลังงานทดแทนเพิ่มขึ้นจาก 0.5 % ของการใช้พลังงานทั้งหมดในปัจจุบัน เป็น 8% ใน 8 ปีข้างหน้า

ซึ่งกระทรวงพลังงาน ได้จัดทำแผนดำเนินการหรือ Road Map ในการส่งเสริมให้มีการใช้พลังงานทดแทนอย่างชัดเจน เช่น มาตรการการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ การเปิดเสรีโรงงาน ผลิตเอทานอล การปรับโครงสร้างราคาเอทานอลและราคาไบโอดีเซล การส่งเสริมการผลิตไฟฟ้าจากพลังงานหมุนเวียนสำหรับผู้ผลิตไฟฟ้ารายเล็ก (SPP) จากชีวมวล ก๊าซชีวภาพ พลังน้ำขนาดเล็ก และขยะชุมชน

ประเทศไทยมีการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ตั้งแต่ปี 2544 จนถึงปัจจุบัน ปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (รวมแก๊สโซฮอล์ E10 ออกเทน 91, แก๊สโซฮอล์ E10 ออกเทน 95, แก๊สโซฮอล์ E20 ออกเทน 95 และแก๊สโซฮอล์ E85) เพิ่มขึ้นเป็น 11.5 ล้านลิตร/วัน (ข้อมูลจากกรมพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน 2554) โดยที่แนวโน้มการผลิตเอทานอล สำหรับใช้ผลิตแกสโซฮออล์ มีแนวโน้มสูงขึ้นทั้งนี้เนื่องจากส่วนต่างระหว่างราคาน้ำมันเบนซินและน้ำมันแก๊สโซฮอล์ได้เพิ่มสูงขึ้นมาก ทำให้ประชาชนหันไปนิยมใช้น้ำมัน E10 เนื่องจากเป็นของดีราคาถูก อีกทั้งรัฐบาลได้ปรับลดอัตราภาษีสรรพสามิตสำหรับรถยนต์ E20 ขึ้นไปลง 5 % เมื่อวันที่ 9 พฤศจิกายน 2550 และมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2551 และ ล่าสุดเพื่อสนับสนุนการใช้น้ำมันที่มีส่วนผสมของเอทานอลเพิ่มมากขึ้นไปอีก คณะรัฐมนตรีได้มีมติเมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2551 เห็นชอบมาตรการภาษีเพื่อสนับสนุนการใช้น้ำมัน E85 เป็นการเพิ่มเติม คือ 1) ยกเว้นอากรขาเข้าชิ้นส่วนสำหรับรถยนต์ E85 ที่มีลักษณะเฉพาะและเป็นอุปกรณ์หลักเพื่อปรับเปลี่ยนมาใช้น้ำมัน E85 และยังไม่มีผลิตในประเทศ เป็นการชั่วคราว 3 ปี และ 2) ลดอัตราภาษีสรรพสามิตน้ำมัน E85 จากเดิม 3.6850 บาท/ลิตร เหลือ 2.5795 บาท/ลิตร

อย่างไรก็ดีปัญหาอุปสรรคของการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮออล์ ในส่วนของการผลิตเอทานอล คือ ปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบ และราคาวัตถุดิบขยับตัวสูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล ซึ่งแนวทางการแก้ไขจำเป็นที่จะต้องมีการส่งเสริมการปลูกมันสำปะหลัง อ้อย หรือ ส่งเสริมการปลูกพืชพลังงาน

อื่นๆที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล เช่น ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น จากการวิเคราะห์สถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแก๊สโซฮอลล์ ได้แก่กากน้ำตาล อ้อย และมันสำปะหลัง อ้อยและกากน้ำตาลมีความสัมพันธ์กันในด้านปริมาณ ปัจจุบันอ้อยมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 6 ล้านไร่ มีปริมาณอ้อยประมาณ 60 ล้านตัน/ปี ซึ่งยังไม่เพียงพอกับการความต้องการของโรงงานน้ำตาล ทั้งนี้ปริมาณกากน้ำตาลมีสัดส่วนประมาณร้อยละ 5 ของอ้อยสด (หรือประมาณ 3 ล้านตัน/ปี) ขณะที่ความต้องการกากน้ำตาลในประเทศแต่ละปีมีประมาณ 1.5 ล้านตัน ที่เหลืออีกประมาณ 1.5 ล้านตันใช้สำหรับส่งออก ซึ่งถ้าไม่มีการส่งออกกากน้ำตาลจะสามารถนำกากน้ำตาลนั้นมาผลิตเอทานอลได้ประมาณ 0.8 ล้านลิตร/วัน แต่ราคากากน้ำตาล ณ ปัจจุบันมีราคาสูง ประมาณ 4,800-5,200 บาท/ตัน ทำให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลสูงจนโรงงานไม่สามารถนำมาผลิตเอทานอลได้

อย่างไรก็ดี จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่าโรงงานผลิตเอทานอลที่ใช้วัตถุดิบ เช่น บ.ไทยง้วนแอลกอฮอล์ หรือ บ.อินเตอร์เนชั่นแนลแก๊สโซฮอล์ คอร์เปอร์เรชั่น ยังทำการผลิตได้ไม่เต็มที่ ทั้งนี้อาจมาจากสาเหตุหลายประการ แต่ที่เห็นได้ชัดคือ ปัญหาในการจัดหาวัตถุดิบ กล่าวคือที่กำลังการผลิตเอทานอล 100,000 ลิตรต่อวัน จะมีความต้องการหัวมันสดประมาณ 600 ตันต่อวัน ซึ่งมีค่าค่อนข้างมากในแต่ละวัน และคิดเป็นความต้องการประมาณ 75% ของความต้องการหัวมันสดของโรงงานแป้งมันสำปะหลังขนาดใหญ่ (200 ตันแป้งต่อวัน หรือเทียบเท่า 800 ตันหัวมันสดต่อวัน) การจัดหาวัตถุดิบในปริมาณมากจากพื้นที่ใกล้เคียงโรงงานแป้งมันสำปะหลังอาจเป็นปัญหา ทำให้ต้องรวบรวมมาจากแหล่งอื่นๆ ที่ไกลออกไป ดังนั้นการสร้างโรงงานเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ จำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยด้านวัตถุดิบเป็นสำคัญ วัตถุดิบที่น่าจะจัดการได้ง่ายกว่าในกรณีโรงงานเอทานอลจากมันสำปะหลัง จึงน่าจะเป็นมันเส้นที่สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าหัวมันสด

สำหรับมันสำปะหลังพบว่า มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 7.41 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 3.09 ตัน/ไร่ ประมาณการได้ว่าผลผลิตของประเทศในปี 2554 จะมีประมาณ 21.91 ล้านตัน (หัวมันสด) ซึ่งปริมาณความต้องการใช้มันสำปะหลังมีเพียง 16 ล้านตันในการผลิตแป้ง มันเส้น มันอัดเม็ด ที่เหลือ 5 ล้านตันสามารถนำมาผลิตเอทานอลสำหรับใช้ผลิตแก๊ซโซฮออล์เพื่อใช้ในประเทศ นอกจากนี้พบว่า มันสำปะหลังยังมีศักยภาพในการเพิ่มผลิตให้ได้มากกว่า 3 ตัน/ไร่ (จนถึง 30 ตัน/ไร่) ทำให้มีมันสำปะหลัง มาเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลมากพอโดยไม่ต้องเพิ่มพื้นที่ปลูก และไม่มีผลกระทบต่อการบริโภคในประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร,2555)

การผลิตมันเส้นของประเทศไทย โดยทั่วไปเกษตรกรจะเป็นผู้ผลิตเองโดยจะตั้งโรงงานใกล้กับพื้นที่ที่ปลูกมันสำปะหลัง เครื่องมือในโรงงานจะประกอบไปด้วย เครื่องสับ รถตัก และ ทำการตากแห้งโดยใช้ลานตาก ซึ่งมักจะมีขนาดตั้งแต่ 5-10 ไร่ จนถึงเป็น 100 ไร่ หัวมันสดจะถูกลำเลียงเข้าเครื่องสับ เมื่อได้มันเส้นสดก็จะถูกนำไปลดความชื้นโดยการตากในลานคอนกรีต มันเส้นซึ่งตากในอยู่ในลานจะถูกกลับโดยใช้คราดซึ่งติดตั้งกับรถ

แทรกเตอร์ เมื่อมันเส้นแห้ง (ความชื้นประมาณ 14-15%) ก็จะถูกรวมเป็นกองโดยใช้แทรกเตอร์ ซึ่งความต้องการของมันเส้นภายในประเทศได้สูงขึ้นอย่างมากเนื่องจากนโยบายการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิง ในประเทศและต่างประเทศ ประกอบกับความต้องการมันเส้นไปใช้ทดแทนข้าวโพดเพื่อผลิตอาหารสัตว์ นี่ทำให้ความต้องการมันเส้นเพิ่มขึ้นจาก 1.96 ล้านตัน ในปี 2546 เป็น 2.56 ล้านตัน ในปี 2547 (ปริมาณหัวมันสดที่ใช้ประมาณ 6.25 ล้านตัน) และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

นอกจากมาตรการส่งเสริมการผลิตเอทานอลเพื่อใช้ในแล้ว การผลิตแก๊สชีวภาพยังเป็นอีกเป้าหมายหนึ่งในแผนการส่งเสริมให้มีการใช้พลังงานทดแทนในประเทศ ข้อมูลศักยภาพการผลิตแก๊สชีวภาพทั้งประเทศประมาณ 67,677.49 ล้านลูกบาศก์เมตร/ปี โดยที่ร้อยละ 99.5 ของปริมาณแก๊สชีวภาพที่ผลิตได้มาจากอุตสาหกรรมการเกษตร (มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม, 2550) อันเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีแหล่งวัตถุดิบมากมายไม่ว่าจะเป็น มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน น้ำตาล และฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โดยกระบวนการแปรรูปเหล่านี้จะให้น้ำเสียจำนวนมากและมีกลิ่นเหม็น ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไร้ออกซิเจนจึงเป็นมีทางเลือกหนึ่งและยังให้ผลผลิตที่เป็นก๊าซชีวภาพกลับมาใช้ในกระบวนการผลิตได้อีก อย่างไรก็ตาม ศักยภาพในการผลิตก๊าซชีวภาพนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะสมบัติและปริมาณของน้ำเสีย ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันจะผลิตน้ำเสียปริมาณ 4-6 m^3 ต่อหัวมันสด 1 ตัน ซึ่งสามารถนำไปผลิตไบโอแก๊สได้ 40-50 m^3 พลังงานเทียบเท่ากับ 25 ลิตรของน้ำมันดิบ ปัจจุบันทั่วประเทศมีโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมัน 77 โรงงานซึ่งสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้ 234.80 ล้านลูกบาศก์เมตร/ปี

อย่างไรก็ดีกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ยังมีผลผลอยได้ (By-product) ในรูปของแข็งเกิดขึ้น ซึ่งก็คือ เปลือกมันและกากมัน โดยหัวมันสดหนึ่งตันจะให้ปริมาณ เปลือกมัน และกากมัน ประมาณ 30 กิโลกรัม และ 60 กิโลกรัม ตามสำคัญ ในปัจจุบันเปลือกมันนี้จะถูกนำไปปลูกเห็ดและทำเป็นอาหารสัตว์ ส่วนกากมันซึ่งมีส่วนประกอบ (น้ำหนักแห้ง) ได้แก่ แป้ง เส้นใย โปรตีน ไขมัน และ เถ้า ในอัตราส่วน 56%, 35.9%, 5.3%, 0.1% และ 2.7% ตามลำดับ กากมันที่ออกมาจากโรงงานจะมีความชื้นสูง หรือ ประมาณ 60-70% และเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จึงนำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก เนื่องจากมีข้อเสียก็คือ มีกลิ่นเหม็นซึ่งรบกวนกับชุมชนที่อยู่รอบข้าง ในปัจจุบันได้มีการใช้เอนไซม์สองชนิด คือ pectinase และ cellulose ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแป้ง ทำให้ได้กากแป้งที่มีปริมาณแป้งน้อยลงและยังทำให้ง่ายต่อการอบแห้ง และ ง่ายต่อการใช้งาน โรงงานบางแห่งจะขายกากมันนี้เพื่อนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ ราคาเมื่ออบแห้งแล้วจะสูงกว่าเมื่อตอนเปียก ปัจจุบันกากมันจะลดความชื้นโดยการตากบนพื้นคอนกรีตขนาดใหญ่ในช่วง 8 เดือนที่ไม่มีฝนตก แต่ในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน ซึ่งส่วนใหญ่ฝนจะตกหนักก็จะทำให้ตากไม่ได้ กากมันบางส่วนก็ถูกนำไปใช้ในการผลิตเห็ด

ดังกล่าว การพิจารณานำผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง คือ กากมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล และผลิตแก๊สชีวภาพ โดยศึกษาให้ครอบคลุมตั้งแต่การแปรรูปกากมันสำปะหลัง (การลดความชื้น การสกัดแป้ง) จนถึงขั้นตอนการผลิตพลังงานในระดับต้นแบบ จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุดของ

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลสด้วย เอนไซม์สูตรผสม ระหว่าง Cellulase, Pullulanase และ Amyloglucosidase ร่วมกับการทำงานของ ยีสต์ *S.cerevisiae*
2. เพื่อศึกษาและพัฒนาต้นแบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยเทคนิคการย่อยด้วยเอนไซม์สูตรผสม ระหว่าง Cellulase, Pullulanase และ Amyloglucosidase ร่วมกับการทำงานของยีสต์ *S.cerevisiae*
3. เพื่อพัฒนาต้นแบบระบบการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังสำหรับผลิตพลังงานทดแทน ขนาด 5 ลิตร

3. ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงาน

ประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในภาคขนส่งเกือบทั้งหมด ทำให้สูญเสียเงินตราไปต่างประเทศเป็นจำนวนมากกว่าปีละ 2 แสนล้านบาท ซึ่งมีมูลค่ามากกว่ารายได้จากการส่งออกข้าว มันสำปะหลัง ยางพารา น้ำมันปาล์ม และน้ำตาลทรายรวมกัน ประกอบกับแนวโน้มราคาน้ำมันเชื้อเพลิงมีแต่จะสูงขึ้น โดยที่ประเทศไทยแทบไม่มีอำนาจต่อรองใดๆ เลย เพราะเราเป็นตลาดนำเข้าน้ำมันส่วนย่อยไม่ถึงร้อยละ 1 ของตลาดโลก วิกฤติการณ์ด้านพลังงานโดยเฉพาะราคาน้ำมันในตลาดโลก ได้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด สาเหตุหลักๆ มาจากการเกิดความขัดแย้งของประเทศต่าง ๆ ในภาคตะวันออกกลางซึ่งเป็นแหล่งน้ำมันสำคัญของโลก สิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อประเทศไทย เป็นอุปสรรคของรัฐบาลในการแก้ปัญหาเศรษฐกิจ

การใช้น้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีปริมาณจำกัด อาจจะหมดไปในเร็ววันนี้ ทำให้ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกต้องเสาะแสวงหาแหล่งเชื้อเพลิงและพลังงานจากทรัพยากรภายในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้า เช่น การใช้ถ่านหิน พลังงานนิวเคลียร์ ก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเรามีแหล่งพลังงานดังกล่าวในปริมาณที่

ค่อนข้างจำกัด และในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม เช่น การผลิตไฟฟ้าในปัจจุบันต้องใช้ก๊าซธรรมชาติถึงร้อยละ 70 ทำให้ขาดเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ อย่างไรก็ตาม ไทยเรายังมีแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตได้เอง คือ พลังงานทดแทนจากพืชเกษตร ประกอบกับปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะพืชผลที่ต้องพึ่งพาตลาดต่างประเทศ เช่น ***ข้าว*** ซึ่งสามารถผลิตได้ประมาณ 27 ล้านตันต่อปี จากที่นา 78 ล้านไร่ ***มันสำปะหลัง***มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ซึ่งส่วนใหญ่จะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตะวันออก โดยมีจังหวัดนครราชสีมาปลูกมากเป็นอันดับหนึ่ง ทั้งประเทศจะสามารถผลิตหัวสดได้ประมาณ 19 ล้านตันต่อปี ราคาขายอยู่ในระดับ 0.80-1.20 บาทต่อกิโลกรัมตามเปอร์เซ็นต์แป้ง ***อ้อย*** ก็มีสภาพไม่ต่างกัน ปีนี้จะมีผลผลิตออกมากกว่า 50 ล้านตัน จากพื้นที่ปลูกประมาณ 6 ล้านไร่ ชาวไร่อ้อยกำลังรอการประกันราคาจากรัฐบาลแทนระบบการแบ่งปันผลประโยชน์เดิมที่ใช้อยู่

พืชสามชนิดที่กล่าวมานั้น ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกสู่ตลาดโลกในอันดับต้นๆ แต่ปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำยังคงอยู่ต่อไป คำตอบที่จะสามารถช่วยแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนั่นคือ การใช้เชื้อเพลิงเอทานอล ซึ่งได้จากการนำเอาพืชผลทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล ข้าว ข้าวโพด มาแปรรูปด้วยการย่อยสลาย การหมัก และการกลั่น แล้วนำเอาเอทานอลที่ได้มาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียม หากนำไปผสมกับเบนซินเรียกว่า ก๊าซโซฮอล์ หากนำมาผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (Desohol) หรือใช้โดยตรง (Neat Ethanol) ซึ่งมีตัวอย่างในต่างประเทศ ทั้งในประเทศ บราซิล สหรัฐอเมริกา และประเทศกลุ่มประชาคมยุโรป การใช้เชื้อเพลิงเอทานอลส่งผลให้ลดมลภาวะทางอากาศ โดยเฉพาะคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่เผาไหม้ไม่หมดซึ่งออกมาจากท่อไอเสียรถยนต์ และยังช่วยลดจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศที่มีผลกระทบโดยตรงต่อสภาวะเรือนกระจก (Green House Effect)

แนวความคิดเรื่องนี้ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงได้ทดลองทั้งการผลิตและใช้งานในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และได้มีการทดลองโดยการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย จนได้ผลดีมาแล้ว ต่อมาเมื่อวันที่ 19 กันยายน 2543 คณะรัฐมนตรีได้มีมติเห็นชอบในหลักการ โครงการผลิตแอลกอฮอล์จากพืชเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยให้กระทรวงอุตสาหกรรมรับไปแต่งตั้งคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ ซึ่งกระทรวงอุตสาหกรรมได้มีคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ เมื่อวันที่ 16 ตุลาคม 2543 โดยมีปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม เป็นประธาน และผู้อำนวยการสำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม เป็นกรรมการและเลขานุการ คณะรัฐมนตรี ในการประชุมเมื่อวันที่ 26 ธันวาคม 2543 ได้มีมติเห็นชอบแนวทางการส่งเสริมและสนับสนุนการผลิตและการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ตามที่กระทรวงอุตสาหกรรมเสนอ ในการนี้รัฐจะ

สนับสนุนให้ภาคเอกชนลงทุนจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิง และให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำหนดแผนการผลิตอ้อยและมันสำปะหลัง เพื่อรองรับและสอดคล้องกับการลงทุนผลิตเอทานอล

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายแป้งและเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์อะไมเลสร่วมกับการทำงานของยีสต์ *S.cerevisiae* เพื่อพัฒนาต้นแบบระบบผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

จากการศึกษาสถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตน้ำมันก๊าซโซฮอล์ ซึ่งดำเนินการโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประกอบกับแผนยุทธศาสตร์มันสำปะหลังและแผนพัฒนาการผลิตอ้อยปี 2545-2549 ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และในการประชุมคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ เมื่อวันที่ 18 เมษายน 2545 และการประชุมคณะรัฐมนตรีเมื่อ 14 พฤษภาคม 2545 ได้มีมติรับทราบตามข้อสรุปในด้านวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ดังนี้

1. พืชที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ มันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณส่วนเกินของตลาดประมาณ 4 ล้านตัน ต่อปี สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 2 ล้านลิตรต่อวัน
2. กากน้ำตาลสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เฉพาะส่วนที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งมีประมาณ 0.8 ล้านตัน ต่อปี ผลิตเอทานอลได้ประมาณ 600,000 ลิตร ต่อวัน
3. การใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลไม่เหมาะสม เพราะปริมาณการผลิตอ้อยยังไม่เพียงพอกับความต้องการของอุตสาหกรรมน้ำตาล

สำหรับ***กากน้ำตาล*** (molasses) เป็นผลิตภัณฑ์เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากพืชที่ให้ความหวาน เช่น อ้อย หัวบีทชนิดหวาน (sugarbeet) เป็นต้น ปริมาณการผลิตของกากน้ำตาลทั่วโลกประมาณ 125-130 ล้านตันต่อปี ประมาณ 2 ใน3 ได้มากจากอ้อยและที่เหลือประมาณ 25% ได้มาจากหัวบีทชนิดหวาน กากน้ำตาลจะนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับการหมักหลายชนิด ที่เหลือจะนำไปเป็นอาหารทั้งคนและสัตว์ กากน้ำตาลประมาณ 75% ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาและเอเชีย กากน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถตกผลึกได้ ของแข็งที่ไม่ใช่น้ำตาล และสารเคมีต่างๆ ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำ

โดยกากน้ำตาลจะได้จากกระบวนการมีปริมาณมากถึงกว่า 33% ของวัตถุตั้งต้น กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยจะมีน้ำตาลสูงถึง 48% เมื่อเทียบกับกากจากหัวบีทจะไม่มีน้ำตาลเลย จึงทำให้กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและราคาถูก สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอลได้โดยตรง ซึ่งต่างจากมันสำปะหลังที่ต้องผ่านกระบวนการ Saccharification เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็น

น้ำตาลก่อน นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีสารอาหารอื่นๆที่จำเป็นต่อการหมัก เช่น ไนโตรเจนอีกประมาณ 1% และแร่ธาตุๆอีกจำนวนมาก (http://www.suga-lik.com/molasses/ composition. html)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยมีศักยภาพในด้านวัตถุดิบอย่างเพียงพอที่สามารถผลิตเอทานอลได้เกือบ 3 ล้านลิตรต่อวัน โดยไม่มีการขยายพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งมากเกินความต้องการใช้เอทานอลในระยะแรกที่คาดว่าจะไม่เกิน 1 ล้านลิตรต่อวัน

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน (กรมทะเบียนการค้า) ได้รายงานไว้ว่า เอทานอลเป็นสาร Oxygenated ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ทดแทน Methyl Tertiary Buthyl (MTBE) ได้ ในปัจจุบันน้ำมันเบนซินออกเทน 95 มีสาร MTBE ผสมในปริมาณร้อยละ 5.5-11.0 โดยปริมาตร การนำเอาเอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินจะทำให้คุณสมบัติของน้ำมันเบนซินเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ ค่าความดันไอสูงขึ้นประมาณ 1 psi หรือ 6.9 Kpa เมื่อใช้เอทานอลร้อยละ 10 ค่าอุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ลดลง คุณสมบัติในการรวมตัวกับน้ำลดต่ำลงและจะทำให้การใช้น้ำมันเชื้อเพลิงสิ้นเปลืองมากขึ้น (1-2%) เนื่องจากมีค่า Heating Value ต่ำ

น้ำมันก๊าซโซฮอล์ คือ น้ำมันเบนซินผสมเอทานอล (ใช้ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ขึ้นไป) สำหรับประเทศไทย กรมทะเบียนการค้าได้กำหนดคุณภาพของน้ำมันก๊าซโซฮอล์ แยกออกจากน้ำมันเบนซิน มีค่าความดันไอไม่สูงกว่า 65 กิโลปาสคาล (Kpa) อุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ไม่ต่ำกว่า 65 และไม่สูงกว่า 110 องศาเซลเซียส และให้มีการผสมเอทานอลได้ในปริมาณร้อยละ 10-12 โดยปริมาตร ในปี 2544 ประเทศไทยมีการใช้เบนซินออกเทน 95 ในปริมาณ 3,000 ล้านลิตร ต้องนำเข้า MTBE ในปริมาณ 187.464 ล้านลิตร โดยมีราคาเฉลี่ยประมาณ 11.44 บาท ต่อลิตร ดังนั้น หากใช้เอทานอลทดแทน MTBE ได้ทั้งหมด สามารถประหยัดเงินได้ประมาณ 2,144 ล้านบาท แต่ต้องผลิตเอทานอลได้ไม่น้อยกว่าปีละ 300 ล้านลิตร จึงจะเพียงพอกับความต้องการ ในช่วงนั้นมีผู้ผลิตและจำหน่ายเอทานอลเพียงสองราย ได้แก่ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และโรงงานต้นแบบของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ส่วนผู้ค้าน้ำมันก๊าซโซฮอล์ ได้แก่ บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) และ บางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน) โดยมีปริมาณจำหน่ายเพียงเดือนละ 100,000 ลิตร เท่านั้น เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ยังไม่มากนัก สมาคมอุตสาหกรรมยานยนต์ไทย ในปี 2544 ได้สำรวจข้อมูลรถยนต์ต่าง ๆ ที่สามารถใช้ก๊าซโซฮอล์เป็นเชื้อเพลิงตามข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันเบนซินออกเทน 95 ประกาศเดิม (ก่อนประกาศฉบับ 21 ตุลาคม 2545) พบว่าเฉพาะรถยนต์รุ่นเก่าที่ใช้ระบบคาร์บูเรเตอร์ ไม่สามารถใช้ก๊าซโซฮอล์เป็นเชื้อเพลิงแทนเบนซินออกเทน 95 ได้

จากการประชุมของคณะรัฐมนตรีเมื่อวันที่ 30 กรกฎาคม 2545 ได้มีมติอนุมัติการขอตั้งโรงงานผลิตและจำหน่ายเอทานอลของผู้ประกอบการทั้ง 8 ราย ตามข้อเสนอของคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ ดังนี้

1. *บริษัท พรวิไล อินเตอร์เนชั่นแนล กรุ๊ป เทรดดิ้ง จำกัด* อำเภอท่าเรือ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ กำลังการผลิตไม่เกิน 25,000 ลิตรต่อวัน ใช้กากน้ำตาลหรือมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
2. *บริษัท ที.เอส.บี. เทรดดิ้ง จำกัด (บริษัท ไทยอะโกร เอ็นเนอร์ยี่ จำกัด)* อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ ผลิตเอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ของแอลกอฮอล์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ กำลังการผลิตไม่เกิน 150,000 ลิตรต่อวัน ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ
3. *บริษัท อินเตอร์เนชั่นแนล แก๊สโซฮอล์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด* เขตชุมชนอุตสาหกรรมนครินทร์-อินดัสเตรียลปาร์ค อำเภอบ้านค่าย จังหวัดระยองจัดตั้ง ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ใน กำลังการผลิตไม่เกิน 500,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
4. *บริษัท แสงโสม จำกัด* อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ติดตั้งหน่วยผลิตเพิ่มเติมในโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ที่มีอยู่เดิม เพื่อผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกิน 100,000 ลิตรต่อวัน และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ
5. *บริษัทไทยง้วน เอทานอล จำกัด* จังหวัดชัยภูมิ หรือขอนแก่น ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดกำลังการผลิตไม่เกิน 130,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
6. *บริษัท น้ำตาลขอนแก่น จำกัด* อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ขนาดกำลังการผลิตไม่เกิน 85,000 ลิตร ต่อวัน ใช้กากน้ำตาลหรือมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
7. *บริษัท อัลฟ่า เอ็นเนอร์จี จำกัด* อำเภอไพศาลี จังหวัดนครสวรรค์ ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกินวันละ 212,000 ลิตรต่อวัน ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ
8. *บริษัท ไทยเนชั่นแนล พาวเวอร์ จำกัด* นิคมอุตสาหกรรมสยาม อีทเทอร์น อินดัสเตรียลปาร์ค อำเภอปลวกแดง จังหวัดระยอง ผลิตเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตไม่เกิน 300,000 ลิตรต่อวัน และใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

ประธานกรรมการเอทานอลแห่งชาติ ได้มอบใบอนุญาตตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงให้แก่ผู้ได้รับอนุญาตทั้ง 8 รายแล้ว เมื่อวันที่ 14 สิงหาคม 2545 โดยผู้ได้รับอนุญาตทั้ง 8 ราย จะต้อง

ปฏิบัติตามเอกสารข้อเสนอโครงการ ซึ่งบริษัทได้ยื่นไว้ตามประกาศคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ ลงวันที่ 20 กรกฎาคม 2544

นอกจากผู้ประกอบการจำนวน 20 ราย ที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการจัดตั้งโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิง ซึ่งมีขนาดกำลังการผลิตรวมกันทั้งสิ้น 6 ล้านลิตร ต่อวัน สำหรับน้ำมันดีโซฮอล์ ซึ่งหมายถึง น้ำมันดีเซลผสมแอลกอฮอล์ ในการผสมน้ำมันดีโซฮอล์อาจจะใช้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 (Hydrated Ethanol) หรือสูงกว่าร้อยละ 99 (Anhydrous Ethanol) ผสมกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว แต่ต้องมีการผสมสารเติมแต่งประเภท Emulsifier เพื่อช่วยให้เอทานอลละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว การผสมเอทานอลในน้ำมันดีเซลหมุนเร็วทำให้คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันดีเซลหมุนเร็วเปลี่ยนไปบ้าง ที่สำคัญได้แก่ ค่าซีเทนนัมเบอร์ (Cetane Number) ลดลง และจุดวาบไฟของน้ำมันดีโซฮอล์มีค่าต่ำกว่าน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว ดังนั้น จึงต้องชดเชยค่าซีเทนนัมเบอร์โดยการเติมสารเติมแต่งประเภทเพิ่มซีเทน (Cetane Improver) ลงไปเพื่อเพิ่มค่าซีเทนนัมเบอร์และต้องเติมสารเติมแต่งป้องกันการกัดกร่อน (Corrosion Inhibitor) เพื่อป้องกันหัวฉีดเชื้อเพลิงกัดกร่อน สถาบันวิจัยและพัฒนา ปตท. ได้ทดสอบการใช้น้ำมันดีโซฮอล์กับรถโดยสาร ขสมก. พบว่าสามารถลดควันดำได้ประมาณร้อยละ 30-40 แต่สิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิงมากขึ้นประมาณร้อยละ 7-9 อนึ่งกรมธุรกิจพลังงาน (กรมทะเบียนการค้า) ยังไม่ได้ออกประกาศกำหนดคุณภาพของน้ำมันดีโซฮอล์ (ข้อมูล ณ วันที่ 25 ตุลาคม 2545)

ตามที่กล่าวมาแล้ว เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่ผลิตจากพืช เช่น มันสำปะหลัง อ้อย และกากน้ำตาล ในกระบวนการผลิต หากใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง และเซลลูโลส จะต้องนำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อน โดยการใช้กรด แบคทีเรีย หรือเอ็นไซม์ ส่วนวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลสามารถนำมาหมักกับเชื้อยีสต์ได้เลย ใช้เวลาในการหมักประมาณ 3-4 วัน (กรณีเป็นการหมักแบบชั่วคราว หากหมักแบบต่อเนื่องจะใช้เวลาน้อยกว่านี้) จะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปกลั่นแยกแบบลำดับส่วน จะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ในกรณีที่ต้องนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงผสมก๊าซโซฮอล์ และดีโซฮอล์ จะต้องแยกส่วนน้ำออกอีกประมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร โดยวิธีการกลั่นกับสารตัวที่สาม หรือแยกด้วยเครื่องโมเลกคูลาซีฟ (molecular sieve) หรือเครื่องแยกระบบเมมเบรน โรงงานต้นแบบผลิตแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบมันสำปะหลังของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มีขั้นตอนการผลิตเอทานอลไร้น้ำด้วยวิธีการกลั่นกับสารตัวที่สาม และมีกำลังการผลิตวันละ 1,500 ลิตร โดยใช้หัวมันสำปะหลังสด วันละประมาณ 10 ตัน ปริมาณมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล ในปี 2544 ประเทศไทยมีการใช้เบนซินออกเทน 95 ในปริมาณ 3,000 ล้านลิตร ต้องผลิตเอทานอลได้ไม่น้อยกว่าปีละ 300 ล้านลิตร (ร้อยละ 10) จึงจะเพียงพอกับความต้องการ มันสำปะหลังจำนวน 6 กิโลกรัม

สามารถผลิตเอทานอลได้ 1 ลิตร ดังนั้น ต้องใช้มันสำปะหลังหัวสดจำนวน 1.8 ล้านตัน เพื่อผลิตเอทานอลสำหรับเบนซินออกเทน 95 สืบเนื่องจากที่กรมการค้าต่างประเทศจัดสัมมนาเชิงปฏิบัติการ ยุทธศาสตร์มันสำปะหลังเพื่อการพัฒนาแบบยั่งยืน ณ โรงแรม รอยัล ออคิด เชอราตัน เมื่อวันที่ 6 พฤศจิกายน 2545 มีรายงานการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อการผลิตเอทานอล พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณแป้งในหัวสด พันธุ์ที่ให้ปริมาณแป้งในหัวสดสูง เมื่อหมักแล้วจะได้ปริมาณเอทานอลสูงด้วย และจากการทดลองร่วมกันระหว่างศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ พบว่า มันเส้นที่ได้จากมันสำปะหลังสายพันธุ์ 199 อายุเก็บเกี่ยว 18 เดือน เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอล

ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Yeast in Fermentation Process)

ทั้งมันสำปะหลังและกากน้ำตาลจะถูกใช้เป็นแหล่งให้พลังงานในรูปของน้ำตาลกับเซลล์ยีสต์ พืชที่ได้จากแต่ละแหล่งจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันตามคุณสมบัติของพื้นดินที่ใช้ปลูกพืช การเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิต และกระบวนการจัดเก็บกากน้ำตาลที่บางแห่งอาจมีการเติมสารเคมี ตลอดจนอายุการจัดเก็บรักษา หากกากน้ำตาลเก็บไว้นานหลายๆเดือนจะทำให้น้ำตาลรีดิวซิ่งลดน้อยลงได้ (http://www.praj.net/Worldethanolsynopsis.htm) อย่างไรก็ตาม กากน้ำตาลจากอ้อยขาดสารอาหารบางชนิด เช่นฟอสฟอรัส และก่อนการนำกากน้ำตาลไปหมักนั้น จำเป็นต้องเจือจางให้มีความหวานประมาณ 25°Brix หรือเจือจางด้วยน้ำมากกว่า 3 เท่า ยิ่งทำให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์น้อยลงไปมาก ซึ่งก็เช่นเดียวกับการใช้มันสำปะหลัง

Win และพวก (1996) ได้ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในถังหมักชนิด batchพบว่าการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากย่อยแป้งมันสำปะหลังจะได้เซลล์มากกว่าการเลี้ยงด้วยกากน้ำตาลถึง 20% และเมื่อหมักแบบ fed-batch พบว่าน้ำตาลกลูโคสยังได้ yield ของเซลล์สูงกว่าและวิธีนี้ก็ได้ yield สูงกว่าการเลี้ยงแบบ batch เช่นกัน อย่างไรก็ตามคณะของ Win ศึกษาเฉพาะการผลิตเซลล์ไม่ได้ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์ Shimoda และพวก (1997) ได้ศึกษาการทำก้อนแป้งหัวเชื้อ koji เพื่อผลิตสาเกชนิด *Shochu* ในสภาวะที่มีกรดซิตริก (citric acid) พบว่ากรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.25%จะสามารถเร่งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus kawachii* และทำให้กระบวนการผลิตสาเกเร็วมากยิ่งขึ้น นอกจากการใช้กากน้ำตาลและธัญญาพืชแล้ว การใช้มันฝรั่งนึ่งก็สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.28 กรัมแอลกอฮอล์/กรัมแป้ง ในถังหมักโดยใช้เชื้อ *Aspergillus awamori* (Kobayashi et al., 1998) อย่างไรก็ตามการใช้มันฝรั่งเป็นสารตั้งต้นมักมีลิกนินปะปนมาจึงทำให้เกิดเมธานอลบ้างเล็กน้อย นอกจากการใช้เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. แล้ว Rosenblitt และคณะ (2000)

ได้ใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* ที่สามารถผลิตสีแดงได้มาหมักข้าวแบบ solid substrate เพื่อศึกษาหาความสมดุลย์และวิเคราะห์ของการใช้คาร์โบไฮเดรตและออกซิเจนในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์

ด้วยคุณสมบัติของยีสต์ทั่วไปที่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ 25-30°ซ จึงมีนักวิทยาศาสตร์ที่พยายามคัดแยกเชื้อยีสต์ชนิดทนร้อน Szczodrak และ Targonski (1988) ได้ทำการแยกยีสต์ได้ 58 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 12 genera ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงกว่า 40°ซ และพบว่า *Kluyveromyces* สามารถเจริญได้ที่ 46°ซ สามารถหมักให้เอทานอลได้โดยใช้แป้งแต่ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำมาก ไม่เหมาะสำหรับเชิงพาณิชย์ ต่อมา Kadar และคณะ (2004) ได้นำเชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* มาทดลองใหม่กับขยะจากโรงงานกระดาษเพื่อใช้ย่อยแป้งให้เป็นเอทานอล พบว่าให้ yield เอทานอลเพิ่มเป็น 0.31-0.34 กรัมต่อกรัม และผลิตเอทานอลได้เพียง 1.2-1.8% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°ซ ซึ่งยังให้ปริมาณเอทานอลน้อยมาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง ที่ใช้ในงานวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงวิธีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบที่วิเคราะห์	วิธีการวิเคราห์
1. ความชื้น	กนกอร, 2547
2. เถ้า	กนกอร, 2547
3. โปรตีน	กนกอร, 2547
4. ไขมัน	กนกอร, 2547
5. คาร์โบไฮเดรต	กนกอร, 2547
6. แป้ง	กนกอร, 2547
7. เส้นใย	กนกอร, 2547
8. อะไมโลส	Hoover and Ratnayake, 2001
9. อะไมโลเพคติน	Hoover and Ratnayake, 2001
10. น้ำตาล reduce	Bernfield, 1955
11. เซลลูโลส	Ritter, 1929 Sun และคณะ, 2004
12. ลิกนิน	Aldaeus และคณะ, 2010
13. เฮมิเซลลูโลส	Mitchell and Ritter, 1940 Sun, 2004

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์

3.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมในการผลิต Reducing sugar โดยใช้เอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 4%, 8%, 12%, 16%, 20% และ 24%ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมน้ำ ให้มีปริมาตรครบ 100% นำกากมันที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น บ่มในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ Termamyl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณ reducing sugar โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ปริมาณกากมันแต่ละความเข้มข้นที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

3.2.2 การศึกษาผลของ Co-Enzyme และ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

เตรียมสารละลาย 2mM $CaCl_2$ และ acetate buffer pH 5.0 โดยมีชุดการทดลองคือ ชุดที่ 1 เติมสารละลาย 2mM $CaCl_2$ อย่างเดียว ชุดที่ 2 เติม acetate buffer pH 5.0 อย่างเดียว และชุดที่ 3 เติม 2mM $CaCl_2$ ใน acetate buffer pH 5.0 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ น้ำ นำกากมันบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปศึกษากับเอนไซม์แต่ละชนิด คือ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase โดยวิธีวิเคราะห์ของ Bernfield method เพื่อหาปริมาณ reducing sugar

3.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลของการเติม Co-Enzyme($CaCl_2$) และไม่เติม Co-Enzyme ต่อประสิทธิภาพในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 16% โดยชุดการทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เติมน้ำ (A1-G1) และกลุ่มที่ 2เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ (A2-G2) นำกากมันบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมเอนไซม์สูตรเดี่ยว คือ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติมเอนไซม์ Termamyl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณ reducing sugar ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมงโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ปริมาณกากมันที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (Control)

ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนการเติมเอนไซม์ ในการย่อยกากมัน

ชุดการทดลอง	ขั้นตอนการเติมเอนไซม์
Control	1. ไม่เติมเอนไซม์ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. ไม่เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. ไม่เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
A1,A2	1. ไม่เติมเอนไซม์ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
B1,B2	1. เติม Xylanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
C1,C2	1. เติม Hemicellulase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
D1,D2	1. เติม Cellulase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
E1,E2	1. เติม Pullulanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2.4 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม ในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ นำกากมันบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมเอนไซม์สูตรเดี่ยวและสูตรผสม คือ Xylanase, Cellulase, Pullulanase, Xylanase:Cellulase(1:1), Xylanase:Pullulanase(1:1), Cellulase:Pullulanase(1:1) และ Xylanase:Cellulase:Pullulanase(1:1:1) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติมเอนไซม์ Termamyl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณ reducing sugar ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมงโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ปริมาณกากมันที่ไม่มีการเติมเอนไซม์(Control)

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการเติมเอนไซม์ ในการย่อยกากมัน

ชุดการทดลอง	ขั้นตอนการเติมเอนไซม์
Control	4. ไม่เติมเอนไซม์ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. ไม่เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. ไม่เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
A	4. ไม่เติมเอนไซม์ บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
B	4. เติม Xylanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
C	4. เติม Cellulase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
D	4. เติม Pullulanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ขั้นตอนการเติมเอนไซม์
E	4. เติม Xylanase + Cellulase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 5. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 6. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
F	1. เติม Xylanase + Pullulanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
G	1. เติม Xylanase + Cellulase + Pullulanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
H	1. เติม Cellulase + Pullulanase บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 2. เติม Termamyl บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 3. เติม AMG บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase

ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ โดยวัดจากปริมาณ reducing sugar โดยวิธีวิเคราะห์ของ Bernfield method เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ Cellulase เตรียมใน citrate buffer pH 4.8 และเอนไซม์ Amyloglucosidase เตรียมใน citrate-phosphate buffer pH 5.0 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ค่า specific activity ของเอนไซม์ในแต่ละช่วงอุณหภูมิ

3.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูตรผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบขั้นตอนการเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ต่อการผลิต reducing sugar

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ นำกากมันบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชุดการทดลองแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่ A-B เป็นการเติมเอนไซม์แบบสอง

ขั้นตอน และชุดการทดลองที่ C-E เป็นการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณน้ำตาล reducing ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ ปริมาณกากมันที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

ตารางที่ 4 แสดงขั้นตอนการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียว และแบบสองขั้นตอน ในการย่อยกากมันปริมาณ 16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase

ชุดการทดลอง	ขั้นตอนการเติมเอนไซม์	เวลาที่ใช้ในการย่อย
Control	-ไม่เติมเอนไซม์	6 ชั่วโมง
A	-เติมเอนไซม์ Cellulase -เติมเอนไซม์ Amyloglucosidase	3 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง
B	-เติมเอนไซม์ Cellulase + Pullulanase -เติมเอนไซม์ Amyloglucosidase	3 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง
C	-เติมเอนไซม์ Amyloglucosidase	6 ชั่วโมง
D	-เติมเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase	6 ชั่วโมง
E	-เติมเอนไซม์ Cellulase + Pullulanase และAmyloglucosidase	6 ชั่วโมง

3.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* L3109

3.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ซึ่งประกอบด้วย glucose 10 กรัม peptone 5 กรัม malt extract 3 กรัม และ yeast extract 3 กรัม จากนั้นเติมน้ำให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

3.3.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM โดยศึกษา pH ที่เหมาะต่อการเจริญของยีสต์ ที่ pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ทำการปรับค่า pH โดย 1N HCl จากนั้นเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

3.4 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย

3.4.1 การศึกษาผลของ Polyethylene glycol (PEG4000) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ต่อการผลิต reducing sugar

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ เติม PEG4000 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% จากนั้นเติมเอนไซม์ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase (0.1:1:1) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณ reducing sugar ที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมงโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ กากมันที่ไม่มีการเติม PEG4000 และ DMSO แต่เติมเอนไซม์ และกากมันที่มีการเติม PEG4000 และ DMSO แต่ไม่เติมเอนไซม์ (Control)

3.4.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG และ DMSO ในยีสต์สายพันธุ์ L3109

เตรียมอาหารเหลว YM ที่มีปริมาณกลูโคส 10% จากนั้นเติม PEG400, PEG600, PEG2000, PEG4000, PEG6000 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 32, 40, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเหลว YM ที่ไม่เติม PEG และ DMSO

3.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนจาก PEG และ DMSO ในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ L3109

เตรียมอาหารเหลว YM ที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส จากนั้นเติม PEG400, PEG600, PEG2000, PEG4000, PEG6000 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน

15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเหลว YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส กับอาหารเหลว YM ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส และไม่เติม PEG หรือ DMSO

3.4.4 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร อบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ เติม PEG แต่ละชนิด คือ PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% จากนั้นเติมเอนไซม์ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase (0.1:1:1) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดหาปริมาณ reducing sugar โดยเปรียบ เทียบกับชุดควบคุม คือ กากมันที่ไม่มีการเติมPEG

3.4.5 การศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ เติม PEG แต่ละชนิด คือ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% จากนั้นเติมเอนไซม์ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase (0.1:1:1) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น centrifuge ตัวอย่างเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อนำมาศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยเติมในอาหารสูตร basal medium ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 0.25%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$.7H2O 0.03% และ NH_4Cl 0.2% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 32, 40, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหาร basal medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 10%

3.4.6 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์ L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG และปริมาณน้ำตาล Reducing ที่ใช้ไป

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ เติม PEG แต่ละชนิด คือ PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% จากนั้นเติมเอนไซม์ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase (0.1:1:1) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น centrifuge ตัวอย่างเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อนำมาศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ ในอาหารสูตร basal medium ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 0.25%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$.7H2O 0.03% และ NH_4Cl 0.2% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลา 0, 24และ 48 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทานอลโดยเครื่อง Gas Chromatography (GC) และวัดปริมาณของน้ำตาล reducing ที่ใช้ไป โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหาร basal medium ที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส และเติมน้ำตาลกลูโคส 10%

3.5 การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอล จากยีสต์สายพันธุ์ L3109 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

เตรียมกากมันดิบแห้ง ขนาด 250 ไมโครเมตร ปริมาตร 16% เติมน้ำที่มี 2mM $CaCl_2$ เติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 15.0% จากนั้นเติมเอนไซม์ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase (0.1:1:1) แล้วนำไปกวนที่ความเร็ว 180 rpm อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น centrifuge ตัวอย่างเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลว เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเติมอาหารสูตร basal medium ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 0.25%, peptone 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$.7H2O 0.03% และ NH_4Cl 0.2% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที โดยเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 rpm และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของยีสต์โดยตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดปริมาณของน้ำตาล reducing ที่ใช้ไป และปริมาณเอทานอลโดยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบเคมีในกากมันสำปะหลัง ซึ่งใช้ในการวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในกากมันแห้งเป็นแป้ง ซึ่งมีปริมาณประมาณ 40.16% โดยน้ำหนักแห้ง และมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่เป็นแป้ง (starch carbohydrate) และคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch carbohydrate) รวมกันสูงถึง 70.09% ซึ่งองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเหล่านี้ สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยผ่านกระบวนการย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส หรือเป็นโอลิโกแซคคาร์ไรด์

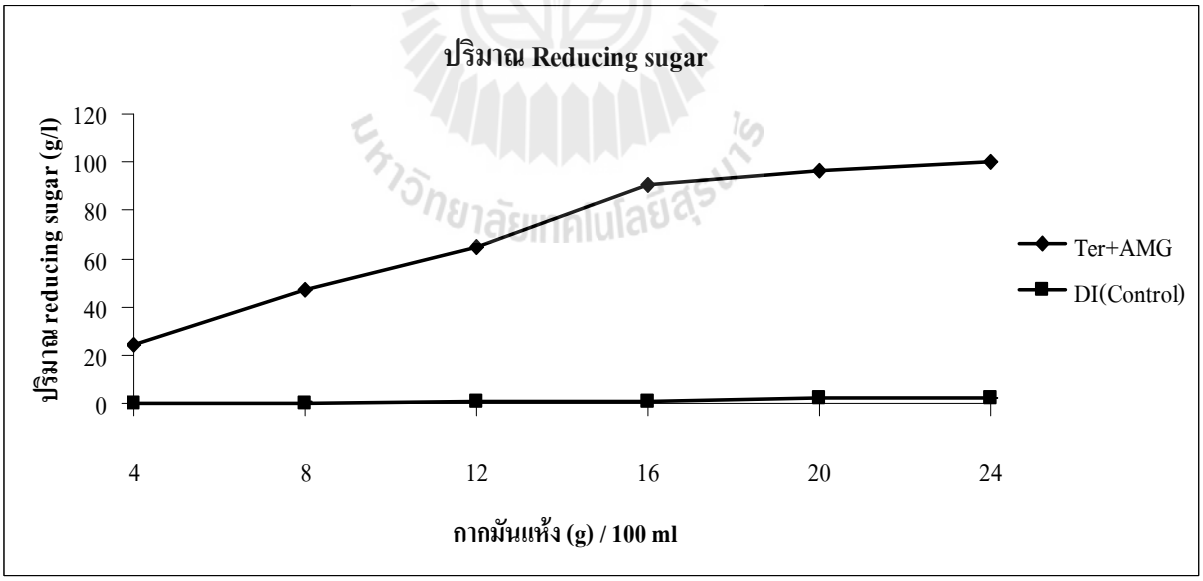
ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบทางเคมีในกากมันแห้ง (% น้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบที่วิเคราะห์	องค์ประกอบทางเคมี (% น้ำหนักแห้ง)
1) ความชื้น (moisture)	13.17%
2) เถ้า (ash)	3.08%
3) โปรตีน (protein)	0.45%
4) ไขมัน (fat)	0.33%
5) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)	67.79%
5.1) แป้ง (starch)	40.16%
5.1.1) อะไมโลส (amylose)	6.63%
5.1.2) อะไมโลเฟคติน (amylopectin)	33.53%
5.2) น้ำตาล reduce (reducing sugar)	0.46%
6) เส้นใย (fiber)	15.18%
6.1) เซลลูโลส (cellulose)	8.87%
6.2) ลิกนิน (acid insoluble lignin)	5.88%
6.3) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)	0.43%

4.2 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์

4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมในการผลิต Reducing sugar โดยใช้เอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase

จากการศึกษาความเข้มข้นของกากมันที่เหมาะสมในการผลิต Reducing sugar โดยใช้ปริมาณกากมัน 4-24% และย่อยด้วยเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1 และตารางที่ ก1 (ภาคผนวก ก) พบว่าความเข้มข้นของกากมันที่ให้ค่า yield ที่สูงสุดอยู่ที่ 4% w/v แต่ความเข้มข้นของ Reducing sugar ที่ได้อยู่ที่ 24.116 g/l ซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้สำหรับการหมักเพื่อการผลิตเอทานอล และเมื่อนำปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการผลิต Reducing sugar มาเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ปริมาณของกากมันที่ปริมาณสูง พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Reducing sugar ได้จากการย่อยกากมันที่ความเข้มข้น 16% w/v ซึ่งให้ปริมาณของ Reducing sugar อยู่ที่ 90.771 g/l และเมื่อเปรียบเทียบ Reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันที่ความเข้มข้น 4% w/v พบว่า กากมันที่ความเข้มข้น 16 g/l ให้ Reducing sugar สูงกว่าถึง 3.76 เท่า โดยใช้เอนไซม์ในปริมาณที่เท่ากัน ส่วนที่ความเข้มข้นของกากมัน 20 และ 24 % w/v พบว่า กากมันมีลักษณะบวมน้ำ ไม่เป็นของเหลว และทำการกวนหรือเขย่าให้เกิดการผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ยาก ไม่เหมาะสำหรับการผลิต

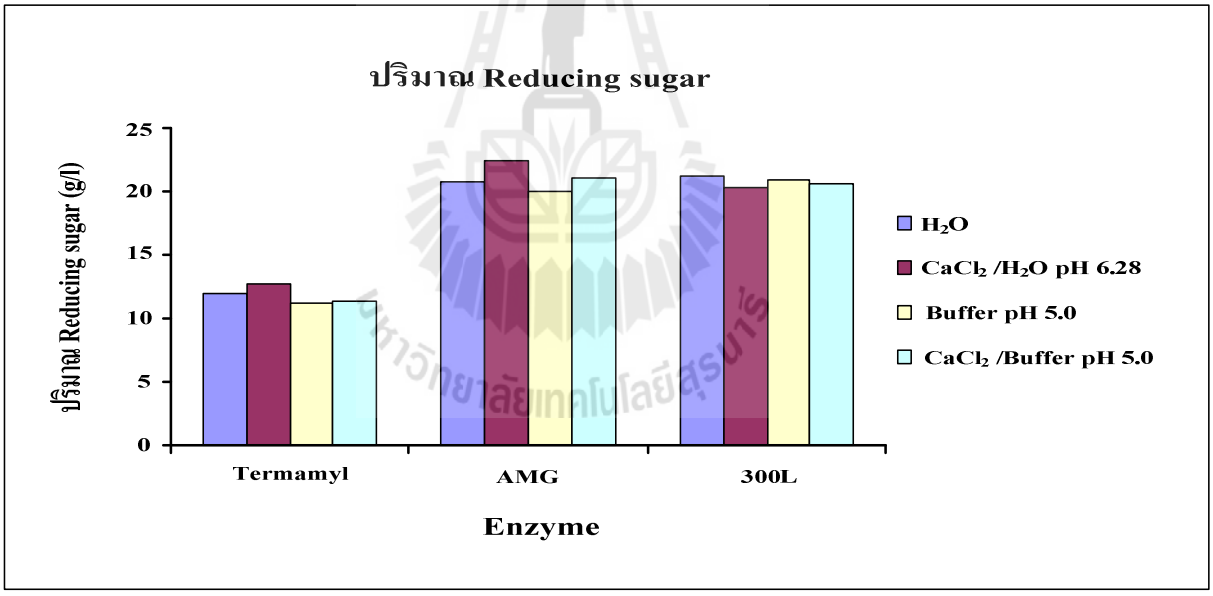


Ter = Termamyl AMG = Amyloglucosidase

รูปที่ 1 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ 4%, 8%, 12%, 16%, 20% และ 24% โดยเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

4.2.2 การศึกษาผลของ $CaCl_2$ และ Acetate buffer pH 5.0 ต่อการทำงานของเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase

ผลการศึกษาผลของ 2mM $CaCl_2$ และ acetate buffer pH 5.0 ต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase พบว่า 2 mM $CaCl_2$ มีผลช่วยการทำงานของเอนไซม์ โดย 2mM $CaCl_2$ ที่เตรียมในน้ำ มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Amylase ส่วน 2mM $CaCl_2$ ที่เตรียมใน acetate buffer pH 5.0 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Amyloglucosidase เล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Termamyl และAmylase เมื่อเทียบกับน้ำ ส่วน acetate buffer pH 5.0 ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase ดังแสดงในรูปที่ 2 และตารางที่ ก2 (ภาคผนวก ก)

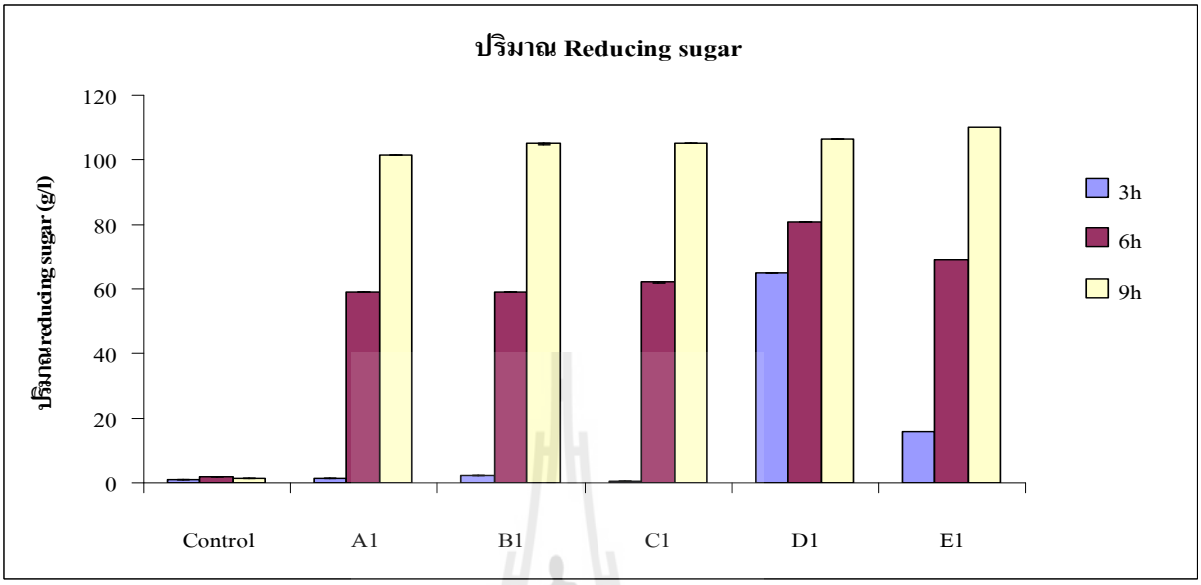


AMG = Amyloglucosidase 300L = Amylase AG300L

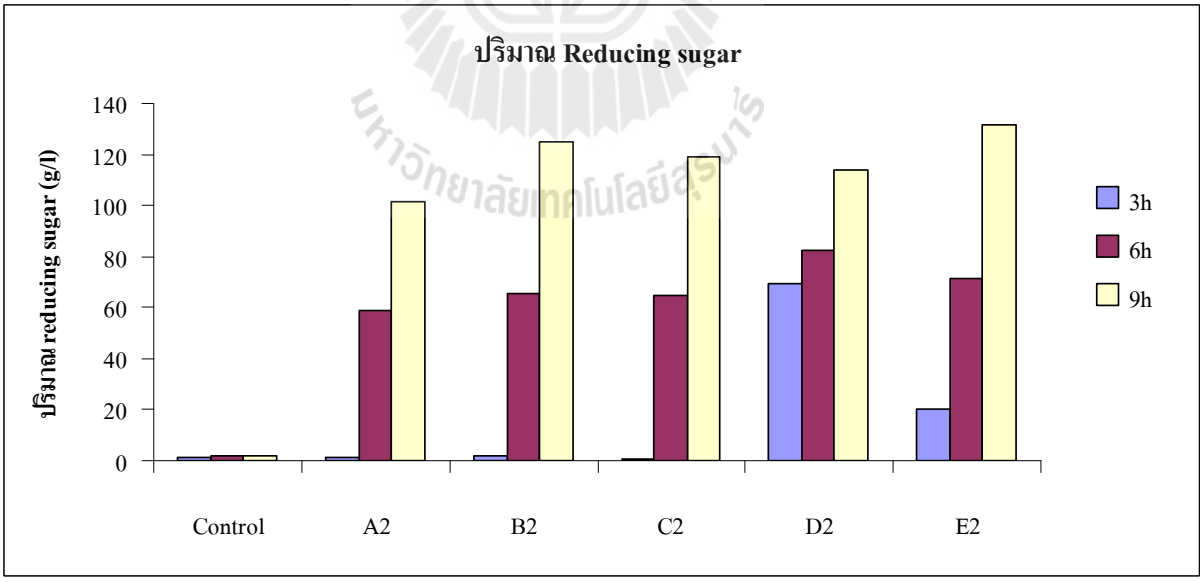
รูปที่ 2 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อย 0.1% amylopectin โดยเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และ Amylase

4.2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อประสิทธิภาพในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase

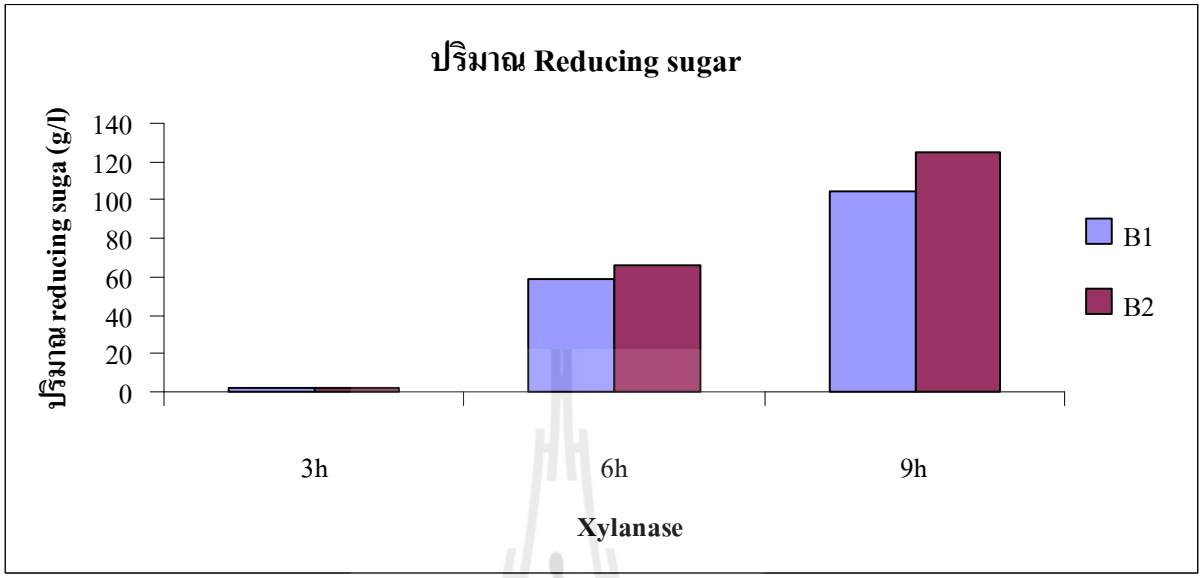
จากการศึกษาเปรียบเทียบการเติม 2mM $CaCl_2$ และไม่เติม 2mM $CaCl_2$ ต่อ ประสิทธิภาพ ในการทำงานของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ พบว่า 2mM $CaCl_2$ มี ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพ ในการผลิต reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยเมื่อเปรียบเทียบการไม่เติม2mM $CaCl_2$ และเติม2mM $CaCl_2$ ใช้เวลาในการย่อยกากมันที่เวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ Cellulase (ชุด D1,D2) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุดคือ 65.046 และ69.534 g/l ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ Termamyl แล้วจึงย่อยกากมันต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ Cellulase (ชุดD1,D2) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing(g/l)สูงที่สุดคือ 80.647 และ82.398 ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase แล้วจึงย่อยกากมันต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ Pullulanase (ชุดE1,E2) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุดคือ 109.892 และ131.546 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5-8 และตารางที่ ก3 (ภาคผนวก ก) และในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดหลังจากย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมงแรก พบว่าเอนไซม์ Xylanase (ชุดB2) และHemicellulase (ชุดC2) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing ที่น้อยมาก มีค่า 1.870 และ0.956 g/l ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ Cellulase (ชุดD2) และPullulanase (ชุดE2) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing ที่สูงกว่า โดยมีค่า 43.459 และ 12.858 g/l ตามลำดับ และเมื่อเติมเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาล reducing ที่มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไม่เติมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงแรก โดยค่า yield ที่เพิ่มขึ้น ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase คือ 76.761, 73.891, 27.827 และ69.358 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3-4 และตารางที่ ก3 (ภาคผนวก ก)



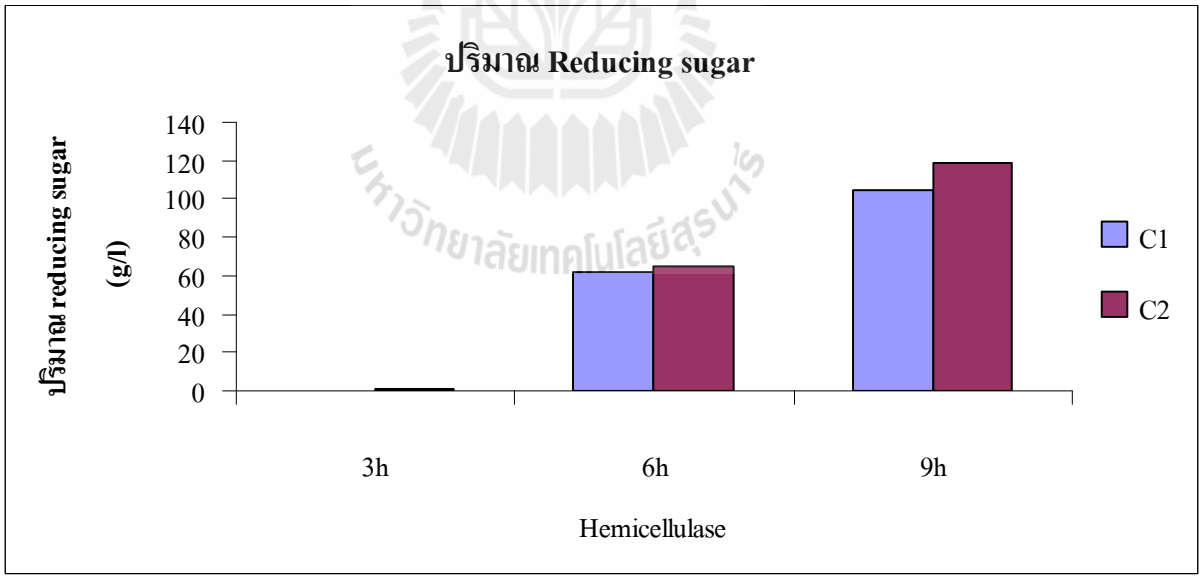
รูปที่ 3 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยไม่เติม 2mM $CaCl_2$ และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ



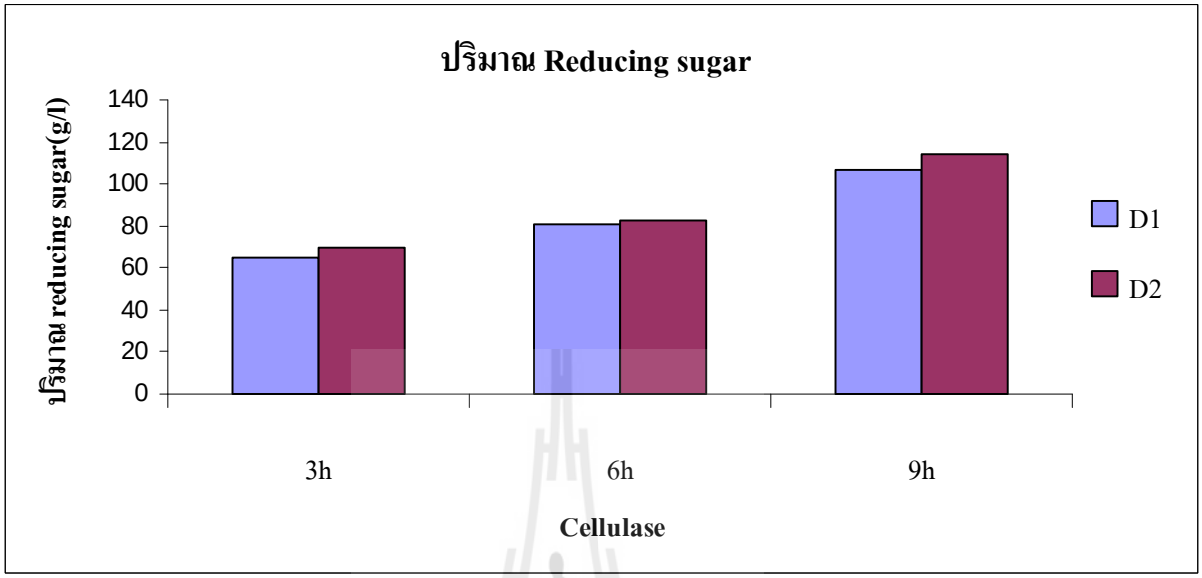
รูปที่ 4 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยเติม $CaCl_2$ และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ



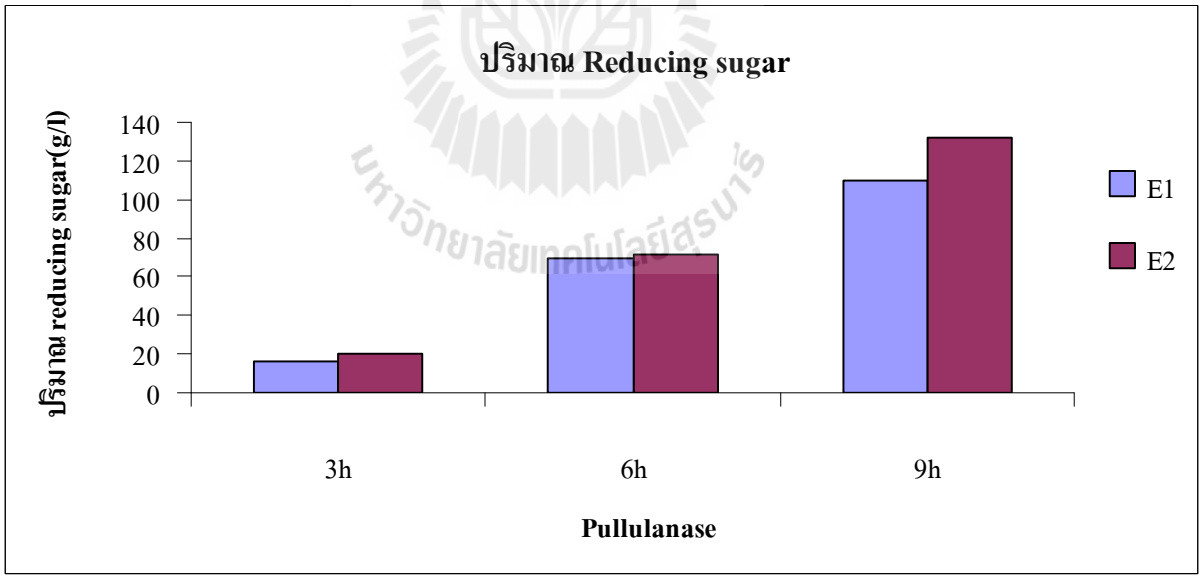
รูปที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Xylanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Hemicellulase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ



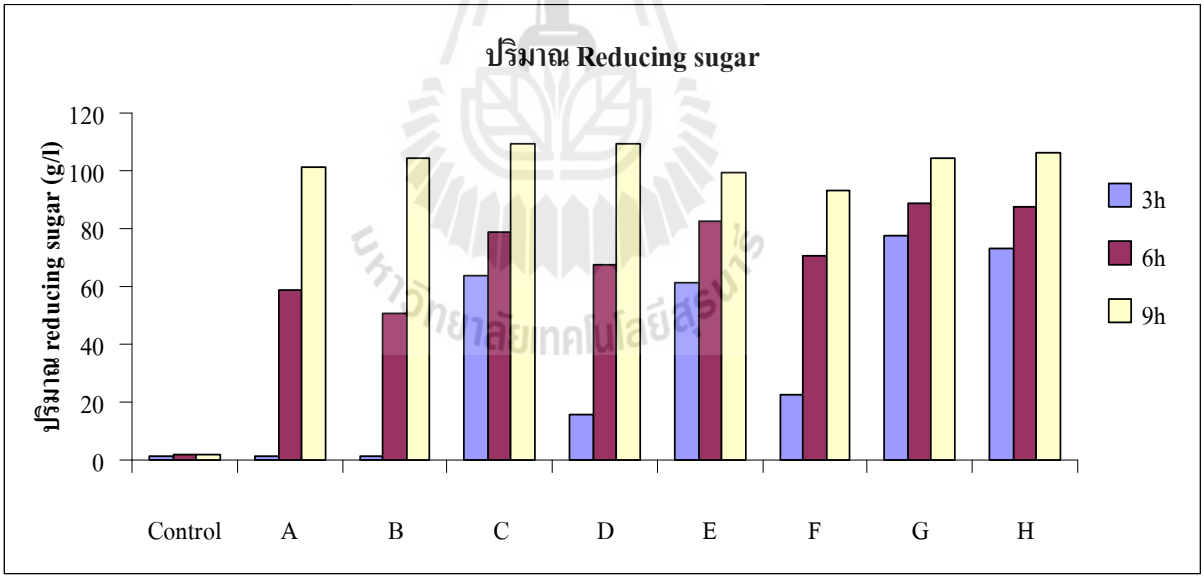
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ



รูปที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ Pullulanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

4.2.4 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม ในการผลิต Reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase

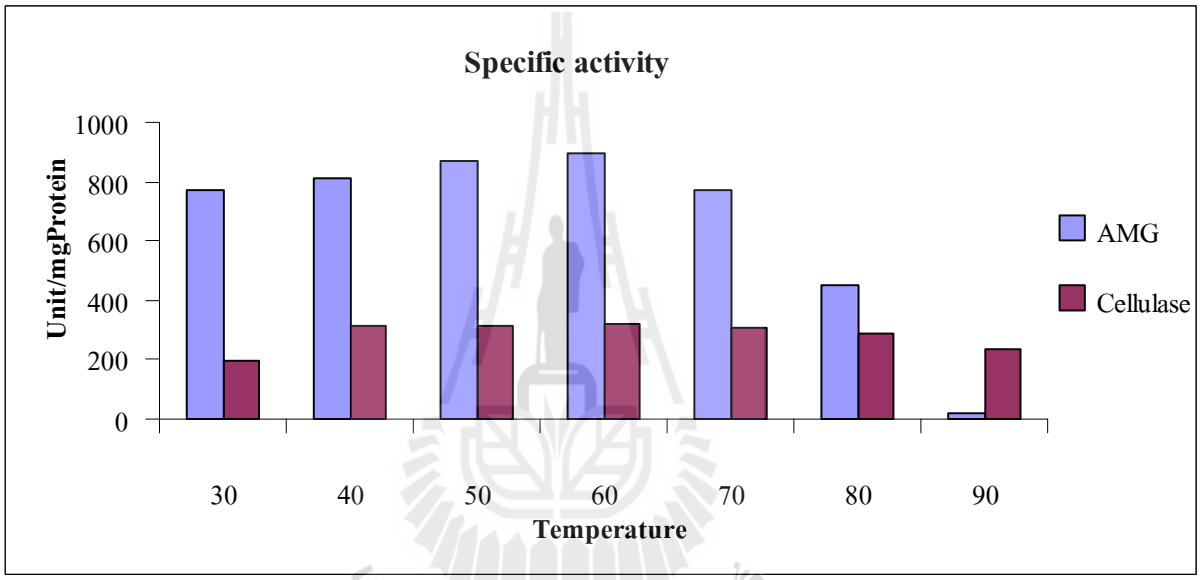
จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase สูตรเดี่ยว และสูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์สูตรผสม Xylanase:Cellulase:Pullulanase (G) ให้ปริมาณน้ำตาล reducig สูงที่สุด คือ 77.513 g/l จากนั้นเมื่อเติมเอนไซม์ Termamyl เอนไซม์สูตรผสม Xylanase:Cellulase:Pullulanase (G) และ Cellulase:Pullulanase(H) ให้ปริมาณน้ำตาล reducig ที่สูง คือ 88.526 และ87.673 g/l ตามลำดับ เมื่อเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase พบว่าเอนไซม์ Cellulase (C), Pullulanase (D) และCellulase:Pullulanase (H) ให้ปริมาณน้ำตาล reducig ที่สูง คือ 109.130, 109.343 และ106.075 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9 และตารางที่ ก4 (ภาคผนวก ก) ดังนั้นเอนไซม์สูตรผสมที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา คือ Cellulase:Pullulanase โดยทำงานร่วมกับ Amyloglucosidase เพื่อให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล reducig ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 9 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

4.2.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase

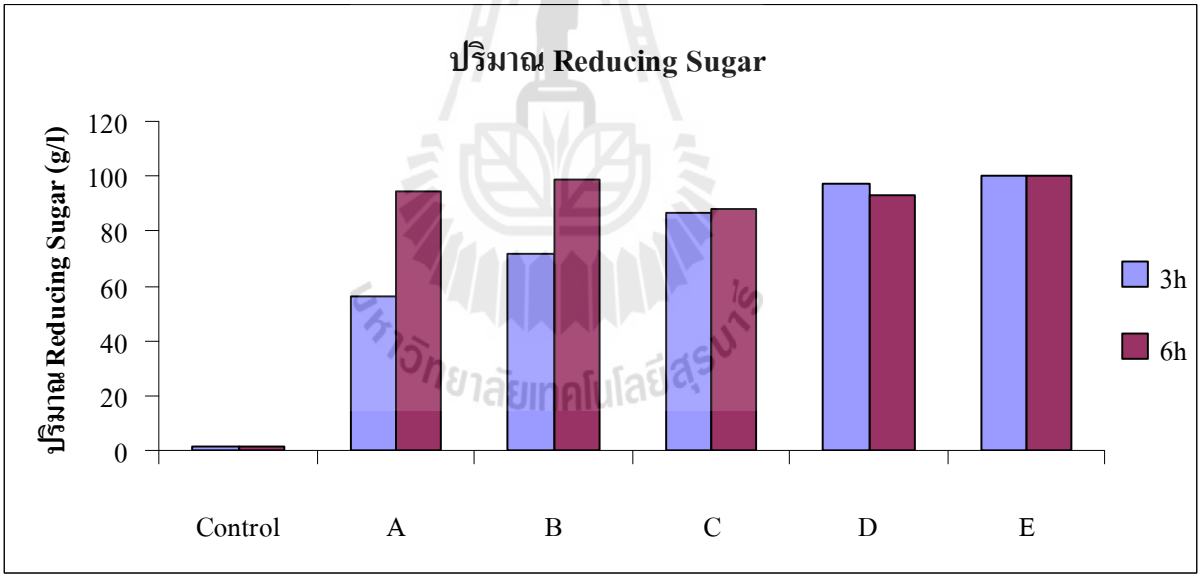
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส โดยให้ค่า specific activity เท่ากับ 892.825 และ317.050 Unit/mgProtein ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยกากมันแบบขั้นตอนเดียว คือ60 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดง specific activity ของเอนไซม์ Cellulase และAmyloglucosidase ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

4.2.6 การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์สูตรผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบขั้นตอนการเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase ต่อการผลิต reducing sugar

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และCellulase + Pullulanase โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Amyloglucosidase แบบขั้นตอนเดียว และแบบสองขั้นตอน พบว่าเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จนครบ 6 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยเอนไซม์ Cellulase (A) และ Cellulase + Pullulanase (B) ที่เติมเอนไซม์แบบสองขั้นตอน ให้ปริมาณน้ำตาล reducing 94.237 และ98.910 g/l ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวของเอนไซม์ Cellulase (D) และ Cellulase + Pullulanase (E) ให้ปริมาณน้ำตาล reducing 93.285 และ99.775 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11 และตารางที่ ก5 (ภาคผนวก ก) จึงสามารถสรุปได้ว่าสามารถเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวสำหรับการย่อยกากมัน

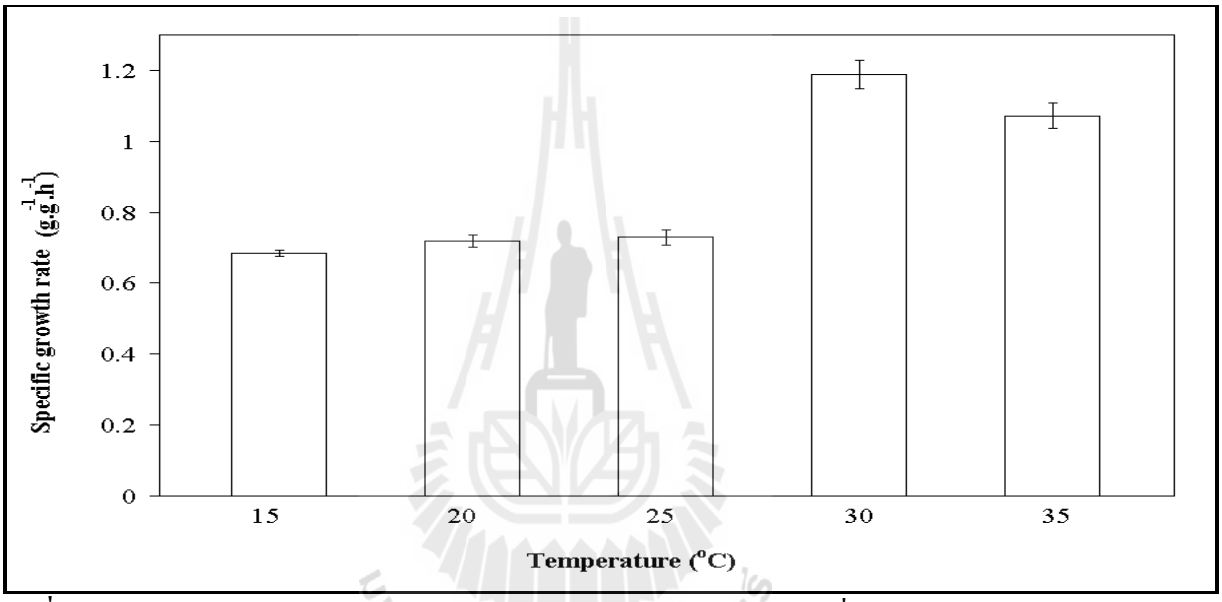


รูปที่ 11 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase

4.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* L3109

4.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเจริญต่ำสุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 12

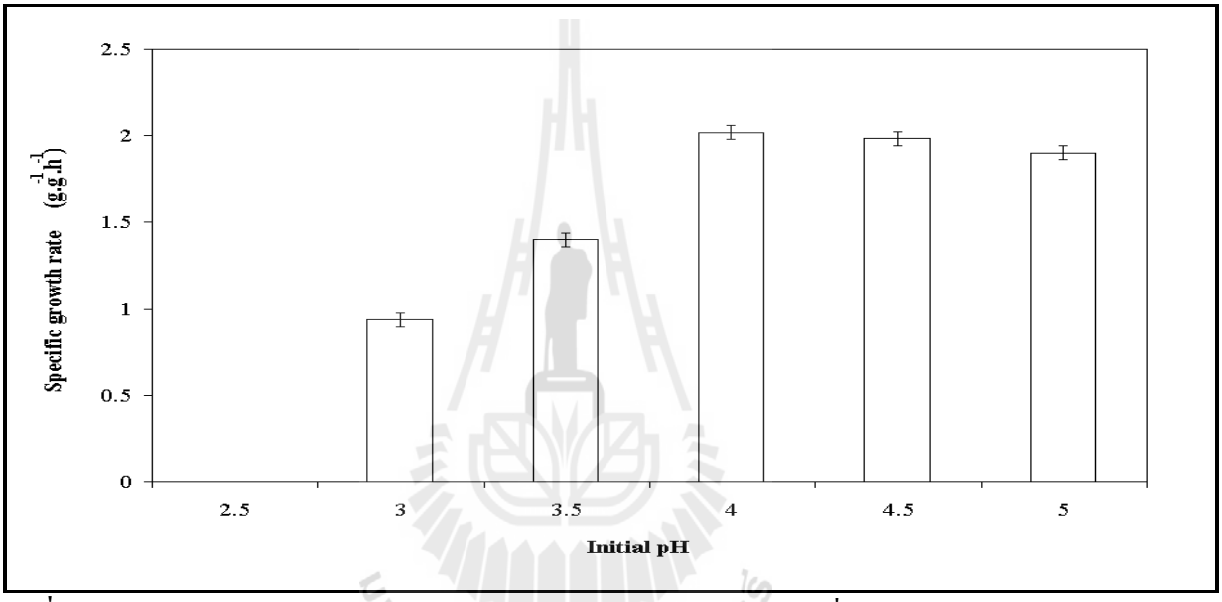


รูปที่ 12 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่อุณหภูมิ 15- 35 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

จากการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่ pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะที่เหมาะสม คือ ค่า pH 4.0-5.0 และที่ค่า pH 2.5 ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ไม่สามารถเจริญได้ ดังแสดงในรูปที่ 13



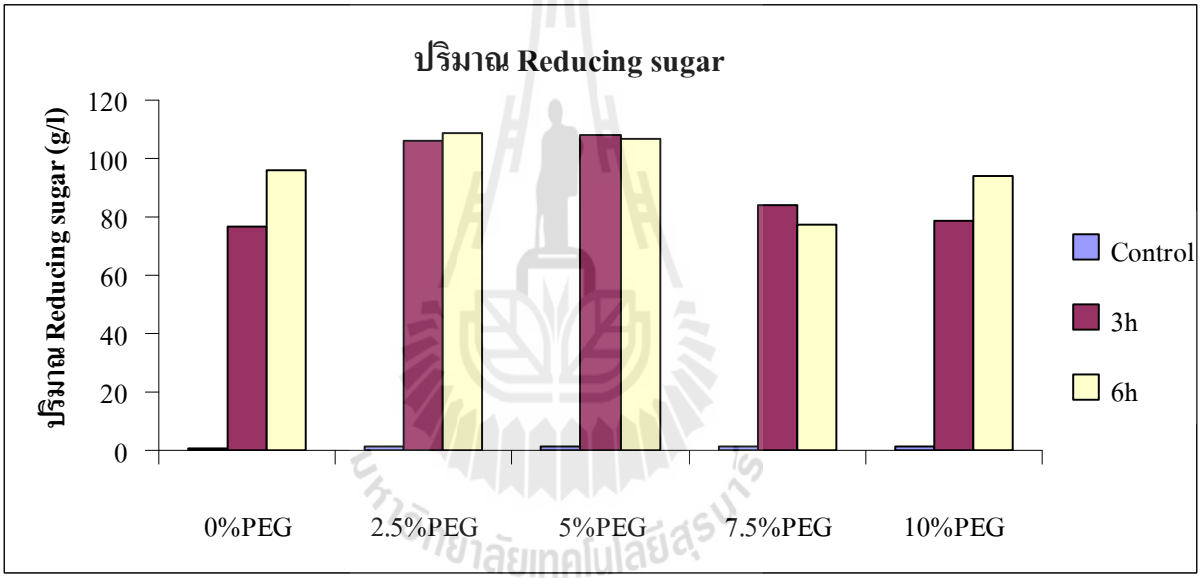
รูปที่ 13 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ที่ค่า pH 2.5-5.0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย

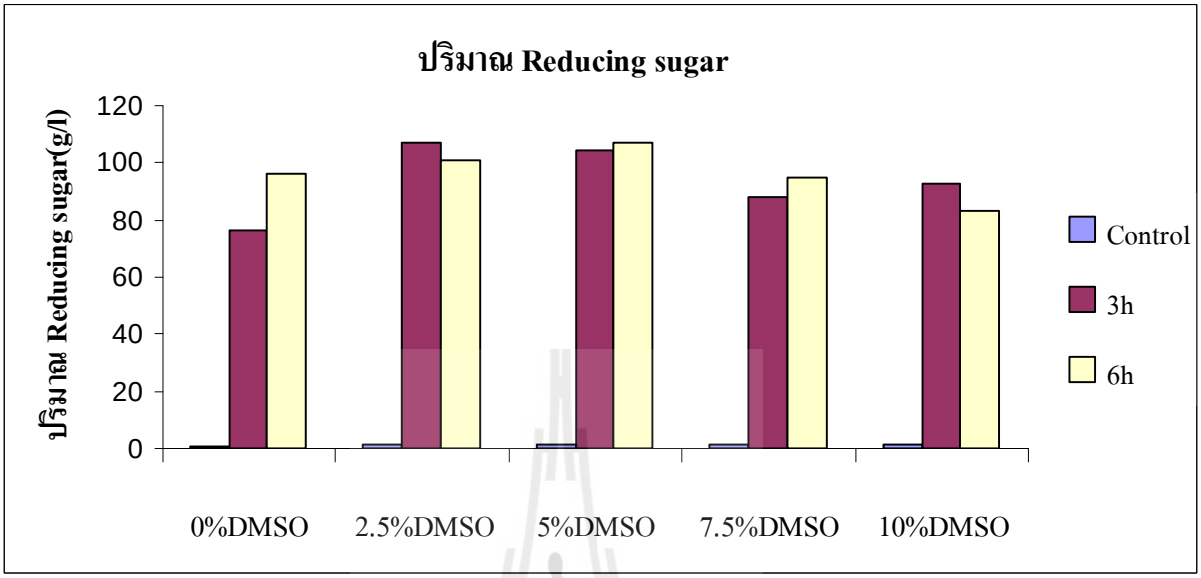
4.4.1 การศึกษาผลของ Polyethylene glycol (PEG4000) และ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ต่อการผลิต reducing sugar

จากการศึกษาผลของPEG4000 พบว่ามีผลต่อการทำงานของ Cellulase:Pullulanase:Amyloglucosidase โดยเมื่อผ่านการย่อยครบ 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณของน้ำตาล reducing ได้ดี เมื่อเทียบกับไม่มีการเติมPEG ที่ความเข้มข้น 2.5% และ5.0% โดยให้ปริมาณน้ำตาล reducing คือ 108.475 และ106.874 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ ข1 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 14 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

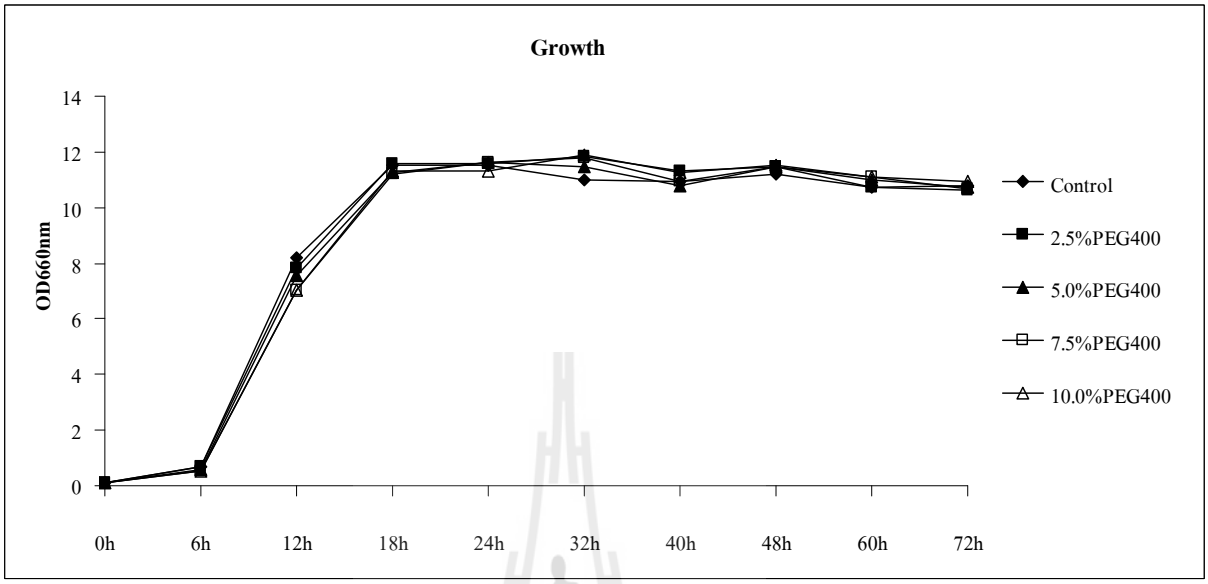
จากการศึกษาผลของ DMSO พบว่ามีผลต่อการทำงานของ Cellulase:Pullulanase: Amyloglucosidase โดยเมื่อผ่านการย่อยครบ 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณของน้ำตาล reducing ได้ดี เมื่อเทียบกับไม่มีการเติม DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5% และ5.0% โดยให้ปริมาณน้ำตาล reducing คือ 100.682 และ107.362 g/l ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ ข1 (ภาคผนวก ข)



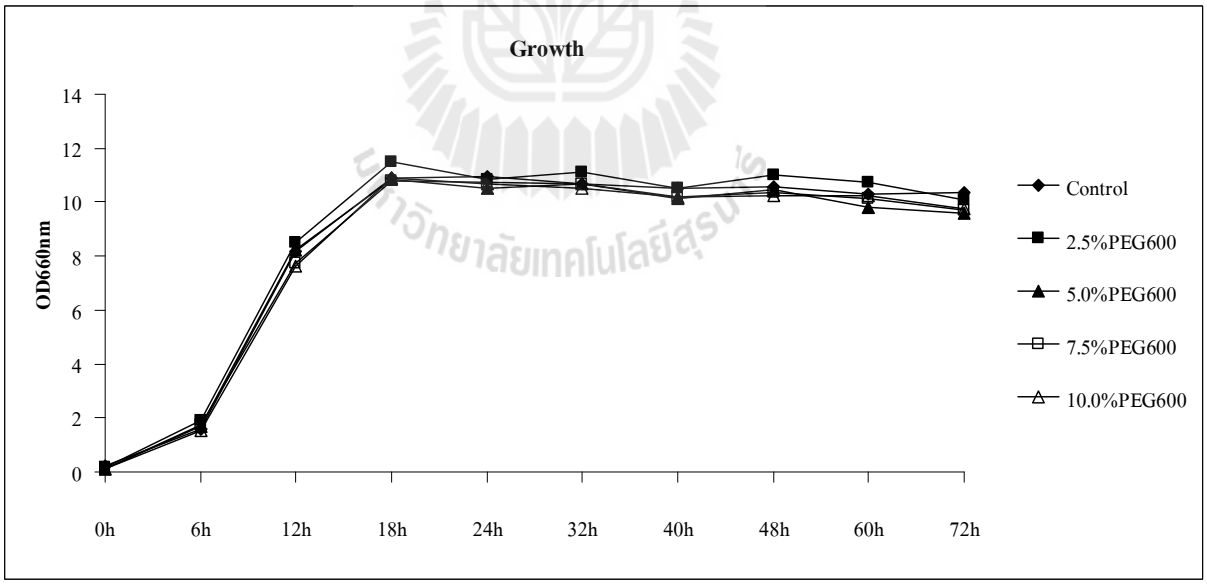
รูปที่ 15 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

4.4.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG และ DMSO ในยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

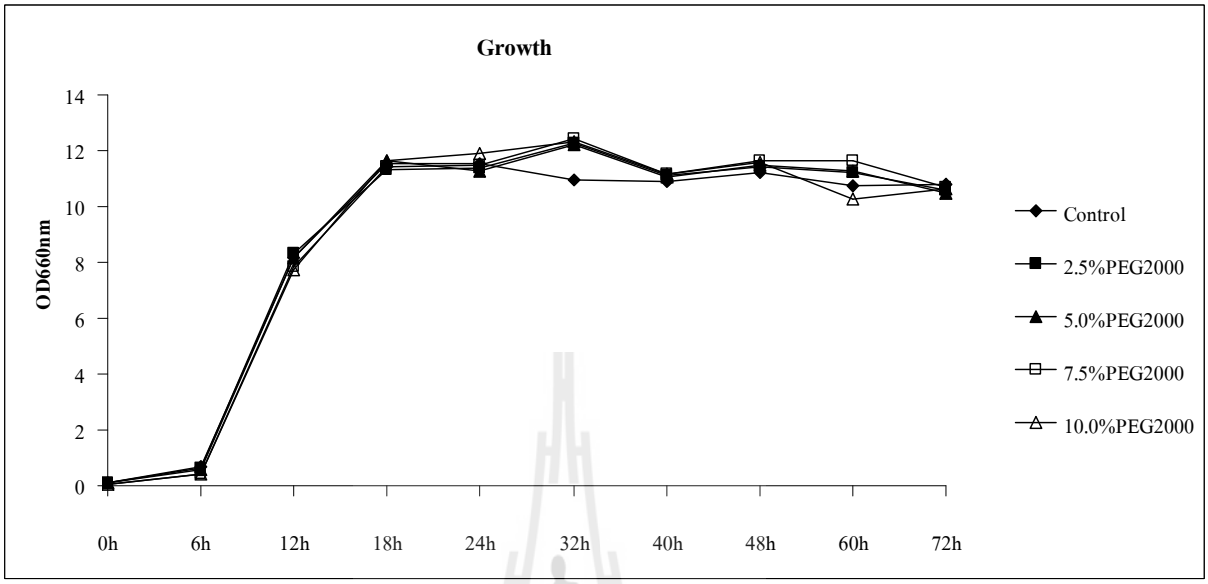
จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG400, PEG600, PEG2000, PEG4000, PEG6000 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% พบว่า PEG ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5-10.0% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 16-20 และเมื่อศึกษาผลของ DMSO ต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ พบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5-5.0% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม และมีการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วน DMSO ที่ความเข้มข้น 7.5-10.0% พบว่ามีผลต่อเซลล์เล็กน้อย ทำให้มีการเจริญที่ช้า โดยมีค่าการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 40-48 ชั่วโมง และการเจริญของเซลล์น้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 21



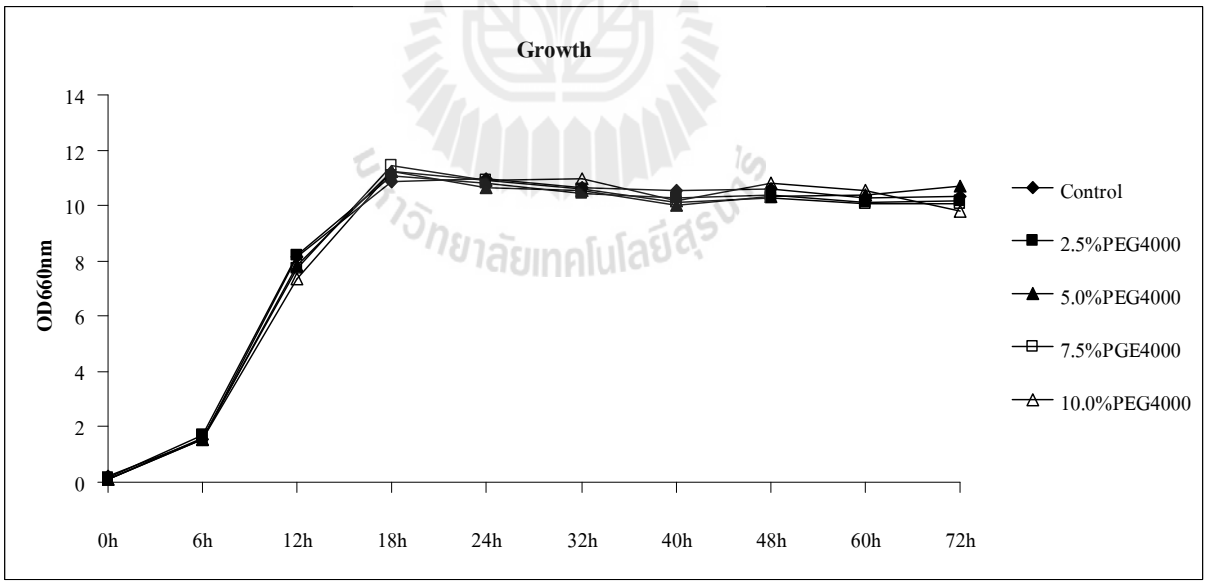
รูปที่ 16 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG400 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



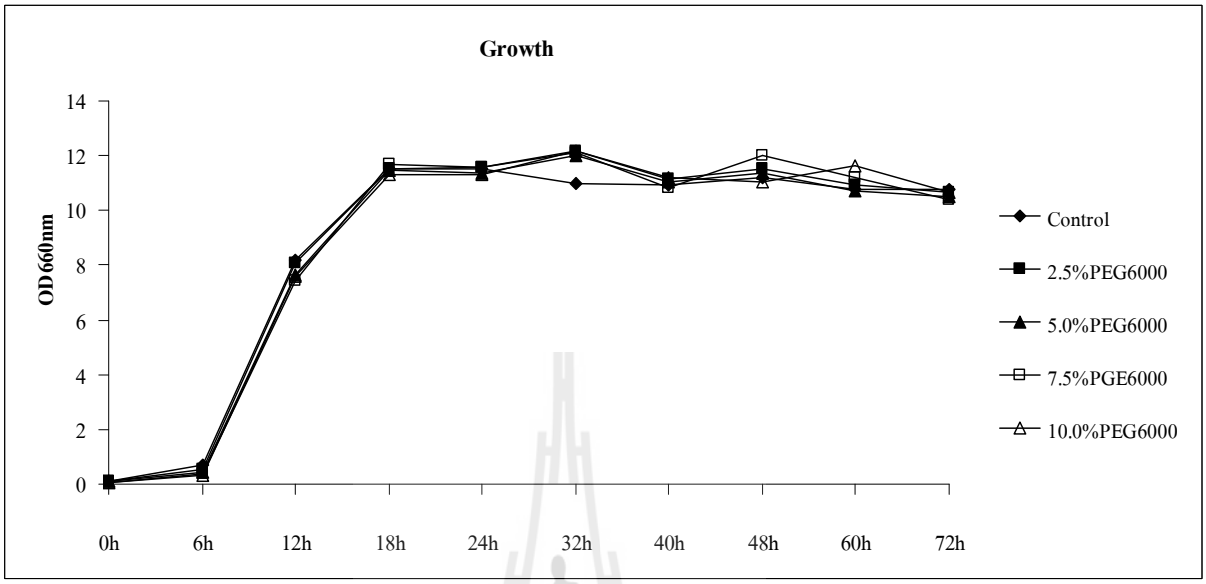
รูปที่ 17 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG600 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



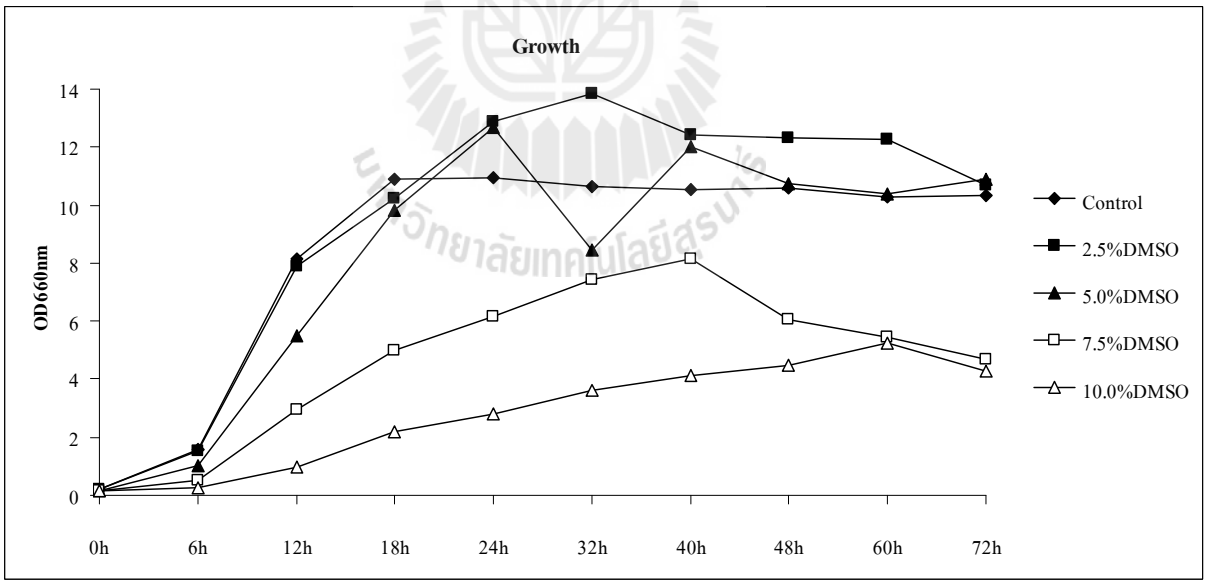
รูปที่ 18 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



รูปที่ 19 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG4000 ที่ความเข้นข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



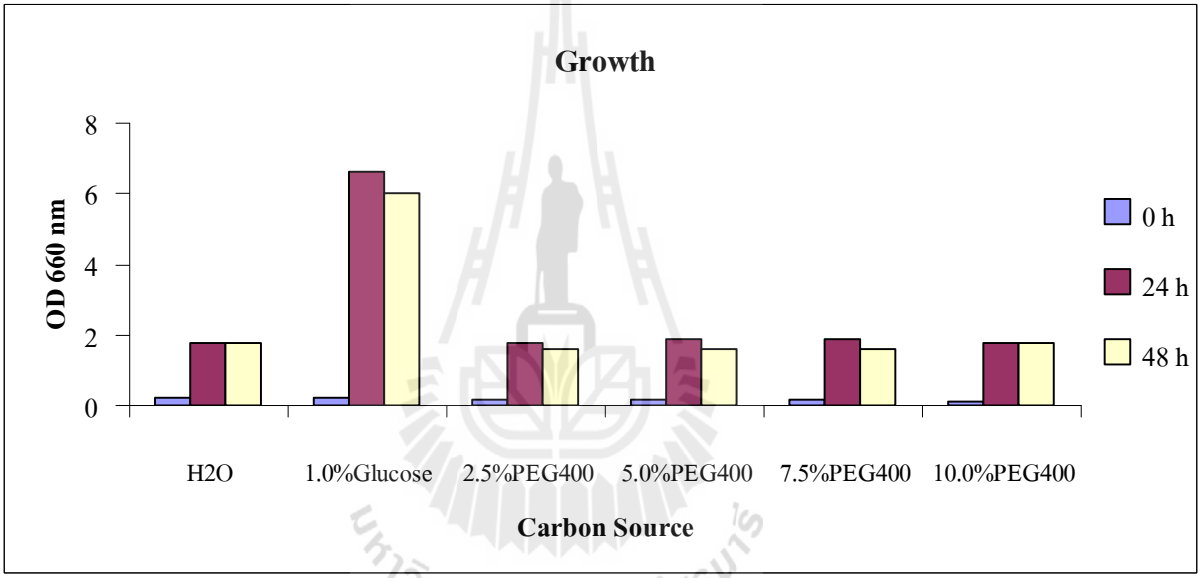
รูปที่ 20 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



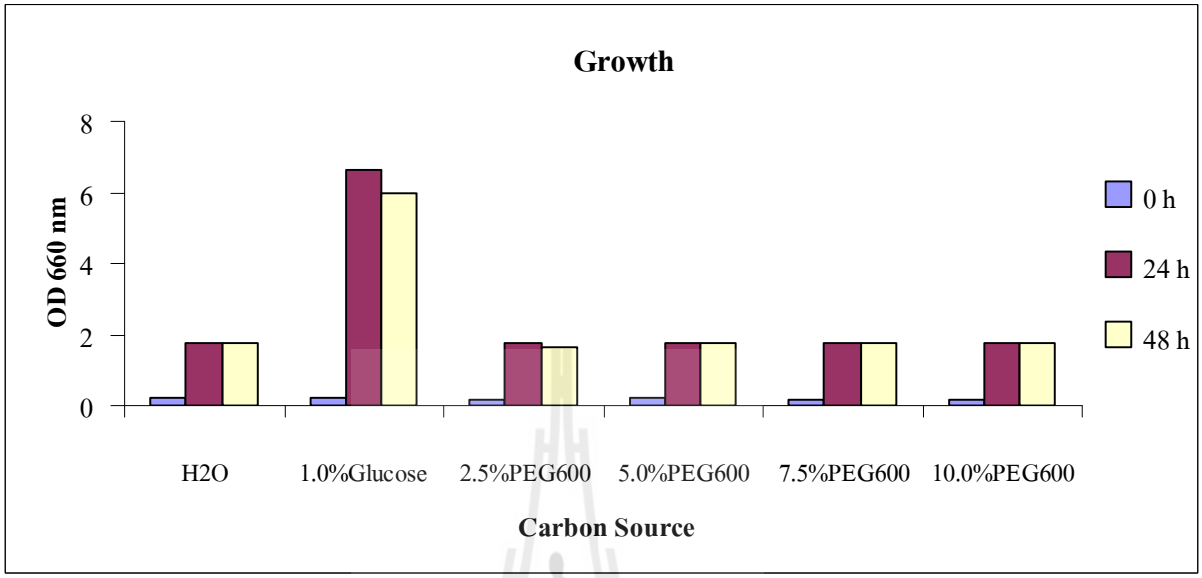
รูปที่ 21 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมDMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%

4.4.3 การศึกษาแหล่งคาร์บอนจาก PEG และ DMSO ในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109

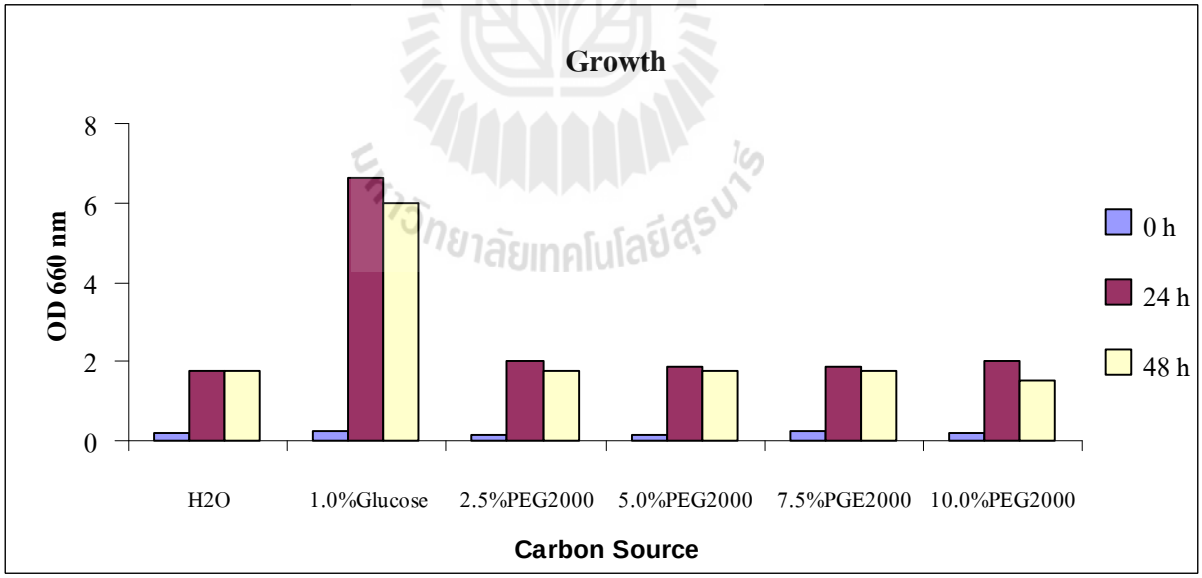
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าPEG และ DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5-10.0% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ หรือมีความเป็นพิษน้อย จึงเลือกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ยีสต์ พบว่าทั้ง PEG และ DMSO ไม่สามารถเป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อให้เซลล์ยีสต์เกิดการเจริญ ทำให้ค่าการเจริญของยีสต์น้อยมาก เมื่อเทียบกับชุดที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 1.0% ดังแสดงในรูปที่ 22-27



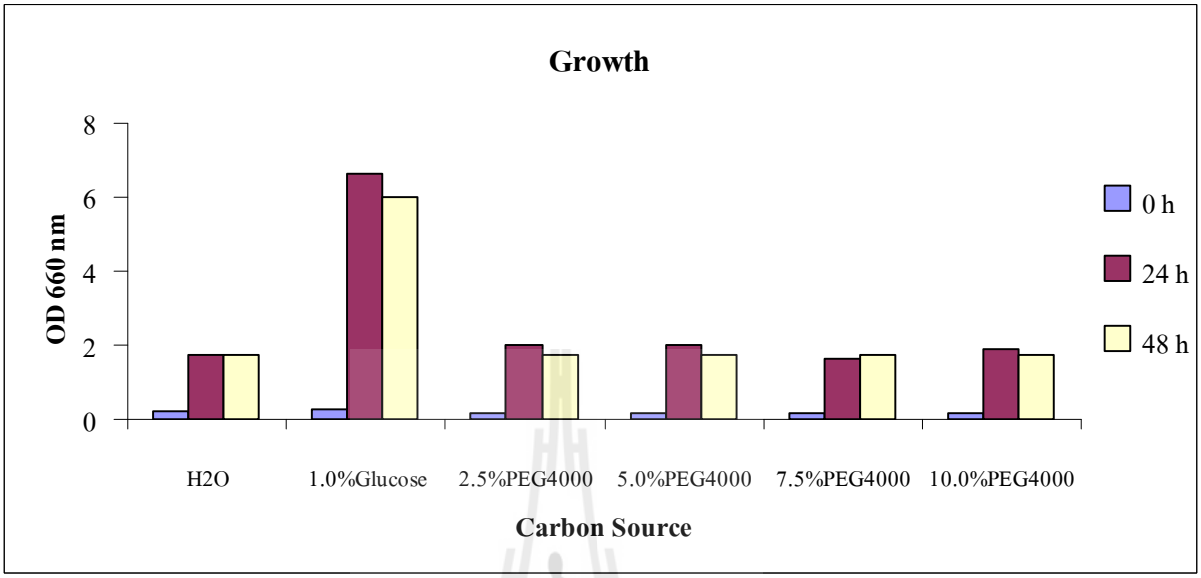
รูปที่ 22 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG400 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



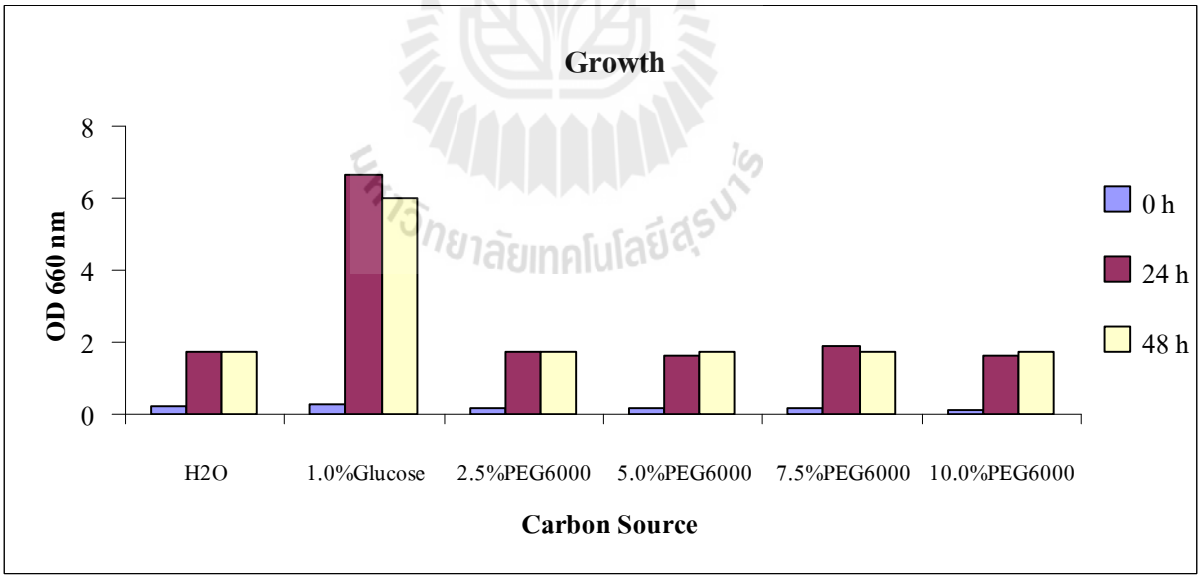
รูปที่ 23 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG600 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



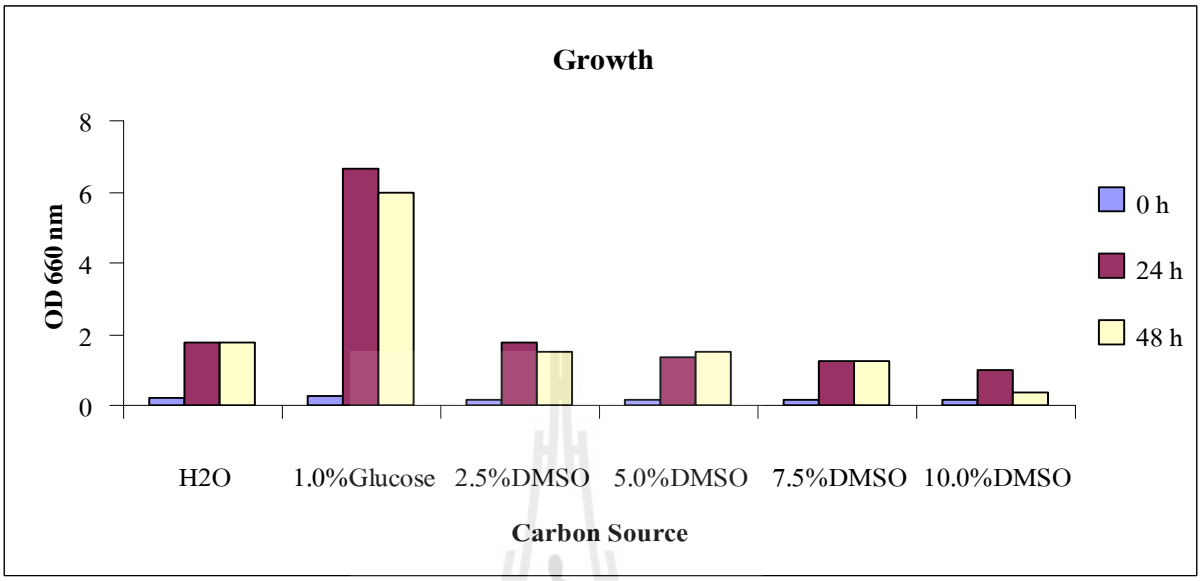
รูปที่ 24 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG2000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



รูปที่ 25 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG4000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%



รูปที่ 26 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมPEG6000 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%

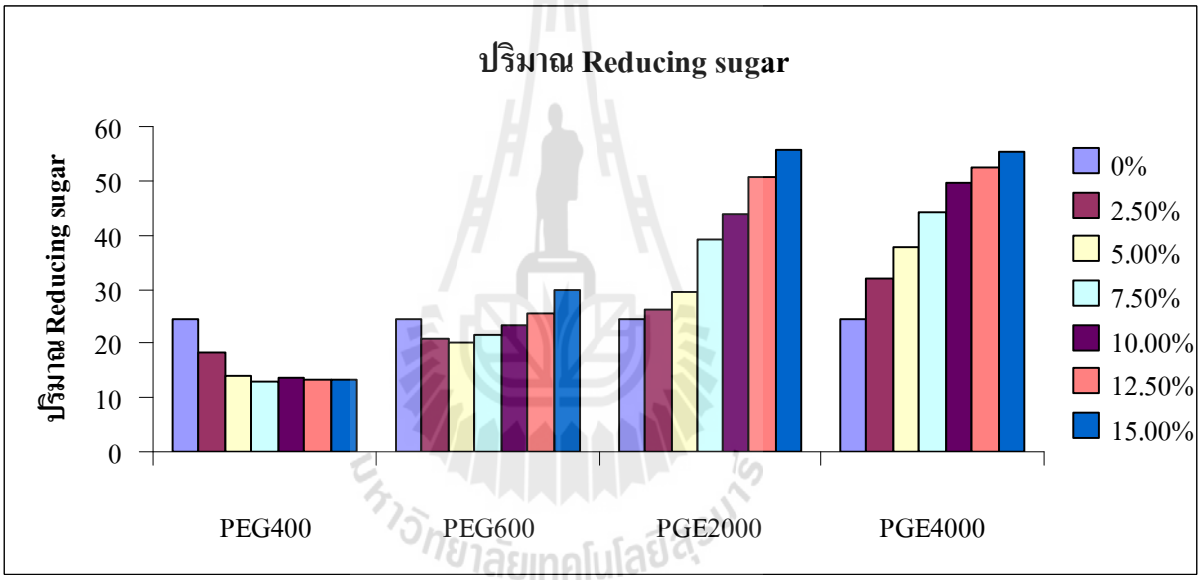


รูปที่ 27 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยเติมDMSO เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4.4 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar

จากการศึกษาชนิดและปริมาณ PEG ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing พบว่า PEG400 และPEG600 ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing เนื่องจากปริมาณน้ำตาล reducing ที่ได้มีค่าต่ำ หรือใกล้เคียงกับชุดควบคุม คือไม่มีการเติมPEG แต่เมื่อศึกษาใน PEG2000 และPEG4000 พบว่า PEG ทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing โดยให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 15% และสามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาล reducing ได้มาก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 28 และตารางที่ ข2 (ภาคผนวก ข)

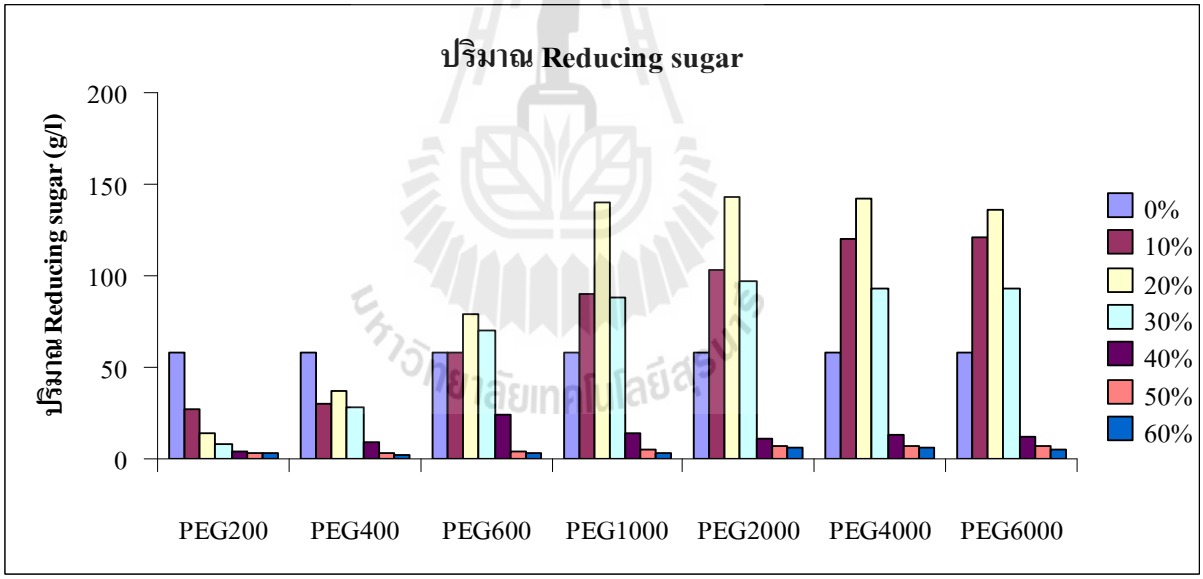


รูปที่ 28 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG400, PEG600, PEG2000 และ PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5% และ 15.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

4.4.5 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า PEG มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing จึงศึกษาเพิ่มเติมทั้งชนิดและปริมาณของ PEG พบว่า PEG200 และPEG400 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing และยังให้ปริมาณน้ำตาล reducing ต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติม PEG ส่วนPEG600 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ได้

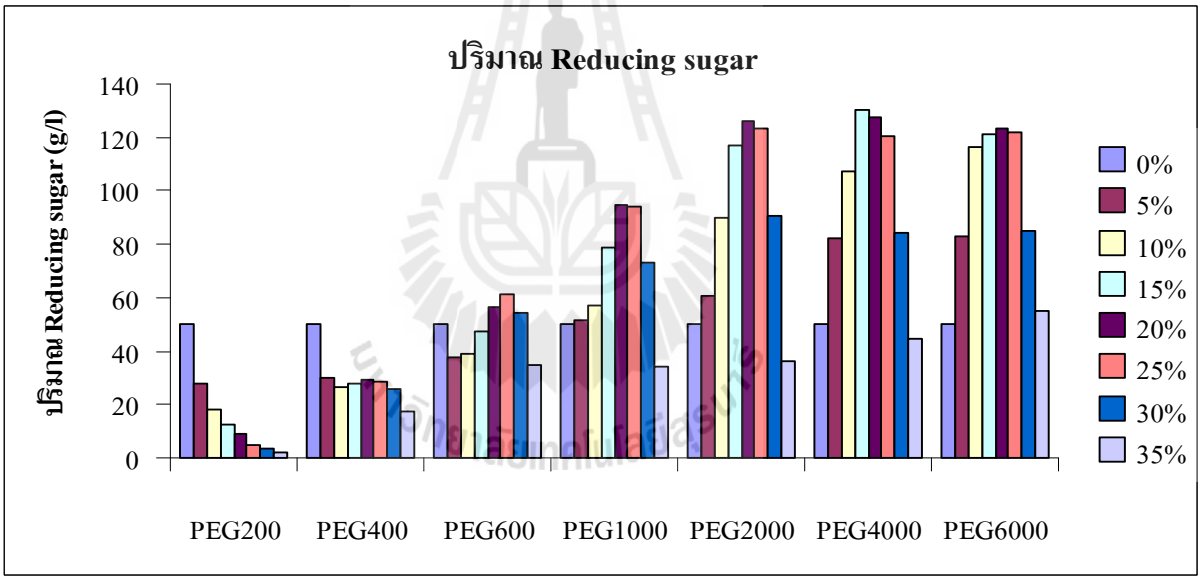
เล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 20% และ30% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ส่วนที่ความเข้มข้น 10%, 40%, 50% และ60% ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ได้ โดยให้ปริมาณน้ำตาล reducing ต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติมPEG ส่วนPEG1000, PEG2000 PEG4000 และPEG6000 พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing โดยที่ความเข้มข้น 10%, 20% และ30% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing ที่สูง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 20% ให้ค่าปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด โดยมีค่า 139.942, 143.079, 141.970 และ135.759 g/l ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 40%, 50% และ60% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติม เนื่องจากปริมาณ PEG ที่ความเข้มข้นสูง ทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลต่อความสามารถในการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลาย ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 29 และตารางที่ ข3 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 29 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

4.4.6 การศึกษาชนิด และปริมาณของ PEG ต่อการผลิต reducing sugar (ต่อเนื่อง)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า PEG ที่ความเข้มข้น 40-60% ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ได้ และมีผลต่อการผลิตน้ำตาล reducing โดยให้ค่าที่ต่ำมาก จึงศึกษาเพิ่มเติมในช่วงความเข้มข้น 5-35% ของ PEG แต่ละชนิด พบว่า PEG200 และ PEG400 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ได้ โดยให้ค่าที่ต่ำ ส่วนPEG600 ให้ค่าการผลิตน้ำตาล reducing เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่ความเข้มข้น 20-30% เมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการเติมPEG ส่วน PEG1000, PEG2000, PEG4000 และPEG6000 มีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล reducing โดยที่ความเข้มข้น 5-30% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาล reducing ได้ โดยให้ปริมาณน้ำตาล reducing ที่สูงมากในช่วงความเข้มข้น 15-25% ดังแสดงในรูปที่ 30 และตารางที่ ข4 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 30 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

4.4.7 การศึกษาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ ในอาหารสูตร basal medium ที่เติมสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG พบว่า

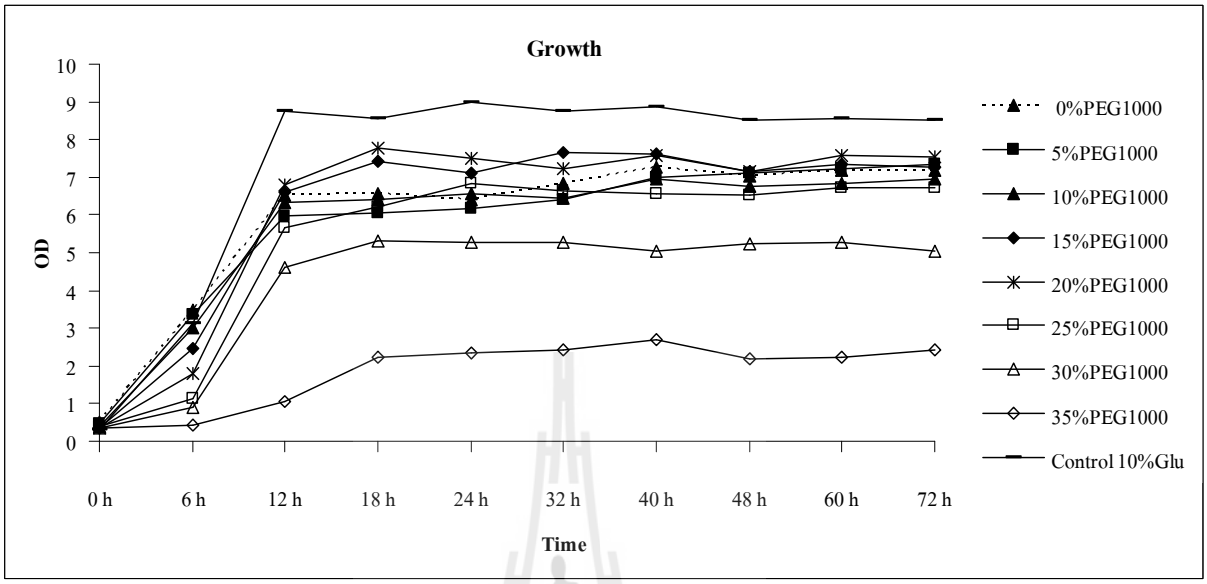
PEG1000 ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกับชุดที่ไม่เติมPEG โดยที่ความเข้มข้น 20% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ที่ความเข้มข้น 30-35% ให้ค่าการเจริญที่ต่ำกว่าชุดที่ไม่เติมPEG ดังแสดงในรูปที่ 31

PEG2000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่าชุดที่ไม่เติมPEG โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ที่ความเข้มข้น 30-35% ให้ค่าการเจริญที่ต่ำกว่าชุดที่ไม่เติมPEG ดังแสดงในรูปที่ 32

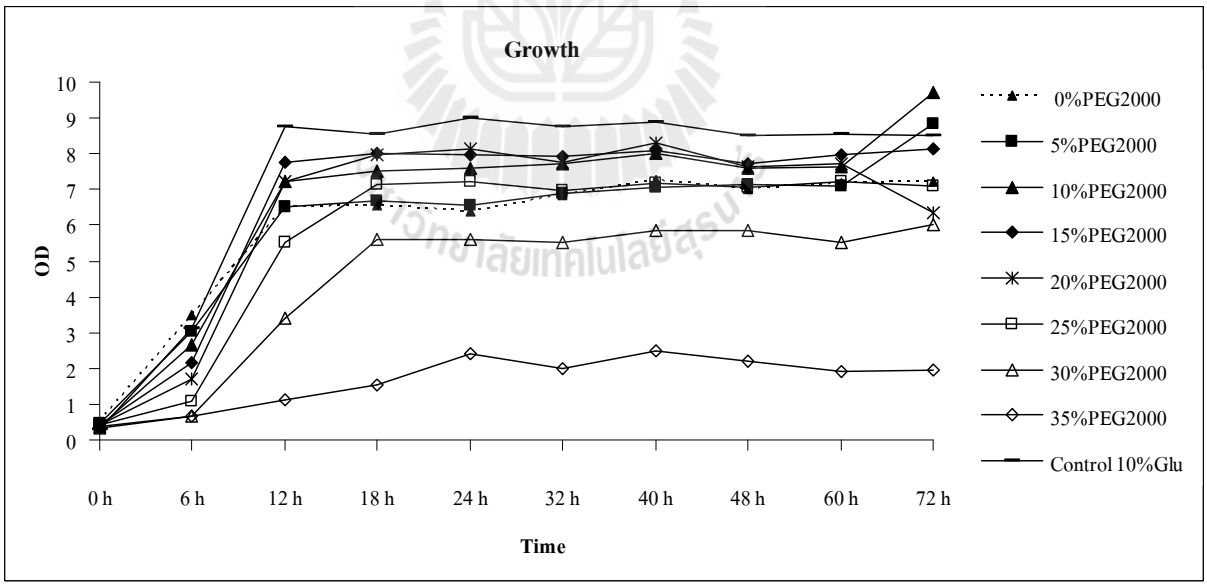
PEG4000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่ามากเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติมPEG โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (basal medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 10%) ที่ความเข้มข้น 30-35% ให้ค่าการเจริญที่ต่ำกว่าชุดที่ไม่เติม PEG ดังแสดงในรูปที่ 33

PEG6000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-20% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่าเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติม PEG โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (basal medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 10%) ที่ความเข้มข้น 25-35% ให้ค่าการเจริญที่ต่ำกว่าชุดที่ไม่เติม PEG ดังแสดงในรูปที่ 34

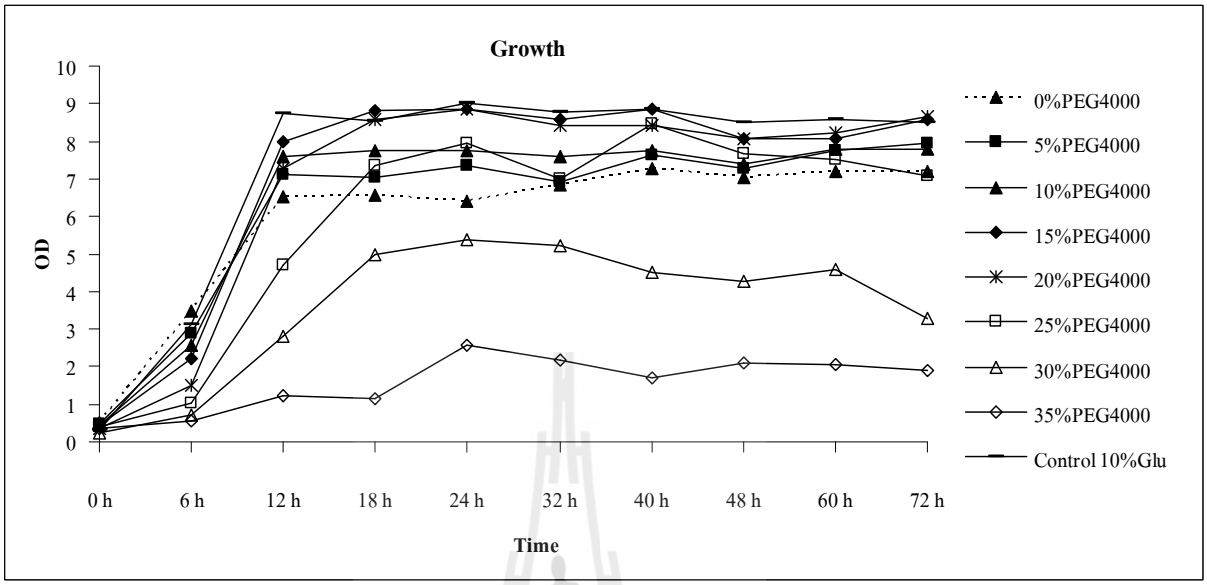
จากปริมาณความเข้มข้นของ PEG ที่สูง จะทำให้สารละลายที่ได้จากการผลิตน้ำตาล reducing มีความหนืดที่มาก ถึงแม้ว่าจะให้ค่าปริมาณน้ำตาล reducing ที่สูงกว่าที่ไม่เติม แต่การเจริญของยีสต์กลับน้อยกว่าชุดที่ไม่มีการเติม PEG เนื่องจากความหนืดมีผลต่อการผสม และการกวนเป็นเนื้อเดียวกันของสารละลาย



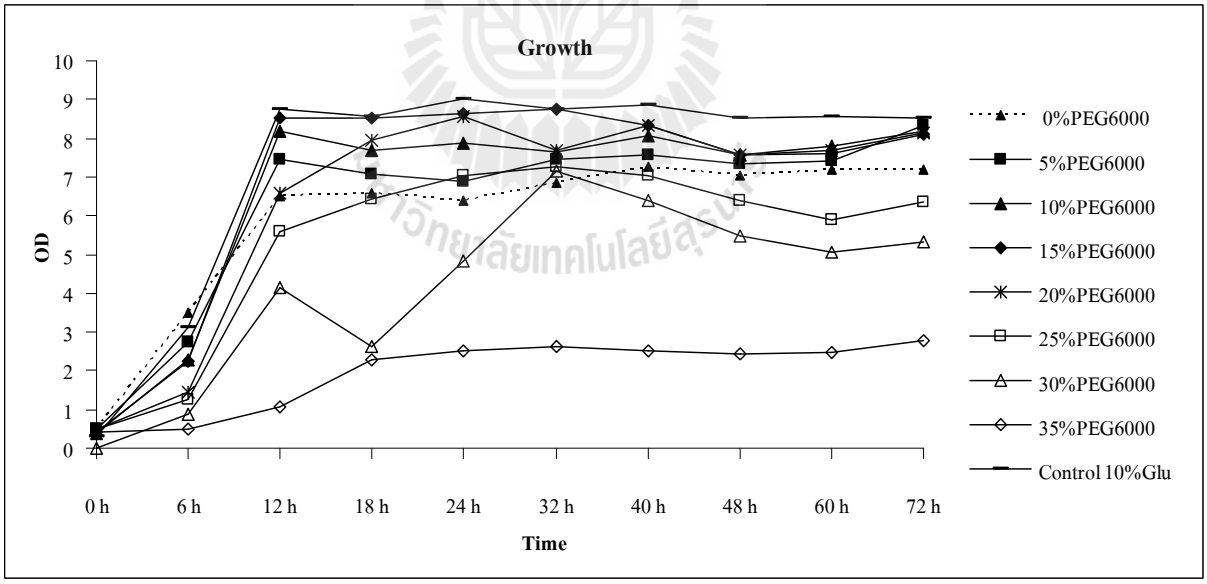
รูปที่ 31 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



รูปที่ 32 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



รูปที่ 33 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



รูปที่ 34 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%

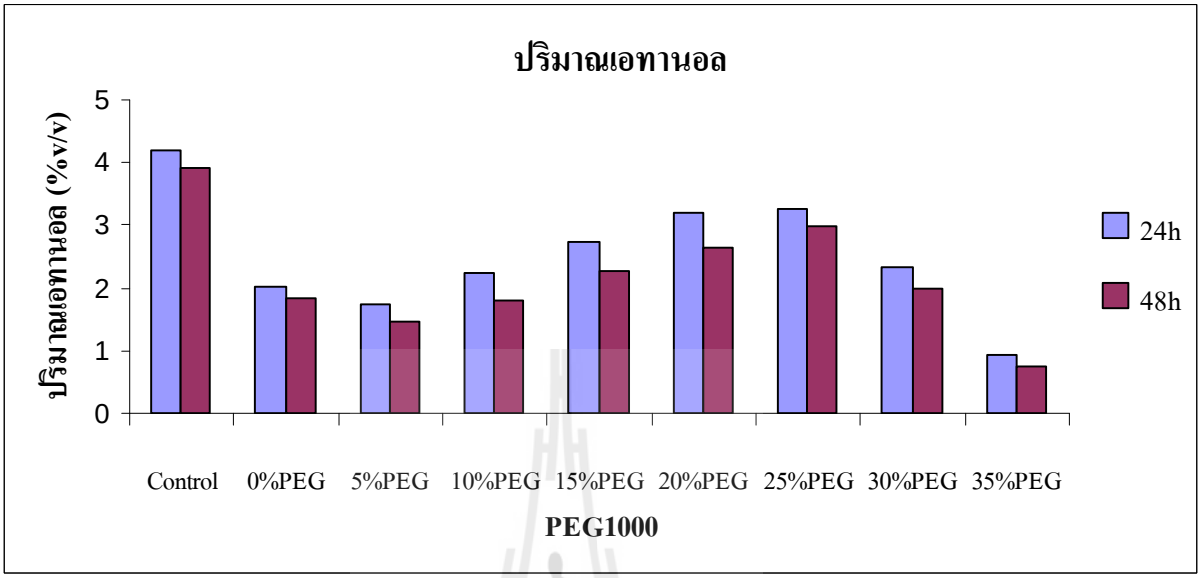
4.4.8 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar และปริมาณ reducing sugar ที่เหลือจากการผลิตเอทานอล จากชนิด และปริมาณของ PEG

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ พบว่า PEG1000 ความเข้มข้น 15-25% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมัก พบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่าการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ในทุกความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 35 และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-20% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 25-35% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 39

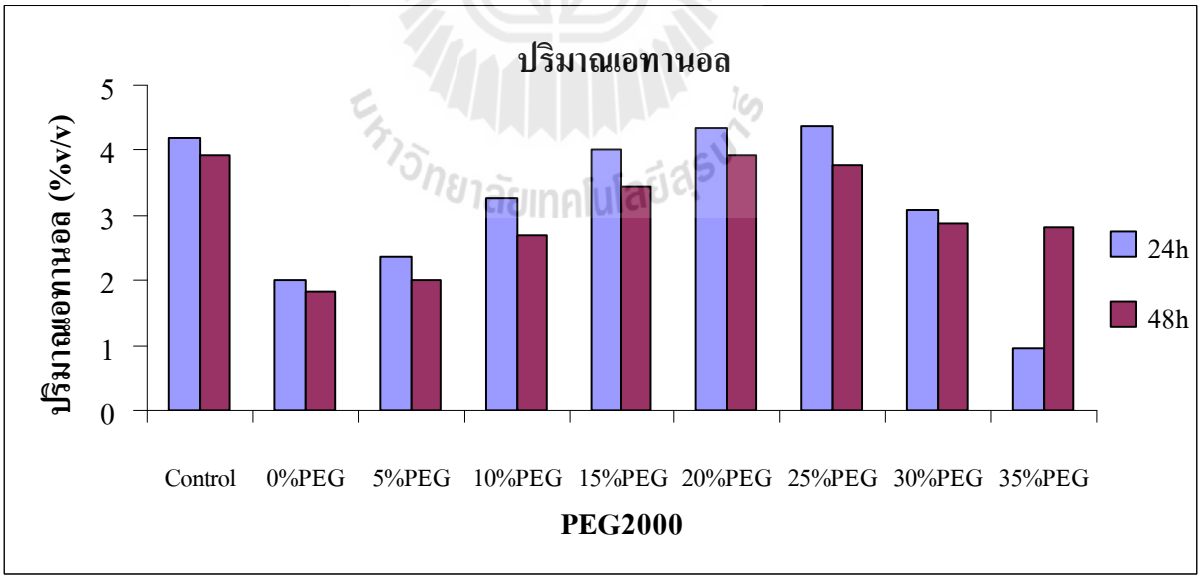
PEG2000 พบว่า ความเข้มข้น 15-25% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมัก พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-30% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้น 35% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 36 และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-15% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 20-35% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 40

PEG4000 พบว่า ความเข้มข้น 15-20% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมัก พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-5% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้น 10-35% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 37 และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-10% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 15-35% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 41

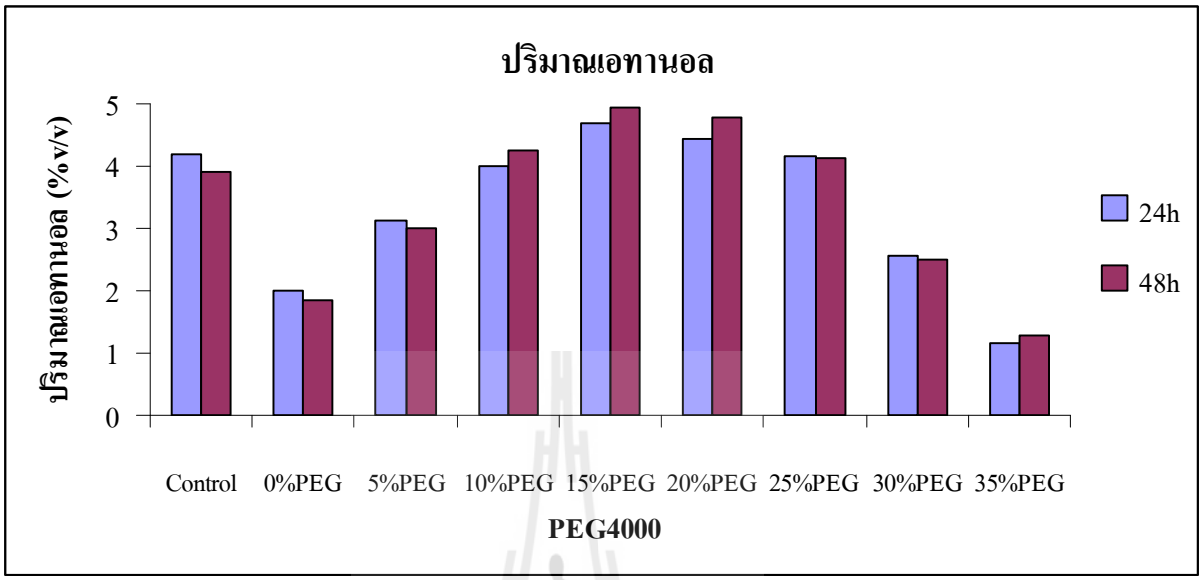
PEG6000 พบว่า ความเข้มข้น 15-20% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูง และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมัก พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-5% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนความเข้มข้น 10-35% ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 38 และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-10% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 15-35% ยีสต์ใช้น้ำตาล reducing หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 42



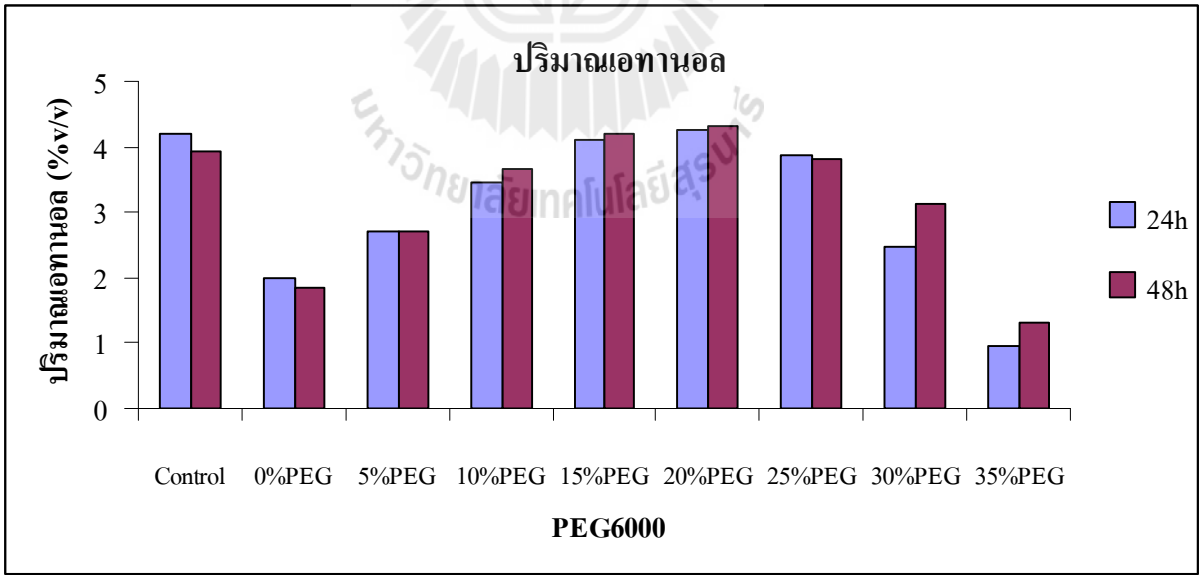
รูปที่ 35 แสดงปริมาณเอทานอล (%v/v) ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



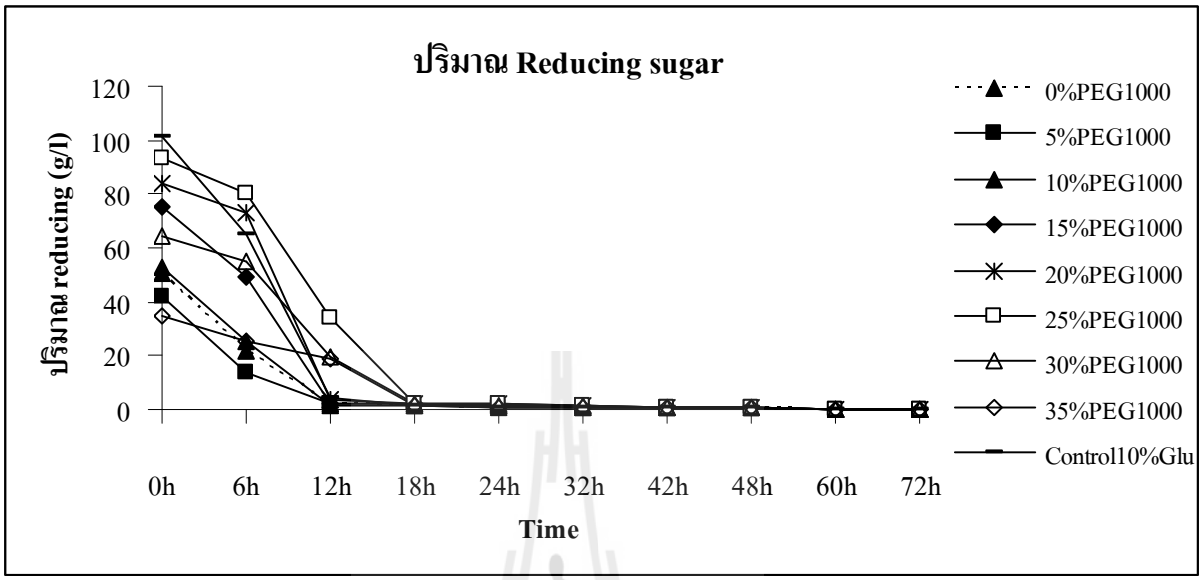
รูปที่ 36 แสดงปริมาณเอทานอล (%v/v) ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



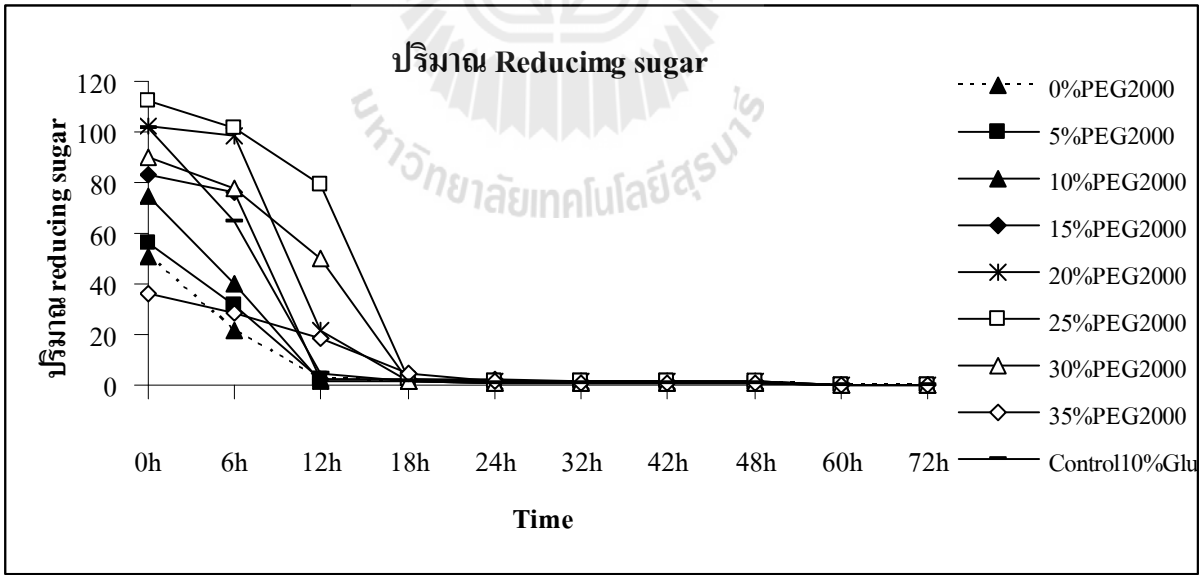
รูปที่ 37 แสดงปริมาณเอทานอล (%v/v) ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



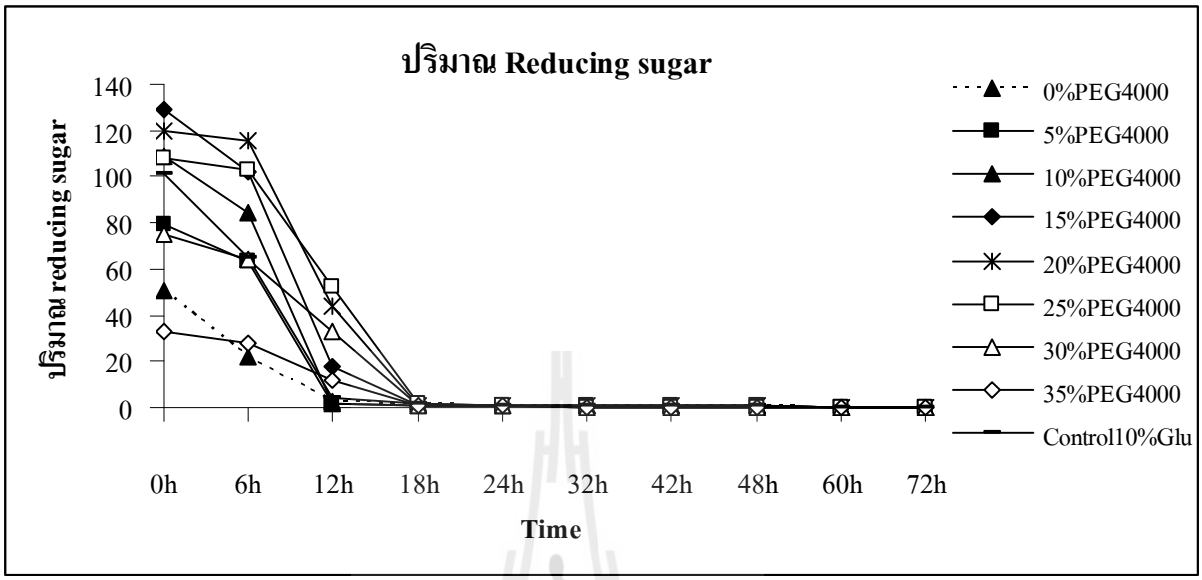
รูปที่ 38 แสดงปริมาณเอทานอล (%v/v) ที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



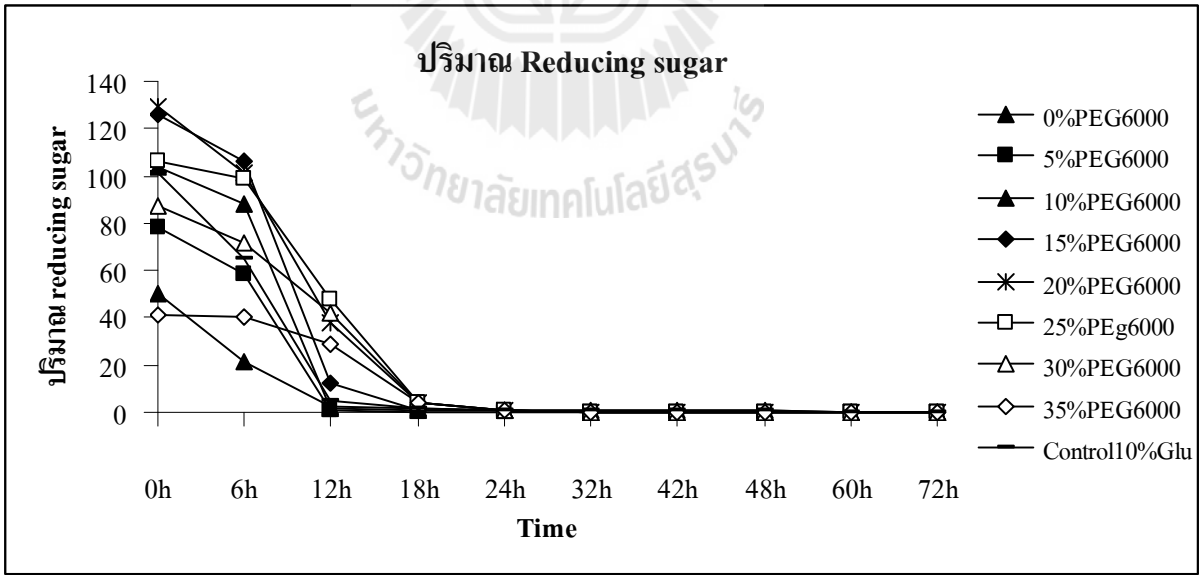
รูปที่ 39 แสดงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG1000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



รูปที่ 40 แสดงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG2000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



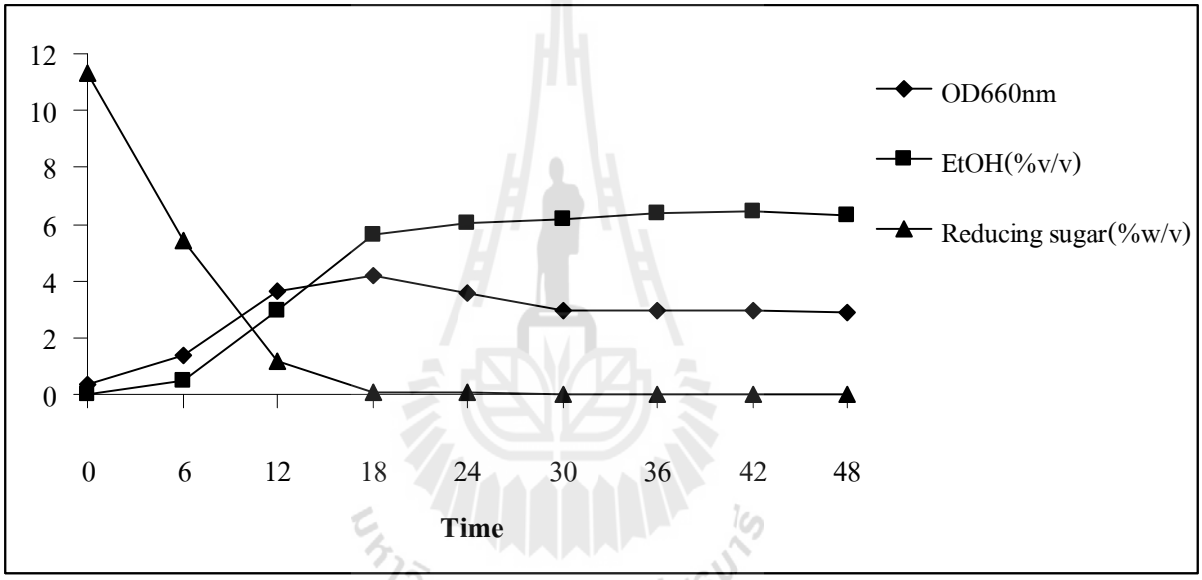
รูปที่ 41 แสดงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%



รูปที่ 42 แสดงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0%

4.5 การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอล จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร

ผลของการเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันที่เติม 15% w/v PEG 4000 แสดงดังในรูปที่ 43 พบว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 เจริญอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ ช่วง stationary หลังจากชั่วโมงที่ 12 ส่วนการผลิตเอทานอลจะเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 18 เนื่องจากขาดน้ำตาล โดยได้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารสูงสุดอยู่ที่ 6.55 % v/v



รูปที่ 43 แสดงการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 (—◆—), ปริมาณเอทานอล %v/v(—■—) และน้ำตาล reducing %w/v (—▲—) ในสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จาก PEG4000 ที่ความเข้มข้น 15%

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณกากมันที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล reducing เพื่อให้ได้ค่า %Yield ที่สูงที่สุด คือ 16% และจากการศึกษาผลของโคเอนไซม์ และ pH ต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ พบว่า 2 mM $CaCl_2$ มีผลช่วยการทำงานของเอนไซม์ โดย 2mM $CaCl_2$ ที่เตรียมในน้ำ มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Amylase ส่วน 2mM $CaCl_2$ ที่เตรียมใน acetate buffer pH 5.0 มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Amyloglucosidase เล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Termamyl และAmylase เมื่อเทียบกับน้ำ ส่วน acetate buffer pH 5.0 ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และAmylase

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเติม 2mM $CaCl_2$ และไม่เติม 2mM $CaCl_2$ ต่อ ประสิทธิภาพ ในการทำงานของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ พบว่า 2mM $CaCl_2$ มี ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพ ในการผลิต reducing sugar ของเอนไซม์ Xylanase, Hemicellulase, Cellulase และ Pullulanase โดยเมื่อเปรียบเทียบการไม่เติม2mM $CaCl_2$ และเติม2mM $CaCl_2$ เมื่อย่อยจนครบ 9 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ Pullulanase ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด โดยเมื่อไม่เติม 2mM $CaCl_2$ จะให้ค่าน้ำตาล reducing 109.892 g/l และเมื่อมีการเติม 2mM $CaCl_2$ สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาล reducing ได้ถึง 131.546 g/l

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ Xylanase, Cellulase และ Pullulanase สูตรเดี่ยว และสูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase พบว่าเอนไซม์ Cellulase, Pullulanase และCellulase:Pullulanase ให้ปริมาณน้ำตาล reducig ที่สูง คือ 109.130, 109.343 และ106.075 g/l ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Cellulase และCellulase + Pullulanase โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Amyloglucosidase แบบขั้นตอนเดียว และแบบสองขั้นตอน พบว่าเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จนครบ 6 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาล reducing ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยเอนไซม์ Cellulase และ Cellulase + Pullulanase ที่เติมเอนไซม์แบบสองขั้นตอน ให้ปริมาณน้ำตาล reducing 94.237 และ98.910 g/l ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเอนไซม์แบบขั้นตอนเดียวของเอนไซม์ Cellulase และCellulase + Pullulanase ให้ปริมาณน้ำตาล reducing 93.285 และ99.775 g/l ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของ PEG และ DMSO พบว่ามีผลต่อการทำงานของ เอนไซม์ Cellulase:Pullulanase:Amyloglucosidase โดยสามารถเพิ่มปริมาณของน้ำตาล reducingได้ดี เมื่อเทียบกับไม่มีการเติม PEG และDMSO และเมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PEG400, PEG600, PEG2000, PEG4000, PEG6000 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% พบว่า PEG ทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 2.5-10.0% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง แต่เมื่อศึกษาผลของ DMSO ต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ พบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5-5.0% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม และมีการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วน DMSO ที่ความเข้มข้น 7.5-10.0% พบว่ามีผลต่อเซลล์เล็กน้อย ทำให้มีการเจริญที่ช้า โดยมีค่าการเจริญสูงที่สุดที่เวลา 40-48 ชั่วโมง และการเจริญของเซลล์น้อยเมื่อเทียบกับไม่มีการเติม DMSO และเมื่อนำ PEG และDMSO เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญของยีสต์ พบว่ายีสต์ไม่สามารถนำสารทั้งสองชนิดไปใช้ได้

จากการศึกษาถึงชนิด และปริมาณ PEG มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing โดยศึกษาใน PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0-60% พบว่า PEG200 และ PEG400 ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing และยังให้ปริมาณน้ำตาล reducing ต่ำกว่าชุดที่ไม่มีการเติม PEG ส่วน PEG600 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ได้เล็กน้อย โดยที่ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด คือ 78.971 g/l ส่วน PEG1000, PEG2000 PEG4000 และ PEG6000 พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาล reducing ที่สูงมาก โดย PEG1000 ที่ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด คือ 139.942 g/l ส่วน PEG2000 ที่ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด คือ 143.097 g/l ส่วน PEG4000 ที่ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด คือ 141.970 g/l และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณน้ำตาล reducing สูงที่สุด คือ 135.759 g/l

จากการศึกษาการเจริญของยีสต์ ในอาหารสูตร basal medium ที่เติมสารละลายที่ได้จากการผลิต reducing sugar จากชนิด และปริมาณของ PEG พบว่า ชุดPEG1000 ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกับชุดที่ไม่เติม PEG โดยที่ความเข้มข้น 20% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ส่วน ชุด PEG2000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่าชุดที่ไม่เติม PEG โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ส่วน ชุดPEG4000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-25% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่ามากเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติม PEG โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (basal medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 10%) และชุดPEG6000 พบว่า ที่ความเข้มข้น 5-20% ให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงกว่าเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่เติม PEG

โดยที่ความเข้มข้น 15% จะให้ค่าการเจริญของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด โดยให้ค่าการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม (basal medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 10%)

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ พบว่า เมื่อใช้ PEG1000 ความเข้มข้น 25% ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 3.263 %v/v ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง

ชุดPEG2000 พบว่า ความเข้มข้น 25% ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 4.359 %v/v ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง

ชุดPEG4000 พบว่า ความเข้มข้น 15% ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 4.925 %v/v ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง

ชุดPEG6000 พบว่า ความเข้มข้น 20% ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 4.326 %v/v ที่เวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาถึงปริมาณน้ำตาล reducing ที่ถูกใช้ไป พบว่า หมดที่เวลา 18 ชั่วโมง

จากการศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอล จากยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร สามารถสรุปผลของการเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* L3109 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันที่เติม 15% w/v PEG 4000 พบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* L3109 เจริญอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ ช่วง stationary หลังจากชั่วโมงที่ 12 ส่วนการผลิตเอทานอลจะเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 18 เนื่องจากขาดน้ำตาล โดยได้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารสูงสุดอยู่ที่ 6.55 % v/v

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ้างอิง

กนกอร อินทราพิเชฐ. (2547). Food Analysis Laboratory Manual. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2555. www.oae.go.th/download/journal/trends2555.pdf

Aldaeus, Fredrik; Schweinebarth, Hannah: Torngren, Per; Jacobs, Anna. (2010). Simplified determination of total lignin content in kraft lignin samples and black liquors. Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of wood. Vol. 65 (4)

George J. Ritter. (1929). Determination of Alpha-Cellulose. Industrial and Engineering Chemistry. Analytical edition. Vol.1, No 1

Kadar, Zs., Zs. Szengyel and K. Reczey. (2004). Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Industrial Wastes for the Production of Ethanol. Industrial Crops andProducts**,** Vol 20, 103-110.

Kobagashi, F., Sawada, T., Nakamura, Y., Ohnaga, M., godliving, M. and Ushiysma, T. (1998). Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of steam-exploded potato. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol 69, 177-189.

P. Bernfield. (1995). Amylase, alpha and beta. Methods of Enzymol Vol 1, 149-158.

R. Hoover and W.S. Ratnayake. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. (2001). E2.3.1-E2.3.5

R.L. Mitchell and Geo. J.Ritter. (1940). Composition of Hemicellulose Isolated from Maple Wood. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 62

Rosenblitt, A. (1999). Analysis of growth and pigment productionof *Monascus purpureus* on solid substrate fermentation (in Spanish). M.S. Thesis, Department of Chemical and BioprocessEngineering, Catholic University of Chile, Santiago

Shimoda, M., Takashita, H., Omori, N., Wada, H. (1997). Shortening of shuchu-kogi production time using barley steeped in a restricted amount of water containing citric acid. Journal of fermentation and Bioengineering. Vol 83, 496-498.

Smith, I.A., and Cazalet, J.S. (1987). Estimation of sugars loss in stored high-grade molasses. Proceeding of the South African Sugar Techologists' Association.

Sun, J.X., X.F. Su n , H. Zhao, R.C. Sun. (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polym. Degrad. Stab., Vol 84, 331-339.

Szczodrak J, Targonski Z. (1988). Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. Biotechnol Bioeng Vol 31, 300-303.

United states sugar corporation. Molasses composition. Available online (accessed February 2007) http://www.suga-like.com/molasses/composition.html

Win, S.S., Impoolsup, A., and Noomhorm, A. (1996). Growth kinetics of *Saccharomyces cereviviece* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrub from cassava starch. Journal of Indrustrial Microbiology. Vol 16, 117-123.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก
การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์

ตารางที่ ก1 แสดงปริมาณ reducing sugar และ %Yield ที่ได้จากการย่อยกากมัน โดยเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

น้ำหนักกากมันแห้ง (g) / 100 ml	**Termamyl + AMG**		**H_2O (control)**	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	**% Yield**	**ปริมาณ reducing sugar (g/l)**	**% Yield**
4	24.116	60.290	0.030	0.075
8	47.287	59.109	0.351	0.438
12	64.840	54.033	0.669	0.557
16	90.771	56.732	1.044	0.653
20	96.713	48.356	1.897	0.948
24	100.367	41.820	2.014	0.839

ตารางที่ ก2 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อย 0.1% amylopectin โดยเอนไซม์ Termamyl, Amyloglucosidase และ Amylase

Solution	**ปริมาณ Reducing sugar (g/l)**		
	Termamyl	**AMG**	**300L**
H_2O	11.956	20.829	21.177
2mM $CaCl_2$ in H_2O pH 6.28	12.743	22.359	20.343
Acetate buffer pH 5.0	11.284	19.972	20.876
2mM $CaCl_2$ in acetate buffer pH 5.0	11.330	21.084	20.621

ตารางที่ ก3 แสดงปริมาณ reducing sugar และ %Yield ที่ได้จากการเปรียบเทียบผลของ $CaCl_2$ ต่อการย่อยกากมันปริมาณ 16% โดยเอนไซม์ Xylanase Hemicellulase Cellulase Pullulanse และทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

ชุดการทดลอง	**กากมันดิบแห้ง 16%**			
	H_2O(กลุ่ม1)		**H_2O + 2mM $CaCl_2$(กลุ่ม2)**	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	**% Yield**	**ปริมาณ reducing sugar (g/l)**	**% Yield**
3h				
Control	0.739	0.462	1.530	0.956
A	1.530	0.956	1.530	0.956
B	2.473	1.546	1.870	1.169
C	0.389	0.243	0.956	0.597
D	65.046	40.654	69.534	43.459
E	15.727	9.829	20.574	12.858
6h				
Control	1.598	0.999	1.870	1.169
A	58.951	36.882	58.951	36.882
B	59.044	36.903	65.461	40.913
C	62.031	38.769	64.942	40.589
D	80.647	50.405	82.398	51.499
E	69.186	43.241	71.176	44.485
9h				
Control	1.253	0.783	2.240	1.400
A	101.517	63.448	101.517	63.448
B	104.890	65.556	124.688	77.930
C	104.890	65.556	119.181	74.488
D	106.649	66.555	114.090	71.306
E	109.892	68.682	131.546	82.216

ตารางที่ ก4 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม และเติม $CaCl_2$ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์ Termamyl และ Amyloglucosidase ตามลำดับ

ชุดการทดลอง	**กากมันดิบแห้ง 16%**	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	**% Yield**
3h		
Control	1.268	0.793
A	1.530	0.956
B	1.137	0.710
C	63.943	39.964
D	15.666	9.791
E	61.172	38.233
F	22.558	14.099
G	77.513	48.446
H	73.037	45.648
6h		
Control	1.790	1.119
A	58.951	36.882
B	50.586	31.161
C	78.863	49.290
D	67.211	42.007
E	82.345	51.465
F	70.764	44.227
G	88.526	55.329
H	87.673	54.796

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ก4 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
9h		
Control	1.780	1.112
A	101.517	63.448
B	104.227	65.142
C	109.130	68.206
D	109.343	68.339
E	99.538	62.211
F	93.357	58.348
G	104.156	65.098
H	106.075	66.297

ตารางที่ ก5 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการย่อยกากมันปริมาณ16% โดยเอนไซม์สูตรเดี่ยว และเอนไซม์สูตรผสม โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์Amyloglucosidase

Enzyme	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
3h		
Control	1.402	0.876
A	56.334	35.209
B	71.391	44.620
C	86.708	54.193
D	97.265	60.791
E	99.948	62.468

ตารางที่ ก5 (ต่อ)

Enzyme	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
6h		
Control	1.488	0.930
A	94.237	58.898
B	98.910	61.819
C	87.883	54.896
D	93.285	58.303
E	99.775	62.359

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

การทดสอบการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังดิบแห้งโดยใช้เอนไซม์ และสารช่วยทำละลาย

ตารางที่ ข1 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5% และ 10.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

Sample	**กากมันดิบแห้ง 16%**	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	**% Yield**
Control		
H_2O	0.096	0.602
2.5%DMSO	1.308	0.818
5.0%DMSO	1.531	0.957
7.5%DMSO	1.436	0.898
10%DMSO	1.091	0.682
2.5%PEG	1.222	0.764
5.0%PEG	1.586	0.992
7.5%PEG	1.261	0.788
10%PEG	1.358	0.849
Sample 3h		
H_2O	76.468	47.793
2.5%DMSO	107.083	66.927
5.0%DMSO	104.578	65.361
7.5%DMSO	87.670	54.794
10%DMSO	93.028	58.143
2.5%PEG	106.109	66.318
5.0%PEG	108.196	67.623
7.5%PEG	83.913	52.446
10%PEG	78.416	49.010

ตารางที่ ข1 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
Sample 6h		
H_2O	95.881	59.926
2.5%DMSO	100.682	62.926
5.0%DMSO	107.362	67.101
7.5%DMSO	94.698	59.186
10%DMSO	83.287	52.054
2.5%PEG	108.475	67.797
5.0%PEG	106.874	66.797
7.5%PEG	77.372	48.358
10%PEG	93.932	58.708

ตารางที่ ข2 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG400, PEG600, PEG2000 และ PEG4000 ที่ความเข้มข้น 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 12.5% และ 15.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG400	24.415	15.260
2.5%PEG400	18.363	11.477
5.0%PEG400	13.849	8.656
7.5%PEG400	12.926	8.079
10.0%PEG400	13.514	8.463
12.5%PEG400	13.336	8.335
15.0%PEG400	13.439	8.399

ตารางที่ ข2 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG600	24.415	15.260
2.5%PEG600	20.722	12.951
5.0%PEG600	20.107	12.567
7.5%PEG600	21.645	13.528
10.0%PEG600	23.492	14.682
12.5%PEG600	25.441	15.901
15.0%PEG600	29.955	18.722
0%PEG2000	24.415	15.260
2.5%PEG2000	26.159	16.350
5.0%PEG2000	29.545	18.465
7.5%PEG2000	39.290	24.556
10.0%PEG2000	43.701	27.313
12.5%PEG2000	50.547	31.609
15.0%PEG2000	55.601	34.751
0%PEG4000	24.415	15.260
2.5%PEG4000	32.007	20.004
5.0%PEG4000	37.546	23.466
7.5%PEG4000	44.214	27.634
10.0%PEG4000	49.651	31.032
12.5%PEG4000	52.524	32.827
15.0%PEG4000	55.499	34.687

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข3 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% และ 60% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

Sample	**กากมันดิบแห้ง 16%**	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	**% Yield**
0%PEG200	57.897	36.186
10%PEG200	26.822	16.764
20%PEG200	14.286	8.929
30%PEG200	8.163	5.102
40%PEG200	4.373	2.733
50%PEG200	3.207	2.004
60%PEG200	2.915	1.822
0%PEG400	57.897	36.186
10%PEG400	29.725	18.578
20%PEG400	37.045	23.153
30%PEG400	28.394	17.746
40%PEG400	9.317	5.823
50%PEG400	2.884	1.802
60%PEG400	1.553	0.970
0%PEG600	57.897	36.186
10%PEG600	57.897	36.186
20%PEG600	78.971	49.357
30%PEG600	70.098	43.811
40%PEG600	23.957	14.973
50%PEG600	3.993	2.496
60%PEG600	2.662	1.664

ตารางที่ ข3 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG1000	57.897	36.186
10%PEG1000	90.087	56.305
20%PEG1000	139.942	87.464
30%PEG1000	87.884	54.902
40%PEG1000	13.994	8.746
50%PEG1000	4.665	2.951
60%PEG1000	3.499	2.187
0%PEG2000	57.897	36.186
10%PEG2000	103.150	64.469
20%PEG2000	143.079	89.424
30%PEG2000	97.161	60.725
40%PEG2000	10.870	6.793
50%PEG2000	6.744	4.215
60%PEG2000	5.679	3.549
0%PEG4000	57.897	36.186
10%PEG4000	119.565	74.728
20%PEG4000	141.970	88.731
30%PEG4000	92.724	57.953
40%PEG4000	12.866	8.041
50%PEG4000	7.276	4.547
60%PEG4000	5.590	3.494

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข3 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG6000	57.897	36.186
10%PEG6000	120.896	75.560
20%PEG6000	135.759	84.849
30%PEG6000	92.502	57.814
40%PEG6000	11.535	7.209
50%PEG6000	6.921	4.326
60%PEG6000	5.146	3.217

ตารางที่ ข4 แสดงปริมาณ reducing sugar และ%Yield ที่ได้จากการเติม PEG200, PEG400, PEG600, PEG1000, PEG2000, PEG4000 และ PEG6000 ที่ความเข้มข้น 0%, 5.0%, 10.0%, 15.0%, 20.0%, 25.0%, 30.0% และ 35.0% ตามลำดับ โดยทำงานร่วมกับเอนไซม์สูตรผสม

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG200	50.110	31.319
5%PEG200	27.846	17.404
10%PEG200	17.967	11.229
15%PEG200	12.460	7.787
20%PEG200	9.321	5.826
25%PEG200	4.602	2.877
30%PEG200	4.373	2.733
35%PEG200	3.596	2.247

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข4 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG400	50.110	31.319
5%PEG400	29.776	18.610
10%PEG400	26.538	16.587
15%PEG400	27.754	17.346
20%PEG400	29.431	18.394
25%PEG400	28.775	17.984
30%PEG400	25.766	16.104
35%PEG400	17.154	10.721
0%PEG600	50.110	31.319
5%PEG600	37.861	23.663
10%PEG600	38.753	24.220
15%PEG600	47.389	29.618
20%PEG600	56.484	35.302
25%PEG600	60.976	38.110
30%PEG600	54.477	34.048
35%PEG600	34.918	21.824
0%PEG1000	50.110	31.319
5%PEG1000	51.495	32.184
10%PEG1000	57.396	35.873
15%PEG1000	78.411	49.007
20%PEG1000	94.884	59.303
25%PEG1000	94.091	58.807
30%PEG1000	73.456	45.910
35%PEG1000	33.987	21.242

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข4 (ต่อ)

Sample	กากมันดิบแห้ง 16%	
	ปริมาณ reducing sugar (g/l)	% Yield
0%PEG2000	50.110	31.319
5%PEG2000	60.653	37.908
10%PEG2000	90.052	56.283
15%PEG2000	117.344	73.340
20%PEG2000	125.995	78.747
25%PEG2000	123.222	77.013
30%PEG2000	90.453	56.533
35%PEG2000	36.131	22.582
0%PEG4000	50.110	31.319
5%PEG4000	82.128	51.330
10%PEG4000	107.195	66.997
15%PEG4000	130.596	81.622
20%PEG4000	127.453	79.658
25%PEG4000	120.492	75.308
30%PEG4000	84.134	52.584
35%PEG4000	44.580	27.863
0%PEG6000	50.110	31.319
5%PEG6000	82.593	51.620
10%PEG6000	116.568	72.855
15%PEG6000	121.209	75.755
20%PEG6000	123.439	77.149
25%PEG6000	122.089	76.305
30%PEG6000	85.301	53.313
35%PEG6000	54.973	34.358

ประวัติผู้แต่ง

Name: Chokchai Wanapu (Intapruk)

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Home Address: 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Assistant Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience :

From 1978 – 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 – 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Scientific Experients:

Plant and microbial molecular genetics.

Fermentation Techniques

Biopolymers

Symposium:

Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd. N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of maolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.

Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin,C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing β-glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.

Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with Leucaena chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.

Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.

Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.

Wanapu, C., Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.

Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on "Corporate sustainablility management – approaches and applications" 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.

Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.

Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.

Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C**. Arendt, E. K., Kreisz, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ- Congress. Pattaya, April 2009.

Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C**. and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.

Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010). Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2010). FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Li, L., **Wanapu, C**., Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010). Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010). Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C**. (2012). Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Satsum, A, and **Wanapu, C**. (2012). FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C**. (2012). Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C**. (2012). High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C**. (2012).Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C**. (2012). Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.

Intapruk, C., Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M. (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

Intapruk, C., Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M. (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

Intapruk, C., Takano, M. and Shinmyo, A. (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

Wanapu, C. and Shinmyo, A. (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Kanchanatawee, S., **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of β-glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.

Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.,** Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2009) The influences of steeping duration and temperature on the α- and β- amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.

Teaumroong, N., **Wanapu, C**., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). Microbs at work: from wastes to resources. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.

Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E., Back, W., **Wanapu, C.,** Arendt, E.K., Kreisz, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011) Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). J. Inst. Brew. 117(1), 39–46.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.** (2011) The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aqua. Nut., 17(6), 685-694.

Li L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011) Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. J Agri. Sc. 3(3), 101-110.

Boonterm, C., **Wanapu, C**., Silapapun, A. and Boonkerd, N. (2011) Effects of nitrogen, potassium fertilized, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. Suranaree J. Sci. Technol. 18(1), 41-54.

Li, L., Huang, X., **Wanapu, C**., Li, Q., Huang, G. and Huang, T. (2011) Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. Guizhou Agri. Sc. 11, 1-4 (in Chinese).

Wanapu, C., Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012) Selection of yeast strains β-glucosidase for improving wine aroma. J. Agri. Sc. Technol. B, 2, 691-702.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Beer production from rice mait based in pilot-scale: volatile compounds and sensorial properties analysis. The Journal of King Mongkut's University of Technology. 3(1), 86-94.

Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.** (2012) Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. Af. J. Biotech. 11(42), 9941-9949.

Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.** (2012) Growth performance and resistance to Streptococcus iniae of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemted with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183-198.

Patents: 5 Thai patents and 3 Trade Secrets.

Current Research Works:

1. The Bioprocess Control of Microbial Alginates for Industrial Production.
2. Composition of Biopolymer and Filmogenics.
3. Improvement of Bioethanol Production by Using Thermotolerant Yeasts and Bioconversion.
4. Thai Rice Beer Production.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี