1.6.3 นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ในอัตราส่วนการผสมระหว่างเปลือกมันสำปะหลังกับกากมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตเอทานอล ทำการวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากการหมัก และปริมาณเอทานอลด้วย

1.6.4 ศึกษาค่าใช้จ่ายจากการนำเปลือกและกากมันสำปะหลังผลิตเป็นเอทานอล

**1.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ**

| กิจกรรม | เดือนที่ 1-3 | 4-6 | 7-9 | 10-12 |
|---|---|---|---|---|
| 1. เตรียมอุปกรณ์ | —— | | | |
| 2. ศึกษาการเตรียมเปลือกและกากมันสำปะหลัง | ——— | | | |
| 3. ศึกษาการไฮโดรไลซีสแป้งและเซลลูโลสในเปลือกและกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ | —— | —— | | |
| 4. ศึกษาการกระบวนการหมักเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerivisiae* | | —— | —— | —— |
| 5. ศึกษาค่าใช้จ่าย | | | | —— |
| 6. จัดทำรายงายฉบับสมบูรณ์ | | | | —— |

## 2. วิธีดำเนินงานวิจัย

### 2.1 วัตถุดิบและเอ็นไซม์

#### 2.1.1 วัตถุดิบ

เปลือกและกากมันสำปะหลังที่ในการทดลองได้มาจากโรงงานชลเจริญ 213 ถนนบ้านบึง-หนองซาก อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี โดยที่นำเปลือกและกากมันสำปะหลังสด มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเก็บรักษาเปลือกและกากมันสำปะหลังสำหรับไว้ใช้ในการทดลองต่อไป เปลือกและกากมันสำปะหลังที่อบแห้งแล้วนำมาบดให้มีขนาด 25 ไมครอน ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

ก) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกและกากมันสำปะหลัง

วิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกและกากมันสำปะหลัง และเปลือกมันสำปะหลังผสมในกากมันสำปะหลัง ดังต่อไปนี้ ความชื้น แป้ง และเซลลูโลส ตามวิธี AOAC (1990)

ข) การเตรียมเปลือกและกากมันสำปะหลังก่อนย่อยด้วยเอนไซม์

ศึกษาวิธีการย่อยเปลือกมันสำปะหลังเมื่อผสมในกากมันสำปะหลังในอัตราความเข้มข้นของตัวอย่างที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** อัตราส่วนของเปลือกมันสำปะหลังต่อกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษา

| อัตราส่วนที่ใช้ผสม (เปลือกมันสำปะหลัง : กากมันสำปะหลัง) | น้ำหนัก (กรัมน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|
| 0:1 | 0 :10 |
| 1:1 | 5 :5 |
| 1:2 | 3.3 : 6.7 |
| 1:5 | 1.67 : 8.33 |

2.1.2 **เอนไซม์**

2.1.2.1 เอนไซม์เซลลูเลส ; Cellulase, E.C. 3.2.1.4 (Sigma-Aldrich, Inc, USA) ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1.44 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต ทำให้กิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล จากเซลลูโลสที่ค่าความเป็นกรด่าง 5.0 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส)

2..1.2.2 เอนไซม์แอฟาอะไมเลสทนความร้อน ; ∝-amylase, E.C. 3.2.1.1 (Sigma-Aldrich, Inc, USA) ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 31.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม(กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1 ยูนิต ทำให้เกิดน้ำตาลกูลโคส 1 ไมโครโมล ที่ค่าความเป็นกรด่าง 6.0 และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส)

2.1.2.3 เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ; Amylogkucosidase, E.C. 3.2.1.3 (Sigma-Aldrich, Inc, USA) ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus niger* ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลกลูคซิเดส 31.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (กิจกรรมของเอนไซม์อะไมโลกลูคซิเดส 1 ยูนิต ทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล จาก solube starch ที่ pH 6.0 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

**2.2 การศึกษาหาปริมาณเอนไซม์เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสและแป้ง**

**2.2.1 การศึกษาหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซีสเซลลูโลส**

ก) นำส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ร้อยละ 10 w/v ซึ่งใช้เป็นตัวแทนทุกอัตราส่วนในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังในตารางที่ 3.1 ซึ่งในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 แทนอัตราส่วนที่มีปริมาณของแป้งสูง และส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 1:1 แทนอัตราส่วนที่มีปริมาณของเซลลูโลสสูง นำตัวอย่างไปบรรจุลงในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิตร ทำการไฮโดรไลซีสส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ปริมาณเอนไซม์ 5 , 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 unit ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ข) ปั่นแยกส่วนใสและกากที่ได้การไฮโดรไลซีสในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ค) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (1959) หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาล ทำการทำลอง 3 ซ้ำ

ง) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

**2.2.2 การศึกษาหาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดสที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซีสแป้ง**

ก) นำส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ร้อยละ 10 w/v ซึ่งใช้เป็นตัวแทนทุกอัตราส่วนในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังในตารางที่ 3.1 โดยนำตัวอย่างบรรจุลงในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิตร เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ทำการไฮโดรไลซีสส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ด้วยเอนไซม์แอฟลาอะไมเลสที่ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ คือ 3, 6, 9, 12 และ 15 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง 6.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการไฮโดรซีสต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ คือ 2, 4, 6, 8 และ 10 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0 โมลาร์ นำไปไฮโดรไลซีสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง

ข) ปั่นแยกส่วนใสและกากที่ได้การไฮโดรไลซีสในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา15 นาที

ค) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (1959) หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาล ทำการทำลอง 3 ซ้ำ

ง) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

**2.3 การศึกษาการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสและแป้งในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์**

**2.3.1 การไฮโดรไลซีสเซลลูโลสในเปลือกและกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส**

ก) นำส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตรา 0:1, 1:1, 1:2 และ1:5 ในปริมาณร้อยละ10 (w/v) บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิตร ทำการไฮโดรไลซีสส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมตามหัวข้อ 3.7.1 คือปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 30 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ข) ปั่นแยกส่วนใสและกากที่ได้การไฮโดรไลซีสในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา15 นาที

ค) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (1959) หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาล ทำการทำลอง 3 ซ้ำ

ง) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

จ) นำส่วนกากของเปลือกและกากมันสำปะหลังไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งและเซลลูโลส หลังจากผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ตามวิธี AOAC (1990) และคำนวณหาปริมาณเซลลูโลสและแป้งที่ถูกใช้ไปในระหว่างการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์

**2.3.2 การไฮโดรไลซีสแป้งในเปลือกและกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส**

ก) นำส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตรา 0:1, 1:1, 1:2 และ1:5 ในปริมาณร้อยละ10 (w/v) บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิตร เติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ทำการไฮโดรไลซีสส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมตามหัวข้อ 2.6 คือปริมาณเอนไซม์แอฟลาอะไมเลส 9 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง (pH) 6.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการไฮโดรไลซีสต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคอะไมเลส 6 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง pH 4.0 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่าง ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0 โมลาร์ นำไปไฮโดรไลซีสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ข) ปั่นแยกส่วนใสและกากที่ได้การไฮโดรไลซีสในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ค) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (1959) หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาล ทำการทำลอง 3 ซ้ำ

ง) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

จ) นำส่วนกากของเปลือกและกากมันสำปะหลังไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งและเซลลูโลส หลังจากผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ตามวิธี AOAC (1990) และคำนวณหาปริมาณเซลลูโลสและแป้งที่ถูกใช้ไปในระหว่างการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

## 2.4 การไฮโดรไลซีสเซลลูโลสและแป้งในเปลือกและกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

ก) นำส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตรา 0:1, 1:1, 1:2 และ1:5 ในปริมาณร้อยละ10 (w/v) บรรจุในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิตร ทำการไฮโดรไลซีสส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมตามหัวข้อ3.4.1 และ 3.4.2 คือปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 30 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการไฮโดรไลซีสต่อด้วยเอนไซม์แอฟลาอะไมเลส 9 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 โดยปรับค่าความเป็นกรด ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และสุดท้ายนำสารละลายเปลือกและกากมันสำปะหลัง ทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 6 ยูนิต ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ปรับค่าความเป็นกรด ด่าง ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก 1.0 โมลาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง

ข) ปั่นแยกส่วนใสและกากที่ได้การไฮโดรไลซีสในส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 0:1 และ 1:1 ออกโดยใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา15 นาที

ค) นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS method (1959) หลอดแบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายน้ำตาล ทำการทำลอง 3 ซ้ำ

ง) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้

จ) นำส่วนกากของเปลือกและกากมันสำปะหลังไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งและเซลลูโลส หลังจากผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ตามวิธี AOAC (1990) และคำนวณหาปริมาณเซลลูโลสและแป้งที่ถูกใช้ไปในระหว่างการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์

## 2.5 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากเปลือกและกากมันสำปะหลัง

### 2.5.1 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5343 โดยนำเชื้อยีตส์จาก stock culture 1 ลูป นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อของยีตส์จากอาหารแข็ง 2-3 ลูป ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว YM broth จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหณภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 2.5.2 ขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์จากส่วนผสมของเปลือกและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วนผสมเปลือกต่อกากมันสำปะหลังที่ 0:1, 1:5, 1:2 และ 1:1 ที่ได้จากข้อ 2.8 ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ด้วยไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ และเติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.03 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ลงในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5343 ลงในอาหารเหลวร้อยละ 10 โดยปริมาตร ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชม. เป็นเวลา 5 วัน โดยตรวจวัดค่าเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล

## 2.6 การศึกษาต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอลจากเปลือกและกากมันสำปะหลัง

การนำปริมาณเอทานอลที่ได้จากการทดลองในข้อหัวข้อ 2.9 มาคิดค่าใช้จ่ายในการผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นแนวทางต้นทุนการผลิตในการศึกษาการผลิตเอทนอลต่อวัสดุเหลือใช้ประเภทอื่น ๆ