ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม — **สาขา**

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม — **ภาควิชา**

เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น

Enhancing Efficiency for Reducing Sugar Production from Cassava Bagasse by Pretreatment

นามผู้วิจัย นางสาวสิริวรรณ แก้วชิงดวง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ปิยาภรณ์ สมสมัคร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น

Enhancing Efficiency for Ethanol Production from Cassava Bagasse

โดย

นางสาวสิริวรรณ แก้วชิงดวง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิริวรรณ แก้วชิงดวง 2554: การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังโดยการบำบัดขั้นต้น ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ, Ph.D. 92 หน้า

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมผลิตแป้ง มีองค์ประกอบหลักเป็นแป้ง ซึ่งนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ การศึกษานี้แบ่งได้เป็นขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และกรด และขั้นตอนการหมักน้ำตาลรีดิวส์เพื่อผลิตเอทานอล ผลการศึกษาพบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้กรดฟอสฟอริก และการบำบัดที่อุณหภูมิ 120 ^{o}C เป็นเวลา 60 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ส่วนการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำที่อุณหภูมิ 125 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้เอนไซม์สามารถย่อยแป้งและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (45^{o}C นาน 72 ชั่วโมง) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (90^{o}C 2 ชั่วโมง) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (55^{o}C 24 ชั่วโมง) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 899.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เมื่อทำการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในสภาวะข้างต้นด้วยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae พบว่าการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการย่อยด้วยกรด โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 15.57 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ 5.11 กรัมต่อลิตร ดังนั้น การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำเป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้นและส่งเสริมการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังให้ได้ประสิทธิภาพมากขึ้น

_____ _____ __ / __ / __

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Siriwan Gaewchingduang 2011: Enhancing Efficiency for Reducing Sugar Production from Cassava Bagasse by Pretreatment. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Patthra Pengthamkeerati, Ph.D. 92 pages.

Cassava bagasse (CB) is one of major biomass wastes from starch processing industry, mainly containing starch. The objects of this study were to determine the optimal pretreatment conditions for maximizing reducing sugar production by enzyme and acid pretreatments, and to preliminarily use of pretreated CB for ethanol production. In this study, sulfuric acid had a greater capacity for hydrolyzing CB than phosphoric acid. Pretreating CB with sulfuric acid at 120^{o}C for 60 min gave a maximum reducing sugar yield. Pretreating CB with hydrothermal pretreatment at 125^{o}C for 30 min and hydrolyzing with cellulase (45^{o}C for 72 hr), alpha-amylase (90^{o}C for 2 hr), and glucoamylase (55^{o}C for 24 hr), gave a maximum reducing sugar yield of 899.11 mg/g CB. Fermenting the obtained reducing sugar solutions from the selected enzymatic or acid hydrolysis with yeast *Saccharomyces cerevisiae* revealed that reducing sugar from enzymatic hydrolysis gave a higher reducing sugar concentration (15.57 g/l) and ethanol yield (5.11 g/l) than that from acid hydrolysis. Hence, hydrothermally pretreating CB with enzymatic hydrolysis is an interesting method to accelerate enzyme-substrate interaction and enhances ethanol production efficiency.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยการช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา เพ่งธรรมกีรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและอาจารย์ ดร.ปิยาภรณ์ สมสมัคร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียนการค้นคว้าวิจัย และคำแนะนำด้านต่างๆ ที่เกี่ยวกับงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างรวมทั้งให้คำแนะนำต่างๆ ขอขอบพระคุณ Dr. Hiroyuki Inoue ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำวิจัยขณะทำวิจัย ณ The National Institute of Advance Industrial Science and Technology (AIST) ประเทศญี่ปุ่น

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รหัสโครงการ WII515S062 และความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป และขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการส่งเสริมการวิจัยร่วมแบบทวิภาคี (Bilateral Research Cooperation, BRC) ปี 2552 ในการทำวิจัยและแลกเปลี่ยนประสบการณ์ในประเทศญี่ปุ่น และบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนการเสนอผลงานวิชาการแบบปากเปล่าในหารประชุมระดับนานาชาติ ปี 2553

ขอขอบพระคุณบริษัท อี๊สต์ เอเชียติ๊ก (ประเทศไทย) จำกัน (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ทางการค้า และบริษัท โซนิช สตาร์ท เทคโนโลยี จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ให้ความอนุเคราะห์กากมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการศึกษา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ น้องชาย และญาติๆ ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ซึ่งมิได้เอ่ยนามในที่นี้ทุกๆ ท่าน

สิริวรรณ แก้วชิงดวง

กุมภาพันธ์ 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
สรุป	60
ข้อเสนอแนะ	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	75
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	76
ภาคผนวก ข ตารางข้อมูลผลการทดลอง	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติกากมันสำปะหลังสด	5
2	องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	6
3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีต่างๆ	18
4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ	23
5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยเส้นใยและเอนไซม์ย่อยแป้ง	52
6	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (ethanol yield) ในขั้นตอนการหมักสารละลายกากมันสำปะหลังด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	55
7	การเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลเบื้องต้นจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต่างๆ	57

ตารางผนวกที่

ก1	ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DNS	78
ก2	ตัวอย่างค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ	81
ข1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางซัลฟูริกหรือฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอเป็นเวลา 15 นาที	84
ข2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	85
ข3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	86
ข4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	87

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ 88

ข6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ 89

ข7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และทำการย่อยครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ 90

ข8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล จากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระยะเวลาการหมัก 0 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง 91

ข9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล จากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระยะเวลาการหมัก 0 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง 91

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปริมาณกากมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2546 ถึง 2553	4
2	โครงสร้างอะไมโลส	7
3	โครงสร้างอะไมโลเพกติน	8
4	โครงสร้างเซลลูโลส	9
5	กระบวนการเอมบ์เทน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas Pathways)	11
6	การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร	13
7	วิธีการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส	15
8	แผนผังขั้นตอนการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น	29
9	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง	37
10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ก) และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ข) ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	39
11	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	43
12	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	46
13	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลส	48
14	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	49

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลในขั้นตอนการหมักสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	54

ภาพผนวกที่

ก1	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS	79
ก2	ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเอทานอล	82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น

Enhancing Efficiency for Reducing Sugar Production from Cassava Bagasse by Pretreatment

คำนำ

พลังงานเป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ โดยเฉพาะในการคมนาคม รองลงมาคือการใช้พลังงานในภาคอุตสาหกรรมและภาคอื่นๆ ความต้องการพลังงานในปัจจุบันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในชณะที่เชื้อเพลิงฟอสซิลมีแต่ลดลง จึงทำให้เกิดการขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิตพลังงานขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิตพลังงาน และเกิดปัญหาราคาน้ำมันแพง และการใช้เชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางอากาศ อีกด้วยปัจจุบันประเทศไทยต้องพึ่งพาเชื้อเพลิงพลังงานจากต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียนอื่นจึงได้รับความสนใจโดยเฉพาะ พลังงานชีวมวลและแก๊สโซฮอลล์ ซึ่งเชื้อเพลิงทดแทนเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากการใช้ผลิตผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรมหรือซึ่งเหมาะสำหรับประเทศไทยที่มีการเกษตรเป็นพื้นฐาน ตัวอย่างชีวมวลต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ อ้อย แกลบ มันสำปะหลัง เป็นต้น ปัจจุบันมีการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพแล้วในประเทศไทยและมีแนวโน้มการใช้เพิ่มขึ้น โดยสถานการณ์พลังงานของประเทศไทยในเดือนมิถุนายน 2553รายงานว่า ประเทศไทยมีการนำเข้าเชื้อเพลิงลดลงร้อยละ 6.8 และมีการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพิ่มขึ้นร้อยละ 14.8 เทียบกับช่วงเวลาเดียวกันในปี 2552 (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2554)

เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนอย่างหนึ่งที่ ซึ่งสามารถผลิตได้จากวัสดุทางการเกษตรและนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรม และใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมัน ซึ่งจะช่วยประหยัดเงินตราต่างประเทศในการลดการนำเข้าสารเพิ่มค่าออกเทนและลดมลพิษอากาศ กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม (2552) รายงานว่าการใช้เอทานอลเป็นสารเพิ่มค่าออกเทนแทนสาร MTBE ช่วยลดปริมาณแก๊ซคาร์บอนไดออกไซด์จากการเผาไหม้เครื่องยนต์ได้ร้อยละ 20 และลดปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน อย่างไรก็ตาม การผลิตเอทานอลในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการและมีต้นทุนการผลิตสูง จากปัญหาดังกล่าวว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำให้มีการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลโดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาแปรรูปเป็นเอทานอล เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตและเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้แก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

กากมันสำปะหลังเป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยกากมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นมีปริมาณมาก สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2554) รายงานว่าปริมาณกากมันสำปะหลังเฉลี่ยต่อปีประมาณ 300,000-400,000 ตันต่อปี องค์ประกอบหลักของกากมันสำปะหลัง คือ แป้ง คิดเป็นร้อยละ 50-70 ของน้ำหนักแห้งและมีเส้นใยร้อยละ 20 (Sriroth *et al.*, 2000) แม้ว่ากากมันสำปะหลังถูกใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่ยังมีปริมาณกากมันสำปะหลังอีกมาก ด้วยองค์ประกอบและปริมาณกากมันสำปะหลัง จึงมีงานศึกษาเพื่อนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกต่อไป แต่โครงสร้างที่ซับซ้อนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในกากมันสำปะหลัง ทำให้เอนไซม์เข้าย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลทำได้ยาก ดังนั้น ควรมีการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลัง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (กากมันสำปะหลัง) และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาให้กับเอนไซม์ (Mosier *et al.*, 2005)

งานศึกษานี้เป็นการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอทานอล โดยผลที่ได้จากงานศึกษานี้จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของเสียจากภาคอุตสาหกรรม ลดต้นทุนการผลิตเอทานอล และลดความขัดแย้งในการแย่งวัตถุดิบระหว่างการบริโภคและการใช้เพื่อผลิตพลังงานของพืชที่เป็นได้ทั้งพืชอาหารและพืชพลังงาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของวิธีการบำบัดขั้นต้นทางเคมีกายภาพและเคมีที่มีต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลัง

2. เพื่อศึกษาชนิดเอนไซม์ อุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นทางเคมีกายภาพ

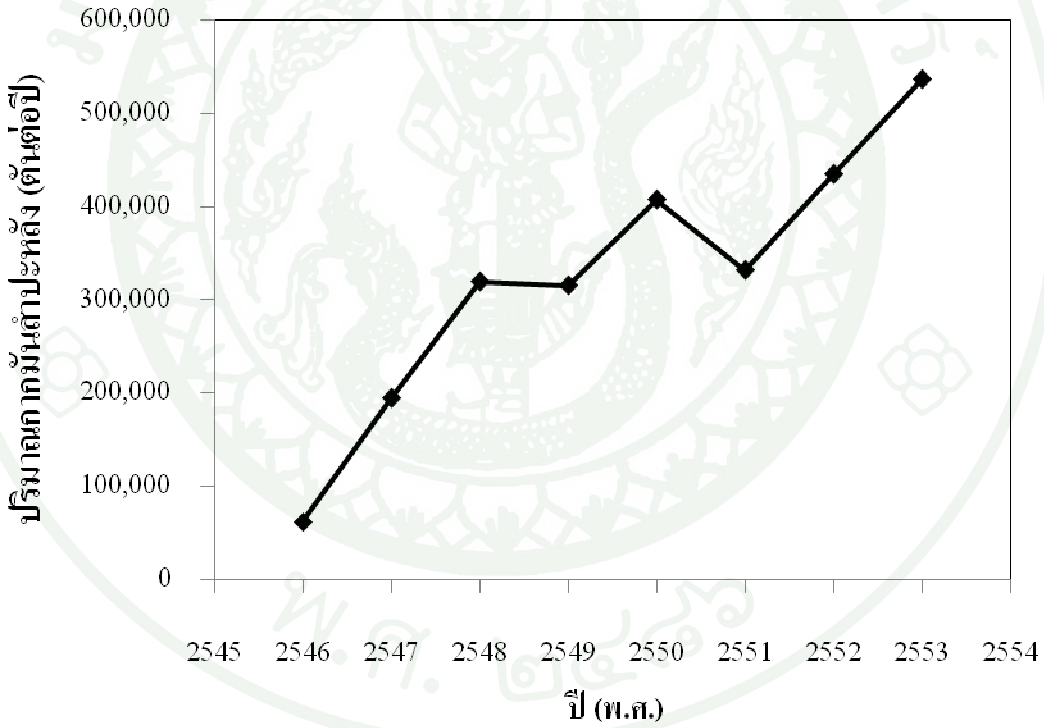
3. เพื่อศึกษาเบื้องต้นของการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ย่อยได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. สถานการณ์กากมันสำปะหลังในประเทศไทย

กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังและเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยในกระบวนการผลิตแต่ละครั้งจะก่อให้เกิดกากมันสำปะหลังร้อยละ 27 ของปริมาณมันสำปะหลังที่ใช้ (โสภิตา และคณะ, 2540) และจากข้อมูลสถิติการส่งออกในปีพ.ศ. 2546 ถึง 2553 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2554) พบว่า ปริมาณกากมันสำปะหลังเฉลี่ยต่อปีประมาณ 300,000 ถึง 400,000 ตันและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ปริมาณกากมันสำปะหลังที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึง 2553

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2554)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การลดปริมาณกากมันสำปะหลัง คือ การตากแดดให้แห้ง (สุภาวดี, 2543) และจำหน่ายในราคาถูกเพื่อผสมใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารสัตว์ (สุนีย์, 2539) แต่ในการลดปริมาณกากมันสำปะหลังด้วยการตากแดดให้แห้งจะต้องใช้พื้นที่มาก ใช้เวลานานเพราะกากมันสำปะหลังที่ได้มีความชื้นสูงประมาณร้อยละ 60-75 (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจทำให้เกิดกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ จากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (สุกัญญา และผกาพรรณ, 2545) ดังนั้น จึงควรหาแนวทางการใช้ประโยชน์กากมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเพื่อลดปริมาณและเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลัง

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของกากมันสำปะหลังสด

คุณสมบัติ	กากมันสำปะหลังสด (ร้อยละ)	
	กิตติศักดิ์ (2551)	Sriroth *et al.* (2000)
ความชื้น	60-65	72
คาร์โบไฮเดรต	30-35	17.8
โปรตีน	1-2	0.4
ไขมัน	-	0.03
เส้นใย	-	7.17
เถ้า	-	0.44

2. องค์ประกอบกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังแตกต่างกันตามคุณภาพวัตถุดิบ (หัวมันสำปะหลัง) และประสิทธิภาพในการสกัดแป้งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของแต่ละโรงงาน (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2540) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังแห้ง คือ แป้ง มีปริมาณเฉลี่ยร้อยละ 60-75 โดยน้ำหนัก รองลงมาคือ เส้นใย (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ประมาณร้อยละ 12-20 โดยน้ำหนัก โดยมีโปรตีน ไขมันและเถ้าในปริมาณต่ำ (ตารางที่ 2) ด้วยองค์ประกอบของแป้งและเส้นใยที่สูงทำให้กากมันสำปะหลังได้รับความสนใจเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นการมูลค่าทางเศรษฐกิจ และลดปริมาณกากมันสำปะหลัง ตัวอย่างการใช้กากมันสำปะหลังในระดับวิจัย เช่น การใช้กากมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ทดแทนการนำเข้าอาหารเสริมที่มีราคาแพง (เสริมศักดิ์, 2546; ชาคร, 2548) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ (ธีระ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พงษ์, 2550) และกรดอินทรีย์ (สินีนาถ, 2539; กฤติกา, 2551; Carta *et al.*, 1999) เป็นวัสดุปรับปรุงดิน (กิตติศักดิ์, 2551) และการใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล (Sriroth *et al.*, 2000; Kosugi *et al.*, 2009) เป็นต้น

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

แหล่งข้อมูล	**องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ)**				
	แป้ง	**เส้นใย**	**โปรตีน**	**ไขมัน**	**เถ้า**
เมธาและฉลอง (2533)	77.6	5.3	1	0.8	1.8
สุนีย์ (2539)	66.22	15.26	1.55	-	-
กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2540)	56	35.9	5.3	0.1	2.7
กัลยา (2546)	58.02	14.35	-	-	-
ชลดา (2546)	61.84	14.35	2.03	-	2.38
พักตร์ประไพ (2546)	77.98	9.23	2.21	-	1.55
ธันยาภรณ์ (2548)	67.46	11.58	4.18	1.85	3.30
Kunhi *et al.* (1981)	61.80	12.80	1.50	-	-
Kosugi *et al.* (2009)	60.6	29	0.4	-	-
Rattanachomsri *et al.* (2009)	60.10	23.04	-	-	-

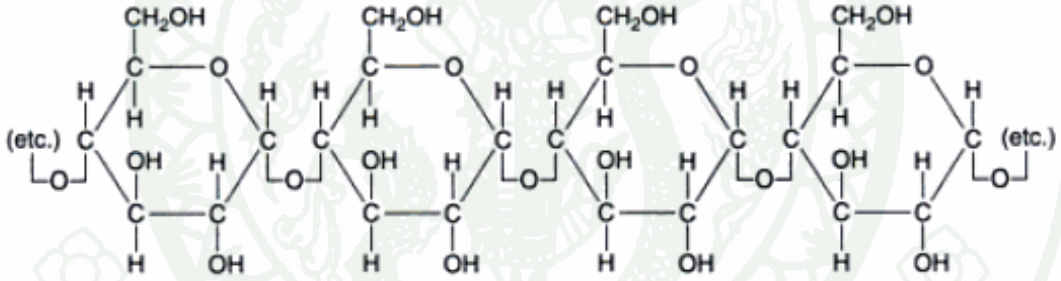
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. โครงสร้างของแป้ง

แป้ง (starch) เป็นพอลิแซคคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลของแป้งมี 2 ชนิดคือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพกติน) โดยอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้ง (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2550)

3.1 อะไมโลส (amylose)

พอลิเมอร์เชิงเส้น ที่ประกอบด้วยหน่วยของ D(+) กลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 (α-1,4) เกาะกันเป็นเส้นตรง ดังภาพที่ 2 ในแป้งมีอะไมโลสอยู่ประมาณร้อยละ 20-25 ของแป้งทั้งหมด



ภาพที่ 2 โครงสร้างอะไมโลส

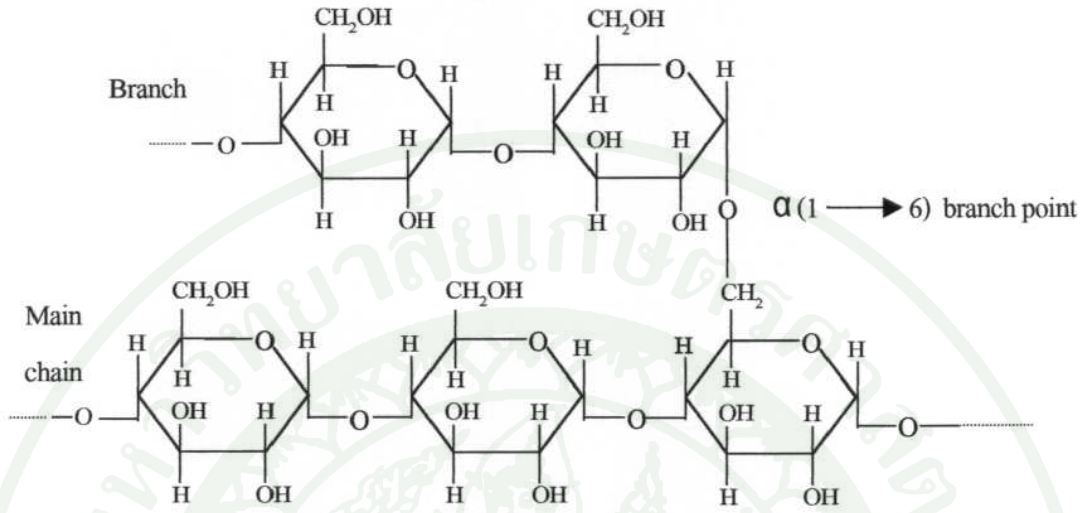
ที่มา: Voel and Voel (1995)

3.2 อะไมโลเพคติน (amylopectin)

พอลิเมอร์เชิงกิ่งหรือแตกแขนงของกลูโคส โดยแกนของอะไมโลเพคติจะจับกันด้วยพันธะไลกโคซิดิกชนิดแอลฟา 1,4 (α-1,4) และส่วนที่มีการแตกแขนงเป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้น เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดแอลฟา 1,6 (α-1,6) โดยทั่วไปในแป้งจะมีอะไมโลเพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คตินอยู่ประมาณร้อยละ 75 -85 ของแป้งทั้งหมด (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่กำหนดความคงทนต่อการทำปฏิกิริยาด้วยกรดและเอนไซม์



ภาพที่ 3 โครงสร้างอะไมโลเพกติน

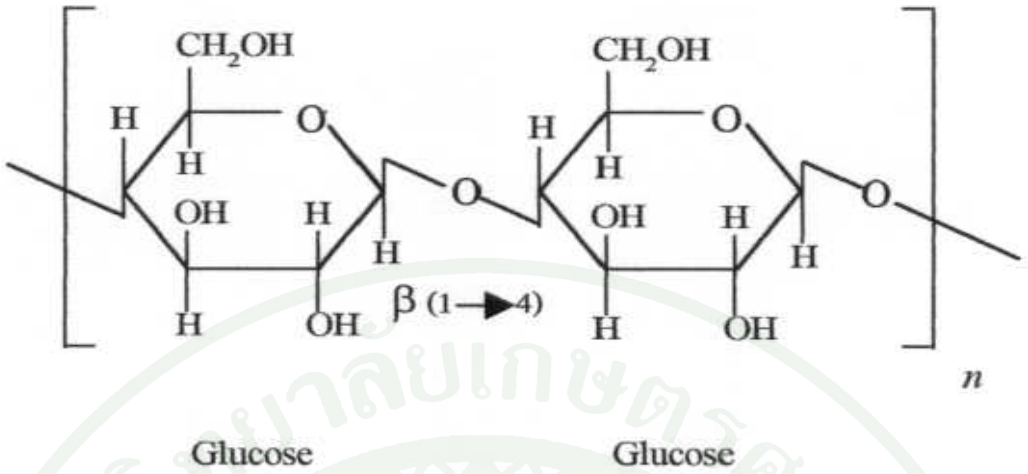
ที่มา: Voel and Voel (1995)

4. โครงสร้างของเส้นใย

เส้นใยเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช โดยประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

4.1 เซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของพืช เป็นสารประกอบโฮโมพอลิแซคคาไรด์ ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกส์ โดยจะจับกันที่ตำแหน่งพันธะเบต้า (1-4) โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสดังภาพที่ 4 ซึ่งสามารถพบในพืชชั้นสูง สาหร่ายและเป็นองค์ประกอบในทรัพยากรหมุนเวียน (renewable resource) หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟาง แกลบ ขี้เลื่อย ชานอ้อย กระดาษใช้แล้ว กากมันสำปะหลัง เป็นต้น (เปี่ยมสุข, 2551; Prasad *et al.*, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: ชลดา (2546)

4.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มักพบร่วมกับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช และมีขนาดเล็กกว่าเซลลูโลส โดยทั่วไปจะเป็นพอลิเมอร์ผสมของโมโนแซคคาไรด์ต่างๆ ได้แก่ ไซโลส กลูโคส แมนโนส และกาแลกโตส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิกชนิดเบต้า (1-4) พบมาในไม้ประเภทเนื้อแข็ง พืชจำพวกหญ้าและฟางจะพบไซแลน (xylan) เฮมิเซลลูโลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส ละลายในสารละลายด่างได้ดี

4.3 ลิกนิน (lignin) เป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล เมทอกซิล และหน่วยฟีนิลโพรเพน มีโมเลกุลที่แข็งแรงไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด ลิกนินเป็นองค์ประกอบหนึ่งในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลส โดยเป็นตัวยึดเกาะระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เพื่อป้องกันเซลลูโลสจากการย่อยสลายจากจุลินทรีย์

5. การผลิตเอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH มีลักษณะทางกายภาพคือ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่ายและ จุดติดไฟได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นได้ดี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 0.7939 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 15 องศาเซลเซียส (กล้าณรงค์, 2550) เอทานอลเป็นทางเลือกนึงในทดแทนการใช้น้ำมันปิโตรเลียม เพราะเอทานอลสามารถผลิตจากทรัพยากรธรรมชาติ พืชผลทางการเกษตร และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นการแก้ปัญหาราคาผลผลิตทางการเกษตรล้นตลาด ลดปัญหามลพิษทางอากาศ เนื่องจากการใช้เอทานอลทำให้เกิดการเผาไม้ที่สมบูรณ์ และสะอาดกว่าการเผาไหม้ของน้ำมันเบนซิน (พิชิต, 2546; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2552)

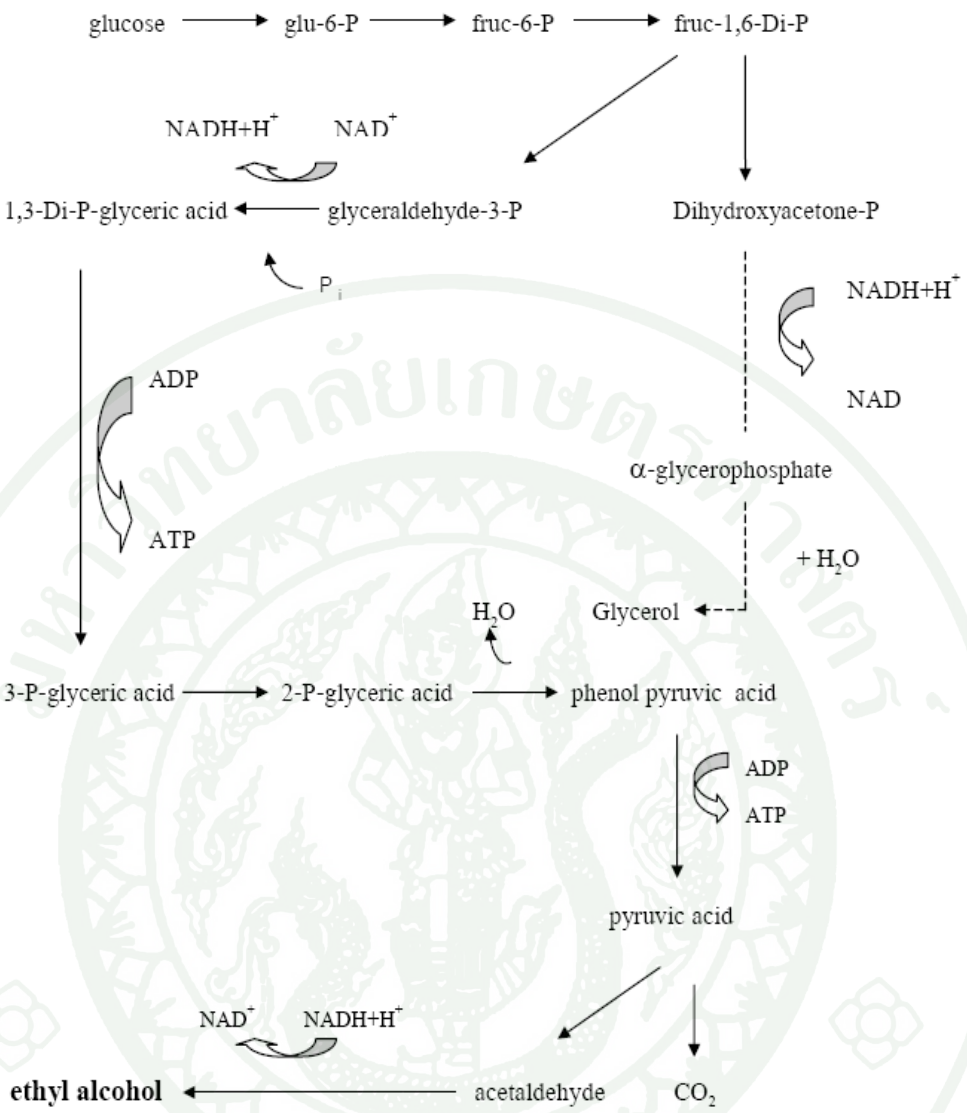
5.1 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้ 2 วิธี คือ กระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวเคมี โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นการผลิตจากอนุพันธุ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีน เป็นต้น ทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกได้เอทิลซัลเฟต (ethyl sulphate) จากนั้นไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้เอทานอล (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551) ดังสมการ

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \xrightarrow[\text{catalyst}]{\text{high pressure, } 300\ ^{\circ}C} C_2H_5OH \qquad (1)$$

กระบวนการการผลิตเอทานอลด้วยการหมักทางชีวเคมี เป็นการใช้วัสดุทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภทแป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลส ผ่านกระบวนการทางชีวเคมีเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้ไปเป็นเอทานอลอาศัยกิจกรรมของยีสต์ โดยกระบวนการที่เรียกว่า ไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือกระบวนการเอมบ์เทน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) จนได้ไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป (Bai *et al.*, 2008) (ภาพที่ 5) ในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคสทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้น (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2551; Clark and Deswarte, 2008) ส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิทัลดีไฮด์ กรดอะซิติก ซึ่งปริมาณของสารดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะที่ใช้ในการหมัก โดยจะถูกกำจัดออกในขั้นตอนการทำเอทานอลบริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 กระบวนการเอมบ์เทน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway)

ที่มา: Paturau (1969)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิด ส่วนใหญ่วัตถุดิบหลักมี 2 ประเภท คือ น้ำตาลและแป้ง แต่เป็นการนำเอาพืชอาหารมาใช้ผลิตเอทานอล อาจส่งผลให้ไม่เพียงพอต่อการผลิตและการบริโภค จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2550) โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2551) ได้แบ่งวัตถุดิบออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

5.2.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล (saccharide material)

เป็นวัตถุดิบที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งเกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส โดยน้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส เช่น อ้อย กากน้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้จุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้โดยตรง

5.2.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง (starch material)

ส่วนใหญ่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าว และมันเทศ เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการย่อย (hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์ได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลได้ การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เป็นที่นิยมมากกว่าการใช้กรด เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการย่อยโดยใช้กรด การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ การย่อยแป้งครั้งแรก (liquefaction) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและการย่อยแป้งครั้งสุดท้าย (saccharification) ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

5.2.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material)

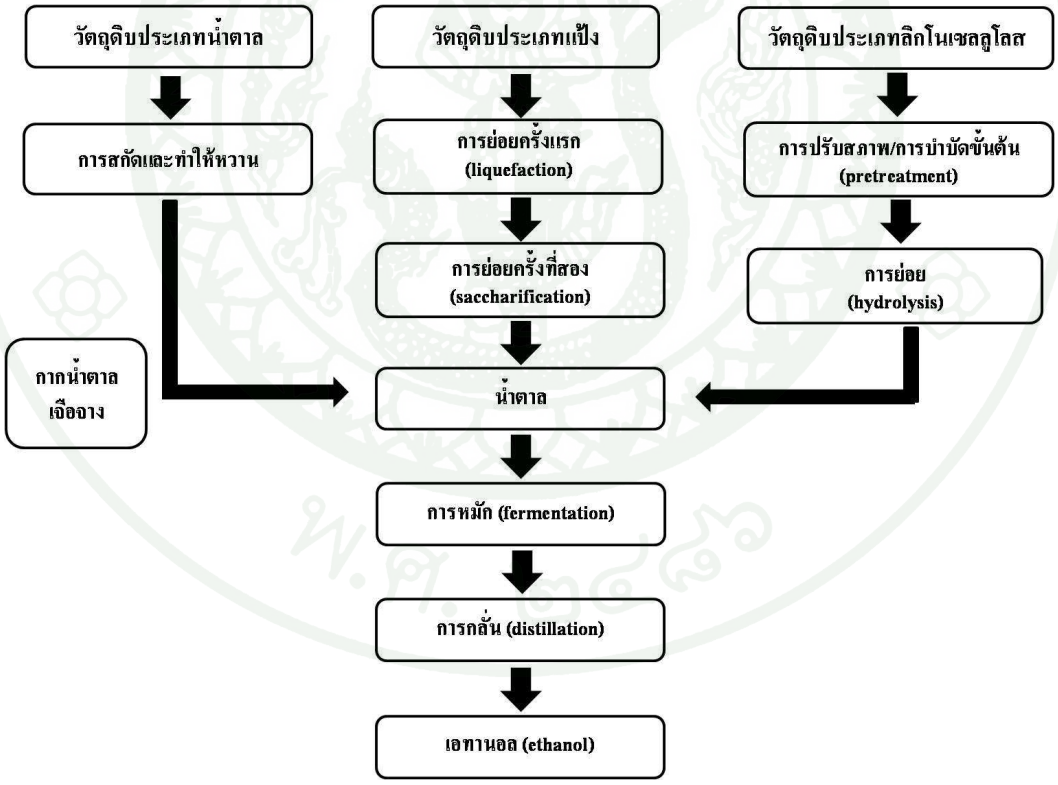
องค์ประกอบของวัตถุดิบนี้ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (lignin) ซึ่งเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่เกิดจากน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทส (pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(xylose) และแมนโนส (mannose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งเป็นส่วนที่ทนต่อการย่อยสลาย ทำให้เอนไซม์สามารถย่อยได้ยาก เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด เศษไม้ กากมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งส่วนมากเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากทางการเกษตร

เกณฑ์ในการพิจารณาความเหมาะสมด้านวัตถุดิบในการนำมาผลิตเป็นเอทานอลที่สำคัญ คือ วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดทั้งปี วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์ สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง

การผลิตเอทานอลโดยกระบวนทางชีวเคมีจากการหมักวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 3 ประเภท สามารถสรุปได้ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร

ที่มา: กล้าณรงค์ และคณะ (2553)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กากมันสำปะหลังที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล จัดเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Balat, 2011) และ Balagopalan *et al.* (1994) รายงานว่าแป้งที่เป็นองค์ประกอบหลักของกากมันสำปะหลังจะอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ของพืช (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ทำให้เอนไซม์เข้าย่อยแป้งได้ยาก ดังนั้น ในการผลิตวัตถุดิบประเภทนี้ควรมีขั้นตอนการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบ เพื่อช่วยสกัดแป้งออกจากผนังเซลล์และเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตน้ำตาล (ภาพที่ 6)

6. การบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบ (pretreatment)

การบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส เพื่อช่วยให้เอนไซม์เข้าย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และกากมันสำปะหลังจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีโครงสร้างที่เป็นผลึกของเส้นสารประกอบเชิงซ้อน (complex compounds) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส โดยส่วนที่เอนไซม์สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและใช้ในการผลิตเอทานอลต่อไปคือ เซลลูโลส ดังนั้นการบำบัดวัตถุดิบขั้นต้นเป็นการแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบ เพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์และลดอุปสรรคในขั้นตอนการหมักด้วย (Sun *et al*., 2002) โดยวิธีการบำบัดขั้นต้นแบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังภาพที่ 7

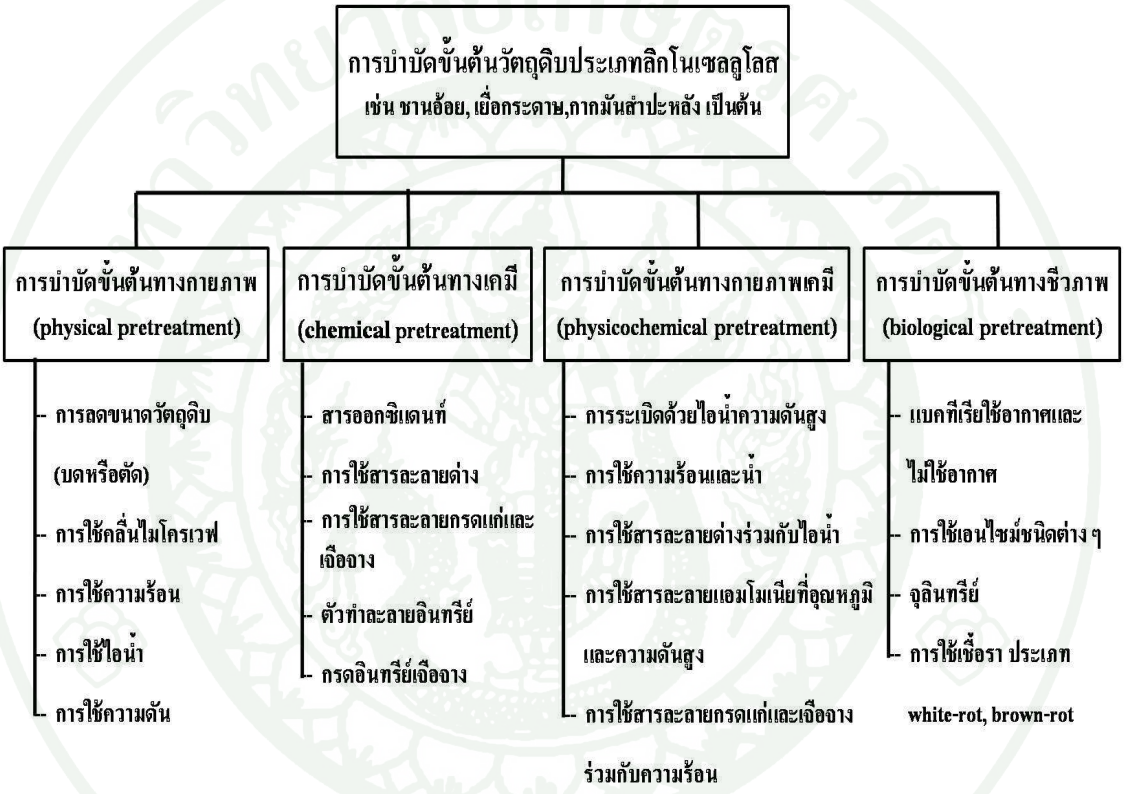
6.1 การบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

6.1.1 การลดขนาดของวัตถุดิบโดยวิธีการบด เป็นการบดผลึกของเส้นใยที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลจำนวนมากซึ่งในแต่ละไมโครไฟบริลนั้นจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline region) คือเส้นใยของเซลลูโลสให้แตกออก เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้นและเพื่อให้เอนไซม์ย่อยสลายได้ง่ายขึ้น Sun *et al.* (2002) กล่าวว่าวัตถุดิบส่วนใหญ่จะมีขนาดเริ่มต้น 10–30 มิลลิเมตร หลังจากการบดหรือตัดจะมีขนาด 0.2–2 มิลลิเมตร

6.1.2 การทำออกซิเดชันแบบเปียก (wet oxidation) เป็นการให้ความร้อนกับวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยทำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสในน้ำหรือภายใต้บรรยากาศมีออกซิเจนภายใต้ความดันสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.1.3 กระบวนการใช้ไอน้ำความดันสูง เป็นการทำให้องค์ประกอบเซลลูโลสในวัตถุดิบนั้นอิ่มตัวไปด้วยไอน้ำ ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง แล้วลดความดังลงทันที เพื่อทำให้น้ำระเหยอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยจะเสียสภาพของโครงสร้างของผนังเซลล์พืชไป จะทำให้เส้นใยแยกออกจากกัน เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวเฉพาะมากขึ้นและลดการเกิดโพลีเมอร์ไรเซชันของเซลลูโลสไป ทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกออก



ภาพที่ 7 วิธีการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: ดัดแปลง Mtui (2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

เป็นการแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากเซลลูโลส โดยการใช้สารละลายสามารถแบ่งได้เป็น กรด ด่าง โอโซน ตัวทำละลายอินทรีย์หรือออกซิไดซ์ซิงเอเจ็นท์ (oxidizing agent)

6.2.1. การใช้กรด เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้สารละลายกรดแก่ เช่น กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา

6.2.2. การใช้ด่าง เป็นการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบโดยใช้สารละลายด่าง เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะมีผลทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมาและเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบโดยการทำให้เกิดการพองตัว (swelling)

6.2.3. การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารออกซิไดซ์ซิงเอเจ็นท์ (oxidizing agent) ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ยูเรีย แอมโมเนีย

6.3 การบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีทางกายภาพ-เคมี (physico-chemical pretreatment)

วิธีการบำบัดขั้นต้นนี้ เป็นการทำงานร่วมกันของสารเคมีและปรับสภาวะทางกายภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพของสารเคมีในการบำบัดขั้นต้นวัตถุดิบ เช่น การใช้สารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิและความดันสูง (ammonia fiber explosion) การใช้ความร้อนและน้ำ (liquid hot water หรือ hydrothermal pretreatment) การเติมคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง (CO_2 explosion) เป็นต้น โดยการทำให้วัตถุดิบอิ่มตัวไปด้วยน้ำ แอมโมเนีย หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง และลดความดันลงทันทีเพื่อทำให้น้ำและสารเคมีระเหยอย่างรวดเร็วและทำให้วัตถุดิบเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ โดยทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกออก (Balat, 2011) Cara *et al.* (2008) พบว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยการระเบิดไอน้ำร่วมกับกรดซัลฟูริก สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงขึ้น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการบำบัดขั้นต้นด้วยการระเบิดไอน้ำเพียงอย่างเดียว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.4 การบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)

การเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดการเป็นผลึก เช่น การใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ การใช้เชื้อราจำพวกราผุขาว (white-rot) การใช้แบคทีเรียที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ เป็นต้น

ปัจจุบันมีการศึกษาการบำบัดขั้นต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ตารางที่ 3 รวบรวมประสิทธิภาพของวิธีการบำบัดขั้นต้นต่างๆ ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส

7. การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

การย่อยหรือไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการเปลี่ยนพอลิแซคคาไรด์ (แป้งและเซลลูโลส) เป็นน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ คือ กลูโคส ดังสมการ (2) (คุณากร, 2549; กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2550)

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \longrightarrow nC_6H_{12}O_6 \qquad (2)$$

การย่อยสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยด้วยสารเคมีและการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยกากมันสำปะหลัง จะมีลักษณะคล้ายกับกระบวนการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (พักตร์ประไพ, 2546)

7.1 การย่อยด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis)

การย่อยด้วยสารเคมี เช่น สารละลายกรดหรือด่างจะเกิดปฏิกิริยาทำลายพันธะไกลโคดิก ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับออกซิเจนภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีต่างๆ

ประเภทการบำบัดขั้นต้น	วิธีการ	วัตถุดิบ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่บำบัดขั้นต้น (เท่า)	งานการศึกษา
กายภาพ	ไมโครเวฟ	วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอล	1.93	Linde *et al.* (2008)
	เครื่องบดบอลมิลล์ (ball milling)	ยูคาลิปตัส	5.10	Inoue *et al.* (2008)
เคมี	โซเดียมไฮดรอกไซด์	เหง้ามันสำปะหลัง	1.32	พรรณวิไล (2545)
	กรดซัลฟูริกเจือจาง	รำข้าวสาลี	2.29	Palmarola-Adrados *et al.* (2005)
	กรดซัลฟูริกเจือจาง	กากมันสำปะหลัง	2.00	Kosugi *et al.* (2009)
	กรดซัลฟูริกเจือจาง	ซังข้าวโพด	1.53	Um *et al.* (2003)
	กรดฟอสฟอริกเจือจาง	ซังข้าวโพด	1.37	Um *et al.* (2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ประเภทการบำบัดขั้นต้น	วิธีการ	วัตถุดิบ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่บำบัดขั้นต้น (เท่า)	งานการศึกษา
เคมีกายภาพ	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไอน้ำ	เปลือกมันสำปะหลัง	1.16	กัลยา (2546)
	โซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับไอน้ำ	กากมันสำปะหลัง	1.08	กัลยา (2546)
	ความร้อนและน้ำ	รำข้าวสาลี	2.05	Palmarola-Adrados *et al.* (2005)
	ความร้อนและน้ำ	กากมันสำปะหลัง	2.50	Kosugi *et al.* (2009)
	ไมโครเวฟร่วมกับกรดซัลฟูริกเจือจาง	วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอล	2.71	Linde *et al.* (2008)
ชีวภาพ	เอนไซม์เซลลูเลสและแพคติเนส	กากมันสำปะหลัง	0.85	ชลดา (2546)
	เอนไซม์เซลลูเลส แพคติเนส เฮมิเซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส	กากมันสำปะหลัง	2.50	Kosugi *et al.* (2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.1.1. การย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

ก. กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ข้อเสียคือ จะต้องมีการแยกกรดออกจากน้ำตาล ก่อนนำไปใช้และการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ รวมทั้งปัญหาการสูญเสียกรดไปกับส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

ข. กระบวนการที่ใช้กรดอ่อน เป็นการใช้กรดอ่อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส ผลที่ได้จากการย่อย คือ เซลลูโลสยังมีโครงสร้างเป็นเส้นใยอยู่ และวิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือแคลเซียมคาร์บอเนต

7.1.2. การย่อยด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการย่อย คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทิลลีนไดอะมีน และแอมโมเนีย เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส และต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย

7.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymetic hydrolysis)

การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทั่วไปจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์และมีความจำเพาะต่อสับเสตรท จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยมีผลผลิตข้างเคียงน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่ทำให้เกิดการผุกร่อนของเครื่องมือ (พักตร์ประไพ, 2546)

8. เอนไซม์ย่อยแป้งและเส้นใย

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุมีที่แป้งและเส้นใยเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล คือ เอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส (พักตร์ประไพ และวิชัย, 2546)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1 เอนไซม์อะไมเลส (amylase)

เอนไซม์อะไมเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะกลูโคซิดิกชนิด 1,4-α-D ในโอลิโกแซคคาไรด์หรือพอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้งและไกลโคเจน เมื่อพิจารณากลไกการเร่งปฏิกิริยาหรือตำแหน่งการตัดพันธะ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

8.1.1 เอนโดอะไมเลส

ทำหน้าที่ตัดพันธะกลูโคซิดิกแอลฟา 1,4 ของอะไมโลสหรืออะไมโลเพคตินแบบสุ่มและจะไม่ย่อยพันธะกลูโคซิดิกแอลฟา 1,6 ของอะไมโลเพคติน ผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นสารผสมของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เช่น กลูโคส มอลโทส โดยเอนไซม์ในประเภทนี้ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ในสกุลอะไมเลสที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุด โดยใช้มากในอุตสาหกรรมแป้ง สารซักฟอก และสิ่งทอ ซึ่งเป็นเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียบาซิลลัส โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis Bacillus subtilis* และเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *Aspergillus oryzae* และ *Apergillua niger*

8.1.2 เอกโซอะไมเลส

ทำหน้าที่ตัดพันธะกลูโคซิดิกจากปลายสาย และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์กลูโคสหรือมอลโตส ซึ่งมีการสลับโครงแบบที่คาร์บอนตัวที่ 1 ของผลิตภัณฑ์ เอนไซม์ในประเภทนี้มี 2 ชนิด คือ เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

ก. กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรือเรียกว่า อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger Aspergillus oryzae Rhizopus* spp. เอนไซม์นี้จัดเป็นแอลฟาอะไมเลสชนิดหนึ่งที่ย่อยจากปลายโมเลกุล (exo-hydrolase) ด้านไม่มีหมู่รีดิวส์เข้าสู่ภายในโมเลกุลทีละ 1 หน่วยของกลูโสอย่างเป็นระเบียบ โดยสามารถตัดทั้งพันธะแอลฟา(1,4) และ แอลฟา (1,6) แต่จะตัดพันธะแอลฟา (1,4) ได้เร็วกว่าแอลฟา (1,6) เอนไซม์นี้ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข. เบต้าอะไมเลส (β-amylase) ย่อยจากด้านปลายโมเลกุล ครั้งละ 2 โมเลกุล กลูโคส ทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสเป็นผลผลิต ซึ่งส่งผลต่อพันธะแอลฟา (1,4) และเมื่อย่อยมาถึงพันธะแอลฟา (1,6) กิจกรรมของเอนไซม์จะหยุดลง เอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์

8.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบเซลลูโลส (cellutytic enzymes) ทำหน้าที่ตัดพันธะกลูโคซิดิกในเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลัก คือ (เปี่ยมสุข, 2551)

8.2.1 เอนโดกลูแคเนส (endoglucanase) หรือ 1,4-β-D-glucan-glucanohydrolase ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,4 ภายในสายเซลลูโลสอย่างสุ่ม โดยจะย่อยในบริเวณอสัณฐาน (amorphous) ทำให้เกิดปลายอิสระ ผลผลิตที่ได้คือ โอลิโกแซคคาไรด์

8.2.2 เอกโซกลูแคเนส (exoglucanase) หรือเซลโลไบโอไฮโดรเลส ทำหน้าที่ย่อยโดยการตัดโมเลกุลจากปลายสายทั้ง 2 ด้าน โดยย่อยทีละ 2 หน่วยกลูโคสในบริเวณที่เป็นผลึก ผลิตภัณฑ์หลักคือ เซลโลไบเอส (กลูโคส เบต้า-1,4-กลูโคส)

8.2.3 เบต้า-กลูแคเนส (β-glucanase) หรือเซลโลไบเอส (cellubiase) ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่เกิดจากการย่อยของเอนโดกลูแคเนส และเซลโลไบโอสที่เกิดจากเอกโซกลูแคเนสให้ได้กลูโคส เพื่อเป็นแหล่งพลังงานต่อไป

ในปัจจุบันมีการวิจัยอย่างกว้างขวางในการพัฒนากระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยแหล่งของเอนไซม์โดยมากมาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะ เซลลูเลสจากเชื้อรา เช่น เชื้อ *Trichoderma ressei* และ *Humicola insolens* นับเป็นแหล่งสำคัญของเซลลูเลส เนื่องจากราหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและเป็นเอนไซม์ที่ผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ ดังนั้น จึงเหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ในขณะที่เซลลูเลสจากแบคทีเรียจะตรึงไว้กับผนังเซลล์ ซึ่งเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์บริเวณที่สัมผัสกับสับสเตรตทำให้การย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พอลิแซคคาไรด์เกิดได้สมบูรณ์ (Tomme *et al.*, 1995) ตารางที่ 4 รวบรวมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

วัตถุดิบ	เอนไซม์และ สภาวะที่ใช้	ความเข้มข้น น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนัก แห้ง)	งานศึกษา
กากมัน สำปะหลัง	เอนไซม์ผสมเซลลูเลสและเพคติเนส (28 องศาเซลเซียส, 1 ชั่วโมง) แอลฟาอะไมเลส (90 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง)	24.6	Sriroth *et al.* (2000)
ปอปลาร์	เอนไซม์ผสมเซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดส (50 องศาเซลเซียส, 72 ชั่วโมง)	44 .0	Negro *et al.* (2003)
รำข้าวสาลี	แอลฟาอะไมเลส (85 องศาเซลเซียส, 4 ชั่วโมง) อะไมโลกลูโคซิเดส (55 องศาเซลเซียส, 48 ชั่วโมง)	53.0	Palmarola-Adros *et al.* (2005)
ฟางข้าวไรย์	เอนไซม์ผสเซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดส (50 องศาเซลเซียส, 48 ชั่วโมง)	19.7	Sun and Cheng (2005)
ยูคาลิปตัส	เอนไซม์ผสมอะคลีโมเนียมเซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดส (45 องศาเซลเซียส, 72 ชั่วโมง)	66.7	Inoue *et al.* (2008)
ฟางข้าวสาลี	เอนไซม์ผสมเซลลูเลสและเบต้ากลูโคซิเดส (40 องศาเซลเซียส, 96 ชั่วโมง)	61.2	Linde *et al.* (2008)
แกลบ	เอนไซม์ผสมเซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส ไซลาเนสและเอสเทอร์เรส (45 องศาเซลเซียส, 72 ชั่วโมง)	28.7	Saha *et al.* (2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

9.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เอนไซม์ทุกชนิดมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานที่ค่าหนึ่ง เพราะค่าความเป็นกรด-ด่างทำให้หมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ที่แตกตัวได้อยู่ในสถานะแตกตัวที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างของสถานะการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันที่บริเวณเร่งจะมีผลต่อโครงรูปของเอนไซม์และปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต ดังนั้น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้

9.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยา ทำให้อัตราเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดสูงสุด เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ ทำให้จับกับสับสเตรตไม่ได้หรือจับได้น้อยลง

9.3 ความเข้มข้นของสับสเตรต

ความเข้มข้นของสับสเตรตเพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่จะเกิดขึ้นในช่วงแรกของการเพิ่มความเข้มข้นและจะช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตสูงขึ้น จนถึงจุดที่อัตราการเร็วของปฏิกิริยาคงที่

9.4 ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ตัวยับยั้งมีผลทำให้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งมีอัตราเร็วลดลง สารที่สามารถเป็นตัวยับยั้งอาจเป็นสารอนินทรีย์ เช่น โลหะหนักต่าง ๆ หรืออาจจะเป็นสารอินทรีย์ หรือโปรตีน เช่น สารประกอบฟีโนลิค (phenolic) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.5 ความเสถียรของเอนไซม์

เอนไซม์เมื่อสูญเสียโครงรูปตามธรรมชาติที่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ จะมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอกทิวิตี้หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไป เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจะมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ด้วย เช่น ความร้อน ตัวทำละลายอินทรีย์ รังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

9.6 ความจำเพาะของสับสเตรต

เอนไซม์เป็นชีวโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรต ดังนั้นองค์ประกอบของสับสเตรตมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่

- ควาามเป็นผลึก วัตถุดิบที่มีความเป็นผลึกอยู่มากจะทำให้เอนไซม์เข้าย่อยเพื่อทำปฏิกิริยาได้ยากขึ้น

- พื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตมีมาก จะทำให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

- โครงสร้างที่ซับซ้อนของวัตถุดิบ เช่น ปริมาณลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เป็นต้น ทำให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ยากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (refrigerate centrifuge) รุ่น Universal Zentrifugen 16/16R, D-78532 Tuttlingen บริษัท Hettich, Germany

1.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ (autoclave) รุ่น HVE-50 บริษัท Hirayama

1.3 อ่างน้ำร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath)

1.4 เครื่องบ่มอุณหภูมิ (incubator) รุ่น Model IJ 300 บริษัท Yamato

1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น GBC UV/VIS 918 บริษัท GBC Scientific Equipment

1.6 เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น HR-200 บริษัท A&D

1.7 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (gas chromatograph) รุ่น GC-2014 บริษัท Shimadzu, Kyoto, Japan

1.8 เครื่อง High-performance liquid chromatograph (HPLC) รุ่น DG-2080-53 บริษัท Jasco, Japan

1.8 ตู้อบ (oven) รุ่น BINDER บริษัท Scientific Promotion Co., LTD

1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.10 เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)

1.11 ขวดเก็บตัวอย่าง (vial) ขนาด 40 มิลลิลิตร

1.12 อุปกรณ์เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

2. สารเคมี

2.1 แอมโมเนียมซัลเฟต

2.2 กลูโคส (D-glucose)

2.3 3,5-กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid)

2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต

2.6 กรดซัลฟูริก

2.7 กรดไฮโดรคลอริก

2.8 กรดฟอสฟอริก

2.9 กรดซิตริก

2.10 ไตรโซเดียมซิเตรต

2.11 แอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 99.8

2.12 น้ำกลั่น

2.13 เปปโตน

2.14 ยีสต์สกัด

3. จุลินทรีย์และเอนไซม์

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อยีสต์ชนิดผงสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จากบริษัท อี๊ส เอเชียติก จำกัด และเอนไซม์เชิงการค้า 3 ชนิด คือ

3.1 เอนไซม์เซลลูเลส (Novosym ® 50013) ผลิตจาก *Trichoderma reesei* มีแอกทิวิตี้ 92 FPU ต่อกรัม ความหนาแน่น 1.2 กรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Spirizyme ®Fuel) มีแอกทิวิตี้ 750 AGU ต่อกรัม ความหนาแน่น 1.15 กรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Liquozyme ®SCDS) ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* มีแอกทิวิตี้ 240 KNU ต่อกรัม มีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อมิลลิลิตร

4. วัตถุดิบ

กากมันสำปะหลัง ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท โซนิช สตาร์ท เทคโนโลยี จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเตรียมกากมันสำปะหลังและเอนไซม์

1.1 การเตรียมกากมันสำปะหลัง

อบกากมันสำปะหลังให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องบด นำมาร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดเฉลี่ย 0.5–2 มิลลิเมตร และทำการอบแห้งกากมันสำปะหลังอีกครั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้ในเดซิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้องจนนำไปใช้ทดลอง

1.2 การเตรียมเอนไซม์และยีสต์

เอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสกากมันสำปะหลังประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ประเภท คือ เอนไซม์สำหรับย่อยเส้นใย และเอนไซม์สำหรับย่อยแป้ง โดยเอนไซม์สำหรับย่อยเส้นใยที่ใช้ในงานศึกษานี้ คือ เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์สำหรับย่อยแป้ง คือ เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส นำเอนไซม์มาทำการเจือจางด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์โดยเตรียมที่แอคทิวิตี้ต่างๆ คือ เอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอกทิวิตี้เท่ากับ 20 FPU ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส ที่มีค่าแอกทิวิตี้เท่ากับ 24 KNU ต่อกรัมกากมันสำปะหลังและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสให้มีค่าแอกทิวิตี้เท่ากับ 75 AGU ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และเตรียมใหม่ทุกครั้งเพื่อให้การย่อยของเอนไซม์มีประสิทธิภาพ

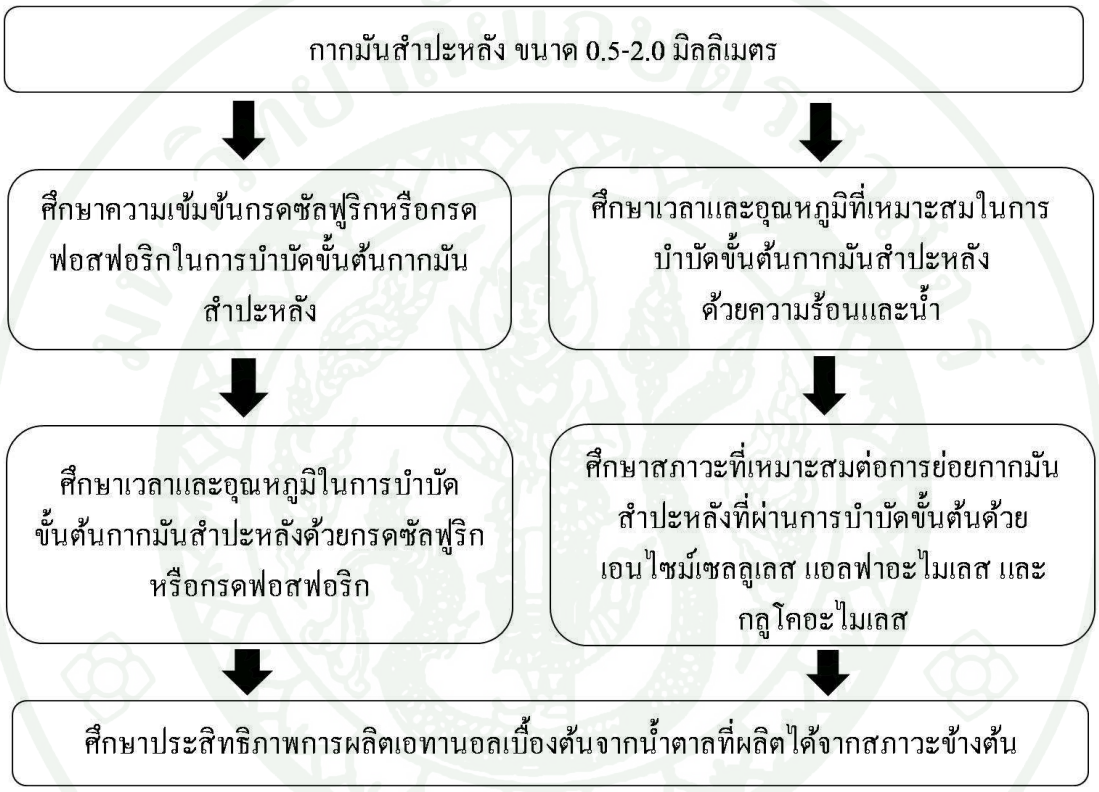
2. การวิเคราะห์องค์ประกอบกากมันสำปะหลัง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง คือ ปริมาณเส้นใย ตามวิธี Associating of Official Analytical Chemists International (AOAC) (1990) และวิเคราะห์ปริมาณแป้ง ตามวิธีของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2521)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การศึกษาการบำบัดขั้นต้นของกากมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

การศึกษานี้ทำการศึกษาการบำบัดขั้นต้น 2 วิธีคือ (1) การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง และ (2) การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ และศึกษาประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลเบื้องต้น โดยขั้นตอนการศึกษาแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แผนผังขั้นตอนการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง โดยการบำบัดขั้นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น คือ ชนิดของกรด ความเข้มข้นของกรด เวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการบำบัดขั้นต้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 การศึกษาความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังที่อบแห้งในปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกหรือกรดฟอสฟอริกเจือจางที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 0.025 0.05 0.1 0.25 และ 0.5 โมลาร์ ภายใต้การให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทิ้งตัวอย่างให้เย็นและนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางประมาณ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.0 โมลาร์ จากนั้นทำการเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี 3,5-กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid; DNS) (ภาคผนวก ก) เพื่อหาความเข้มข้นกรดที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุด

3.1.2 การศึกษาอุณหภูมิ เวลาและชนิดกรดที่เหมาะสมต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง

เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดจากการทดลองข้างต้น จากนั้นทำการศึกษาหาชนิดกรด อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเตรียมกากมันสำปะหลังในปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกหรือฟอสฟอริกเจือจางที่ความเข้มข้นจากการศึกษาข้างต้น ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 115 120 125 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ คือ 15 30 60 และ 90 นาที นำตัวอย่างที่ได้เหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายใสด้วยวิธี DNS เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยพิจารณาจากสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ

3.2.1 การศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังโดยความร้อนและน้ำ

กากมันสำปะหลังมีโครงสร้างของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้ยาก ดังนั้น เพื่อสลายหรือแตกโครงสร้างที่ซับซ้อนและให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยกากมันสำปะหลังได้ง่ายขึ้น โดยทำการศึกษาอุณหภูมิ และเวลาในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ โดยขั้นตอนการทดลองดังนี้

นำกากมันสำปะหลังในปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เติมน้ำในอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 35 (กากมันสำปะหลังต่อน้ำ) โดยทำการเตรียมสารละลายเป็น 2 ชุดการศึกษา คือ สารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น และสารละลายกากมันสำปะหลังที่ทำการบำบัดขั้นต้นโดยให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 115 120 125 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 30 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้ทั้ง 2 ชุดการศึกษาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ด้วยกรดซัลฟิวริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เบื้องต้นด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีค่าแอคทิวิตี้เท่ากับ 24 KNU ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างสารละลายใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

3.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์

ทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในสภาวะต่างๆ หลังจากทำการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ตามสภาวะที่ได้จากข้อ 3.2.1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS เลือก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ขั้นตอนการศึกษามีรายละเอียดดังนี้

ก. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

กากมันสำปะหลังมีเส้นใยเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 20 (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) (Kosugi *et al.*, 2009) การเติมเอนไซม์เซลลูเลสจึงเป็นการย่อยเซลูโลสในกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล ก่อนทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

นำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1 เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์และปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 4.8 ด้วยกรดซัลฟูริคหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นเติมเอนไซม์เซลลูเลสที่มีค่าแอกทิวิตี้เท่ากับ 20 FPU ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง (วิธีการเตรียมข้อ 1) เพื่อทำการย่อยโครงสร้างเส้นใยให้เป็นน้ำตาล และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ คือ 0 3 6 12 18 24 36 48 72 และ 96 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ข. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิสกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลส

นำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสตามสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาข้างต้น ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีค่าแอกทิวิตี้เท่ากับ 24 KNU ต่อมิลลิลิตรต่อกรัมกากมันสำปะหลังนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ คือ 0 1 2 และ 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส

การย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลสที่สภาวะที่เหมาะสม ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีค่าแอคทิวิตี้เท่ากับ 75 AGU ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง นำตัวอย่างที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายใสนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิธี DNS

4. การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ผลิตได้จากสภาวะข้างต้น

การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางตามผลที่ได้จากการทดลองข้อ 2 และการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการใช้เอนไซม์หลายชนิด (ข้อ 4) เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด ในขั้นตอนนี้จะเป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นทั้ง 2 วิธี

4.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์

นำกากมันสำปะหลังที่มีปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการผลิตน้ำตาลโดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.1 (การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง) และจากผลการทดลองข้อ 3.2 (การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์) จากนั้นนำกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ซึ่งผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสวิเคราะห์หาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) (ภาคผนวก ก) ของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นทั้ง 2 วิธีข้างต้น และเก็บสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเอทานอลต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การเตรียมเชื้อยีสต์ผง

ชั่งน้ำหนักยีสต์ผง (active dried yeast) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* 1 กรัม ละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส จำนวน 100 มิลลิลิตรและตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที ก่อนนำไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

4.3 การหมักเพื่อผลิตเอทานอล

นำสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่เตรียมจากข้อ 4.1 หมักด้วยเชื้อยีสต์ชนิดผง *Saccharomyces cerevisiae* ที่เตรียมจากข้อ 4.2 ในอัตราส่วนน้ำตาลรีดิวซ์ต่อเชื้อยีสต์เท่ากับ 9 ต่อ 1 หมักภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.5 หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ คือ 0 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้จากการหมักนำไปเหวี่ยงที่ด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ (ภาคผนวก ก) และวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีDNS เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลเบื้องต้น

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการชั้น 8 อาคารทวีญาณสุคนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ห้องปฏิบัติการ ชั้น 5 อาคารวิทยาศาสตร์ 25 ปี ภาควิชาวิทยาศาสาตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

สถาบัน The National Institute of Advance Industrial Science and Technology (AIST) เมืองฮิโรชิม่า ประเทศญี่ปุ่น

6. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในกากมันสำปะหลังเป็นแป้ง คือ ร้อยละ 60.80 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เส้นใย มีร้อยละ 15.24 โดยปริมาณแป้งและเส้นใยที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ของ Sriroth *et al.* (2000) และ Kosugi *et al.* (2009) ที่รายงานว่ากากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 60-65 และเส้นใยประมาณร้อยละ 15-20 (ซึ่งจากองค์ประกอบทั้งสองมีความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้อยู่ในรูปของน้ำตาล เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลต่อไป)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังที่ใช้ในการศึกษานี้ พบว่ากากมันสำปะหลังมีส่วนประกอบหลักเป็นแป้ง ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ นอกจากนี้การที่กากมันสำปะหลังมีเส้นใยเป็นองค์ประกอบรอง ยังสามารถย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตน้ำตาลได้เช่นกัน เพราะองค์ประกอบของเส้นใยที่เป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลได้ (Sriroth *et al*., 2000) ดังนั้นควรมีการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังเพื่อทำลายพันธะและสลายโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน และเพื่อสกัดแป้งและเซลลูโลสออกจากโครงสร้าง อีกทั้งการบำบัดขั้นต้นเป็นการลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสได้ดียิ่งขึ้น (Balat *et al.*, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Balagopalan *et al.* (1994) ที่รายงานว่าเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนและสามารถขัดขวางการจับกันของเอนไซม์และสับสเตรต (แป้งและเซลลูโลส) ทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้ลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการบำบัดขั้นต้นของกากมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

2.1 การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

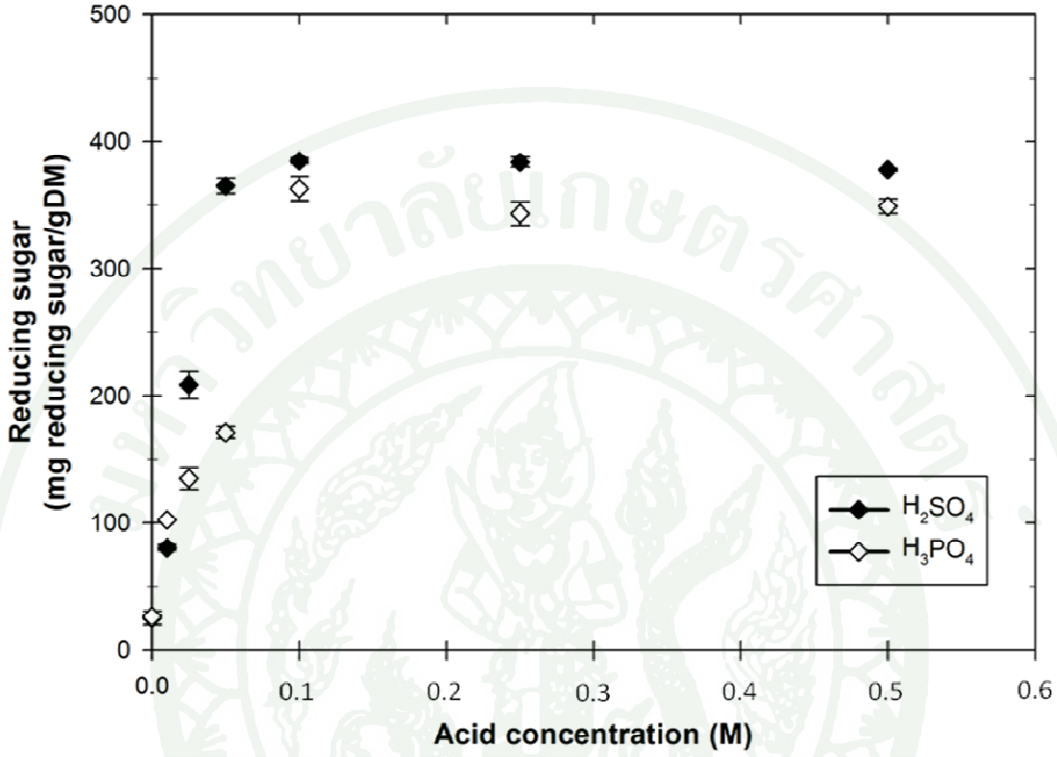
2.1.1 ผลของความเข้มข้นกรดที่ใช้ในการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

เมื่อย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้ปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ เป็นเวลา 15 นาที และความเข้มข้นกรดเจือจาง (กรดซัลฟูริกหรือกรดฟอสฟอริก) เท่ากับ 0.01 จนถึง 0.5 โมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นกรดเจือจางเพิ่มขึ้นจาก 0.01 จนถึง 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 โมลาร์ สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 384.92 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง (ภาพที่ 9) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 0.1 จนถึง 0.5 โมลาร์พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเล็กน้อย โดยมีแนวโน้มเดียวกันทั้งกรดซัลฟูริกและฟอสฟอริก การที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารละลายกรดเจือจางเข้าไปทำปฏิกิริยาสลายพันธะของโครงสร้างโมเลกุลระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสและช่วยละลายเฮมิเซลลูโลสที่เกาะอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสละลายในกรดเจือจางได้ดี (อิสรี, 2550) และการสลายโครงสร้างที่ซับซ้อนนี้ทำให้มีปริมาณแป้งอิสระเพิ่มขึ้น เพราะโมเลกุลของแป้งในกากมันสำปะหลังเกาะอยู่กับเส้นใย หลังจากนั้นกรดจะเข้าทำลายพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกและพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของแป้ง ทำให้ได้แป้งมีขนาดโมเลกุลเล็กลงและเปลี่ยนเป็นสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากขึ้น (Hoover, 2000) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานศึกษาของ Yoonan *et al.* (2005) ที่ทำการย่อยเปลือกมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกรดเจือจางทำให้กรดเข้าทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์เกิดการสลายตัวต่อไปเป็นสารที่เป็นพิษ คือ เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมธทิลเฟอร์ฟูรัล ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าลดลง (วิไลวรรณ, 2552; Palmarola *et al*., 2005; Rattanachomsri *et al.,* 2009)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกหรือกรดฟอสฟอริกกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บำบัดขั้นต้น (25.44 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง) พบว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นคิดเป็น 15 และ 14 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง (◆) และกรดฟอสฟอริกเจือจาง (◇) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.1.2 ผลของอุณหภูมิ เวลา และชนิดกรดเจือจางที่ใช้ในการย่อยด้วยกรดเจือจาง

ผลการทดลองข้อ 2.1.1 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกหรือกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ เวลา และชนิดกรดที่มีต่อการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง โดยทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง 2 ชนิด คือ กรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิ 115 ถึง 130 องศาเซลเซียส และที่เวลาต่าง ๆ คือ 15 30 60 และ 90 นาที

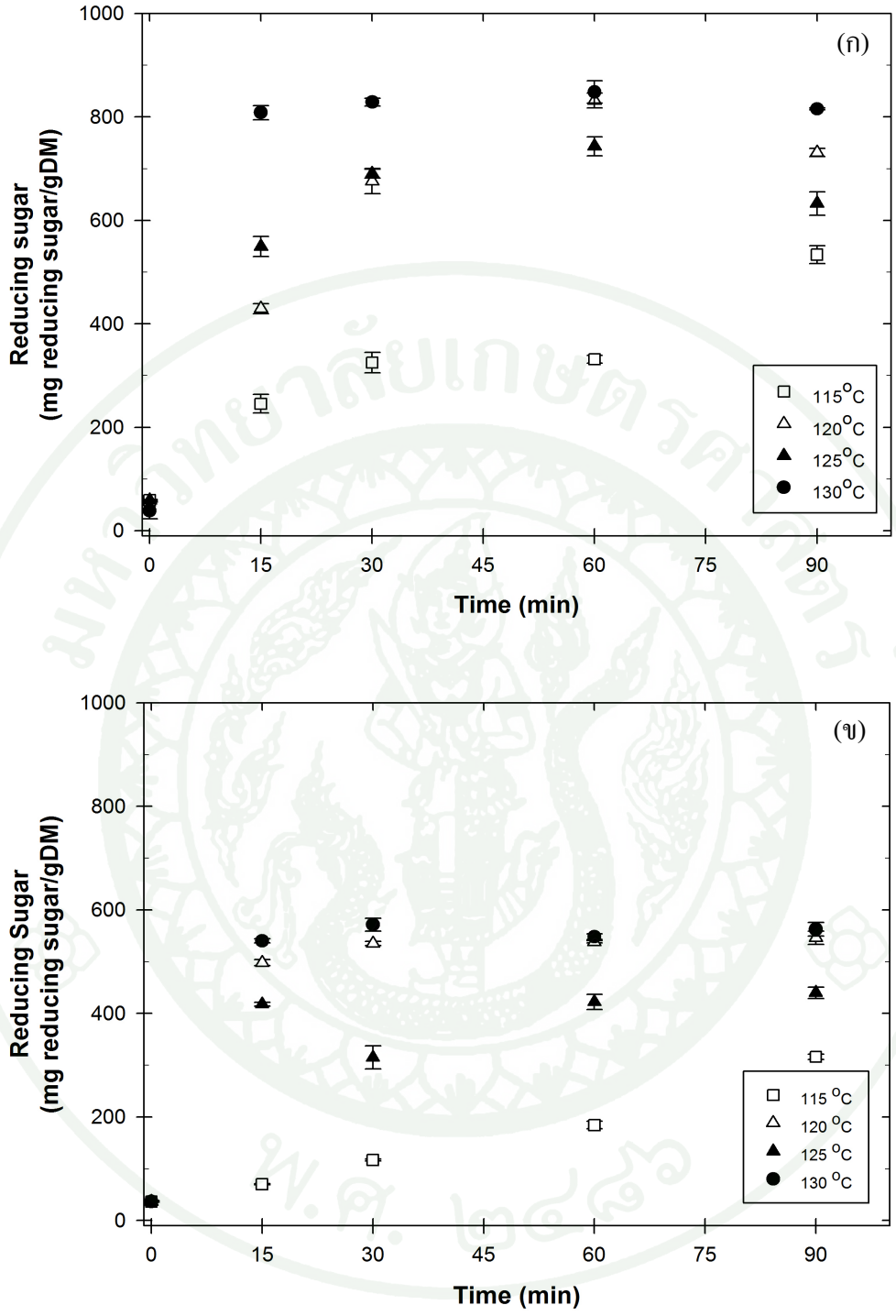
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาพที่ 10ก) พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เพราะการเพิ่มอุณหภูมิทำให้สารละลายกรดเจือจางสามารถแพร่เข้าไปในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสได้เร็วขึ้น โดยสารละลายกรดจะทำให้เฮมิเซลลูโลสพองและย่อยเฮมิเซลลูเลสได้ (Galbe and Zacchi, 2007) และสารละลายกรดสามารถเข้าสลายพันธะไกลโคซิดิกในแป้งเพื่อให้แป้งมีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้ดีขึ้น (Hoover, 2000; Reusch, 2004)

เมื่อพิจารณาผลของเวลาต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส สามาถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดและมีการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นเพียง 15 นาที และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหรือคงที่เมื่อระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นนานขึ้น ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นที่เวลา 60 นาที ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิอื่นๆ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 808.35-848.26 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง แต่เมื่อทำการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 120 และ 125 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นนานขึ้น โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นนาน 60 นาที และมีแนวโน้มลดลงหรือคงที่เมื่อทำการบำบัดขั้นต้นจนถึง 90 นาที โดยการใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 831.90 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เมื่อใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส แต่เมื่อทำการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียสพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นนานขึ้นจนถึง 90 นาทีและอาจมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นนานกว่า 90 นาทีแต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิอื่นๆ

การใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียสในการบำบัดขั้นต้น พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วเมื่อทำการบำบัดขั้นต้นเพียง 15 นาที ทั้งนี้เป็นเพราะอุณหภูมิที่สูงทำให้ใช้เวลาในการย่อยที่สั้นลง แต่สามารถให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกับการย่อยที่อุณหภูมิต่ำกว่าแต่ใช้เวลาที่นานขึ้น (Brethauer and Wyman, 2010) และเมื่อระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นนานขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มคงที่หรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยในการทดลองนี้พบว่าการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีจะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ใกล้เคียงกับการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ก) และกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ข) ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ; 115 องศาเซลเซียส (□), 120 องศาเซลเซียส (△), 125 องศาเซลเซียส (▲), 130 องศาเซลเซียส (●)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเพิ่มระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่นานขึ้น ทำให้สารละลายกรดมีโอกาสในการทำปฏิกิริยากับแป้งในกากมันสำปะหลังมากขึ้น ซึ่งสารละลายกรดจะทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของแป้ง โดยย่อยพันธะแอลฟา 1,4 หรือแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของแป้ง การแตกพันธะไกลโคซิดิกทำให้แป้งมีขนาดเล็กลงและเปลี่ยนเป็นสารละลายแป้งได้มากขึ้น (Agu *et al.,* 1997; Hoover, 2000) นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่าการย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 120 และ 125 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ซึ่งเป็นเพราะเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มมากขึ้น อาจทำให้กรดเกิดการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ โดยกรดจะทำหน้าที่เป็นตัวดึงโมเลกุลของน้ำออกจากน้ำตาลรีดิวซ์ และทำให้น้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบเฟอร์ฟูรัลหรืออนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรัล และเป็นเหตุทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ลดลงนั่นเอง (วิไลวรรณ, 2552; Negro *et al.*, 2003; Cheng, 2010) อีกทั้งเมื่อการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิสูงและมีการใช้กรด ส่งผลให้เกิดพอลิเมอร์ใหม่ของกลูโคสหรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อาจส่งผลให้น้ำตาลกลูโคสในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง เนื่องจากน้ำตาลหรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นใหม่อาจไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ เช่น ซูโครส เป็นต้น จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าลดลง (Lee *et al.*, 2009; Tasic *et al.*, 2009) ผลของอุณหภูมิและเวลาในการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางในงานศึกษานี้ชี้ว่าการย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และการใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 15 ถึง 60 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณที่สูงใกล้เคียงกัน โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดอยู่ในช่วง 808.35-848.26 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ

ภาพที่ 10ข แสดงผลของอุณหภูมิและเวลาในการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยพบว่าอุณหภูมิและเวลาในการย่อยมีผลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง อุณหภูมิส่งเสริมการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยที่อุณหภูมิ 120 และ 130 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดในงานศึกษานี้ ซึ่งการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 120 และ 130 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างรวดเร็วใน 15 นาทีแรกของการย่อยและมีปริมาณสูงสุดที่เวลาในการย่อย 30 นาที โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 535.44 และ 541.57 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่การย่อยที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส น้ำตาลรีดิวซ์ถูกผลิตเพิ่มขึ้นตามเวลาการบำบัดขั้นต้นที่นานขึ้น แต่มีสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำเมื่อเทียบกับการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างไรก็ตาม การย่อยที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ต่ำกว่าที่ 120 และ 130 องศาเซลเซียส ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายสาเหตุที่ชัดเจนได้ในงานศึกษานี้ ผลการศึกษาข้างต้นแสดง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดอยู่ในช่วง 535.44-541.57 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูงสุดในการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกมีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก คิดเป็นร้อยละ 53 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Um *et al.* (2003) ที่ศึกษาการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกและกรดฟอสฟอริก พบว่ากรดซัลฟูริกมีประสิทธิภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และแป้งได้ดีและให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้กรดฟอสฟอริก เพราะมีความเป็นกรดที่แรงกว่ากรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นเดียวกัน จึงทำให้กรดซัลฟูริกสามารถเข้าละลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนินและสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีกว่าการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก ดังนั้น การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จึงถูกเลือกเพื่อเป็นชนิดกรดที่เหมาะสมในการศึกษานี้

ทั้งนี้ สภาวะที่ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดจากการใช้กรดซัลฟูริกในงานศึกษาที่เลือกพิจารณามีอยู่ 3 สภาวะ คือ การย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และการใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 15 ถึง 60 นาที โดยในงานศึกษานี้พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการใช้อุณหภูมิที่ 120 และ 130 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

รายงานของ Fontana (2008) พบว่า การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงจะก่อให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ คือ สารเฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซีเมธทิลเฟอร์ฟูรัล และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Campo *et al.* (2006) ที่ทำการบำบัดขั้นต้นกากถั่วซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 49 ของน้ำหนักแห้งด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางที่อุณหภูมิ 110 ถึง 130 องศาเซลเซียสพบว่า เมื่อทำการบำบัดขั้นต้นกากถั่วด้วยที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เริ่มมีสารพิษหรือตัวยับยั้งเกิดขึ้น และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โดยให้ผลไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Palmarola-Adrados *et al.* (2005) ที่ทำการบำบัดขั้นต้นรำข้าวสาลี (แป้งประมาณร้อยละ 34 โดยน้ำหนัก) ด้วยกรดที่อุณหภูมิ 120 ถึง 150 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการบำบัดขั้นต้นมีผลต่อการเกิดสารพิษหรือสารยับยั้ง โดยปริมาณสารพิษเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Palmqvist, 2000) และเมื่อพิจารณาผลของเวลาที่ใช้พบว่าที่อุณหภูมิน้อยกว่า 150 องศาเซลเซียส เวลาในการบำบัดขั้นต้นมีผลต่อปริมาณสารพิษที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยปริมาณของสารพิษที่เกิดขึ้นมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่ออุณหภูมิในการบำบัดขั้นต้นมากกว่า 150 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณสารพิษที่เกิดขึ้น ดังนั้นสภาวะการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เป็นอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางในงานศึกษานี้

2.2 การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ

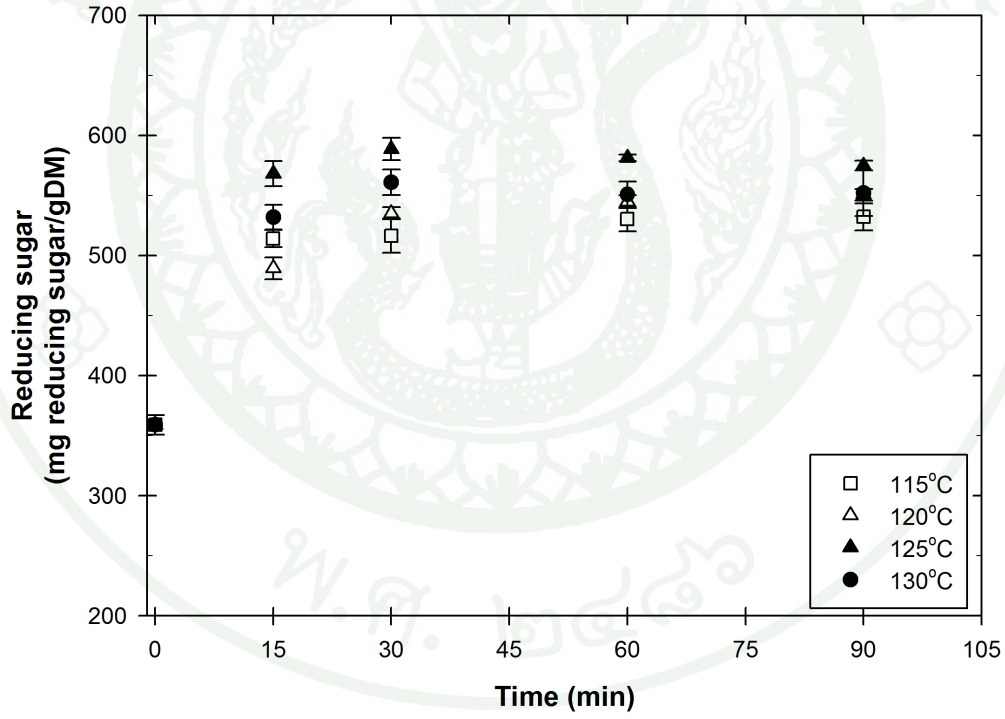
2.2.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและวัตถุดิบที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นเอนไซม์จะสามารถเข้าย่อยเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ง่ายขึ้น (Moiser *et al.*, 2005) งานศึกษานี้ทำการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังโดยใช้ปริมาณของแข็งร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 115 120 125 และ 130 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 30 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นย่อยเบื้องต้นด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากสภาวะควบคุม (การย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง)

ผลการทดลองในภาพที่ 11 พบว่าเมื่อเวลาในการบำบัดขั้นต้นนาน 15 นาที ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบำบัดขั้นต้นมากกว่า 15 นาที ระยะเวลาการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย ซึ่งผลของเวลาที่ได้มีแนวโน้มเหมือนกันในทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา โดยเมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 587.43 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เมื่อการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการบำบัดขั้นต้น (360.33 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง) ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าย่อยและผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น 227.10 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง (คิดเป็นร้อยละ 63) โดยความร้อนและน้ำทำให้พันธะไฮโดรเจนในแป้งคลายตัว โมเลกุลของน้ำจะเข้ามาจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ ทำให้เม็ดแป้งดูดน้ำและเกิดการพองตัว โดยการนี้แป้งเกิดการพองตัวที่เรียกว่าเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ทำให้อยู่ในสภาพที่เป็นสารละลายแป้งมากขึ้น (กล้าณรงค์และเกื้อกูล, 2550; Han and Lim, 2004) สารละลายแป้งมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง จึงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยาระหว่างแป้งกับเอนไซม์ ดังนั้น เอนไซม์จึงสามารถย่อยแป้งได้ดีขึ้นและผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น (Agu *et al.,* 1997; Dogaris *et al.*, 2009) อีกทั้งการใช้ความร้อนและน้ำเป็นการทำลายพันธะและย่อยเฮมิเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าย่อยแป้งและเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังได้ง่ายขึ้น (Hendriks and Zeeman, 2009)



ภาพที่ 11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง; 115 องศาเซลเซียส (□), 120 องศาเซลเซียส (△), 125 องศาเซลเซียส (▲), 130 องศาเซลเซียส (●)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hideno *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการการบำบัดขั้นต้นเพิ่มขึ้นสามารถกำจัดโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส อีกทั้งยังเป็นการลดความเป็นผลึกเซลลูโลสและส่วนที่เป็นโครงสร้างซับซ้อนของแป้งได้มากขึ้น ส่งผลให้แป้งมีการพองตัวและสามารถแตกเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง (Han and Lim, 2004) ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้แก่วัตถุดิบ ทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพการเข้าทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิในการศึกษานี้ พบว่าอุณหภูมิต่างๆ มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เป็นเพราะมันสำปะหลังผ่านกระบวนการสกัดแป้งและอบแห้งแป้งที่ใช้อุณหภูมิสูง (180-200 องศาเซลเซียส) (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2550) ในขั้นตอนการผลิตแป้งมันสำปะหลังมาแล้ว ทำให้อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้อาจสลายโครงสร้างได้เพียงส่วนหนึ่งและมีผลไม่แตกต่างกันมากนักในช่วงอุณหภูมิที่ศึกษา งานศึกษานี้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการย่อยเบื้องต้นด้วยเอนไซม์อะไมเลส คือ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 587.43 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางและการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางสามารถผลิตปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูง ทั้งนี้เป็นเพราะกรดสามารถสลายโครงสร้างที่ซับซ้อนและเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งและเซลลูโลสได้ดีกว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ (Srinorakutara *et al.*, 2006) และการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงชนิดเดียวทำให้การเข้าย่อยเป็นไปได้ไม่ดีนัก เนื่องจากแป้งในกากมันสำปะหลังเกาะอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเซลลูโลส จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าน้อยกว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง

2.2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ (เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส) ย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ

กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบหลักเป็นพวกแป้งและเส้นใย ซึ่งเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยแป้ง คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ส่วนเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเส้นใย คือ เอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากแป้งในกากมันสำปะหลังจะเกาะอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์พืชหรือเซลลูโลส จากการศึกษาของ Rattanachomsri *et al.* (2009) ที่พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงอย่างเดียวจะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 206 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรัมน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลส แพคติเนส และเฮมิเซลลูเลสก่อนทำการย่อยร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 571 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การเติมเอนไซม์ย่อยเส้นใยเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์จะย่อยเส้นใยทำให้แป้งที่อาจติดอยู่ในโครงสร้างของเส้นใยเป็นอิสระมากขึ้น (Prasad *et al.*, 2007) ทำให้เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถย่อยและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น ดังนั้นเพื่อให้การย่อยกากมันสำปะหลังอย่างมีประสิทธิภาพและให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (Srichuwong *et al.*, 2009) งานศึกษานี้จึงทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยเซลลูโลสเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลและเพื่อให้มีแป้งอิสระมากขึ้น หลังจากนั้นย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และย่อยครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยจะพิจารณาสภาวะที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

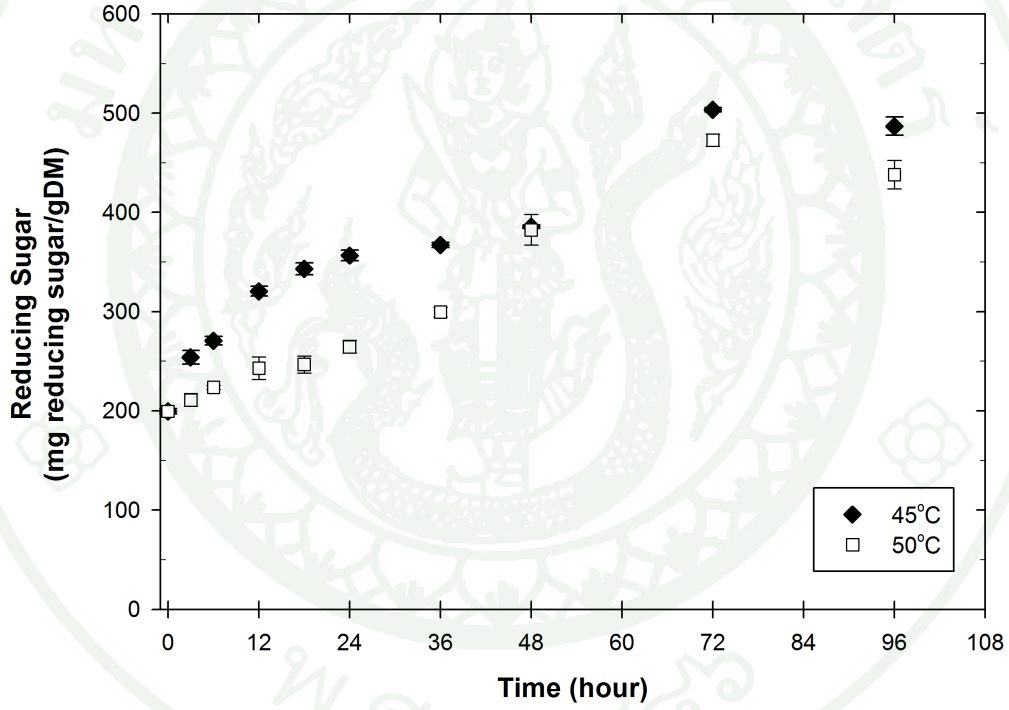
ก. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

กากมันสำปะหลังมีเส้นใยเป็นองค์ประกอบร้อยละ 15 โดยเส้นใยประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน งานศึกษานี้จึงทำการบำบัดขั้นต้นและย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสก่อนย่อยต่อด้วยเอนไซม์ย่อยแป้ง ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ภาพที่ 12) พบว่าเวลาในการย่อยมีผลที่ชัดเจนต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการเพิ่มระยะเวลาในการย่อยนานขึ้นจนถึง 72 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถย่อยเซลลูโลสในสารละลายกากมันสำปะหลังและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 503.39 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น 303.87 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ และไม่มีการเติมเอนไซม์ (199.52 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยจาก 72 จนถึง 96 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง อาจเป็นเพราะเอนไซม์เซลลูเลสดูดซับบนเซลลูโลสที่ไม่สามารถผันกลับได้ทำให้แอกทิวิตี้ของเอนไซม์เซลลูเลสลดลง (Converse *et al.*, 1988)

เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในการศึกษานี้ พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กว่าการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการย่อยนาน 72 ชั่วโมง การย่อยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 503.39 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส คือ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Sun and Cheng, 2002; Prasad *et al.*, 2007) ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 2 อุณหภูมิอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ในการศึกษาขั้นต่อไปเลือกใช้การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพราะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดในการศึกษานี้ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Inoue *et al.* (2008) ที่ทำการย่อยชิ้นไม้ยูคาลิปตัส (ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร) และการศึกษาของ Hideno *et al.* (2009) ที่ทำการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยพบว่าการใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด



ภาพที่ 12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส; 45 องศาเซลเซียส (◆); 50 องศาเซลเซียส (□).

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

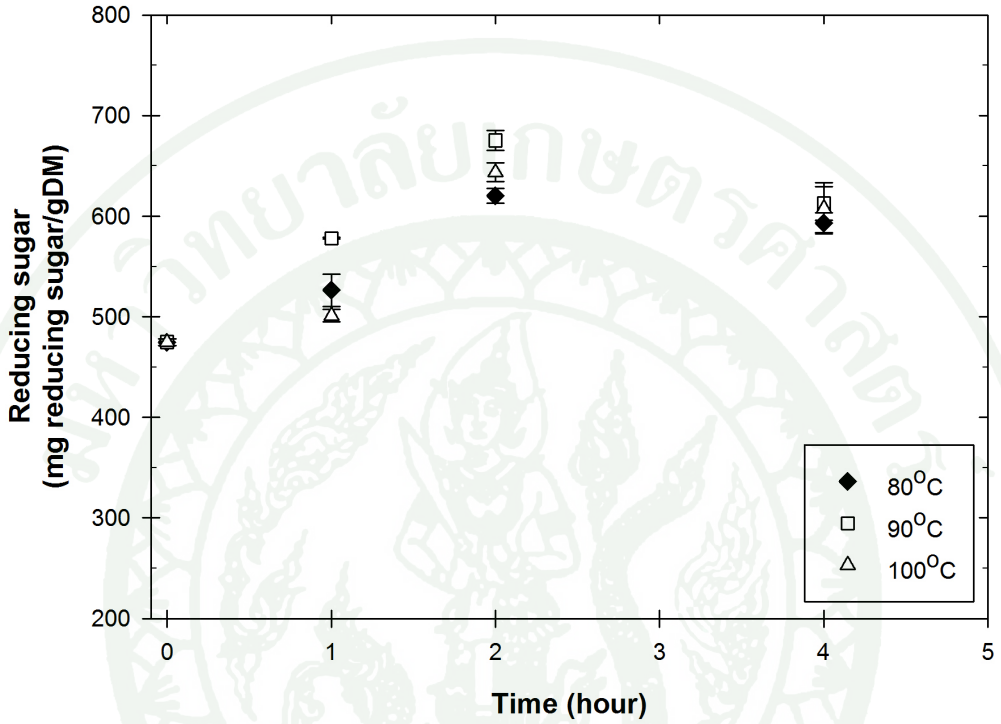
ข. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับแอลฟาอะไมเลส

หลังจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแล้ว นำกากมันสำปะหลังมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 13 เมื่อพิจารณาผลของเวลาในการย่อย พบว่าเมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังที่ระยะเวลานานขึ้นจนถึง 2 ชั่วโมง สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 675.41 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง โดยการเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น 200.52 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เมื่อเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของกัลยา (2546) ที่รายงานว่าเมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังและเปลือกมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดร้อยละ 31.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างไรก็ตาม ในงานศึกษานี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการย่อยนานกว่า 2 ชั่วโมง โดยให้ผลที่เหมือนกันในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ทั้งนี้การลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์อาจเกิดจากน้ำตาลกลูโคสเกิดการจับกันเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น ซึ่งจะเกิดเป็นพอลิแซคคาไรด์โมเลกุลใหญ่ ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2550; Descotes, 1992; Cheng, 2010)

เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิ พบว่าการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิสูงขึ้น สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 90 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 100 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าต่ำลงเล็กน้อย ซึ่งผลที่ได้แสดงว่าการย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส อาจมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้ลดประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยากับวัตถุดิบ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ 90 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 675 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ซึ่งให้ผลของอุณหภูมิในงานศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของพักตร์ประไพ (2546) ที่ทำการย่อยกากมันสำปะหลังเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 69 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Govindasamy *et al.* (1992) ที่ทำการย่อยแป้งสาคูด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยการย่อยแป้งสาคูที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อกรัมแป้ง จากรายงานของ Pandey *et al.* (2000) พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพเช่นกัน



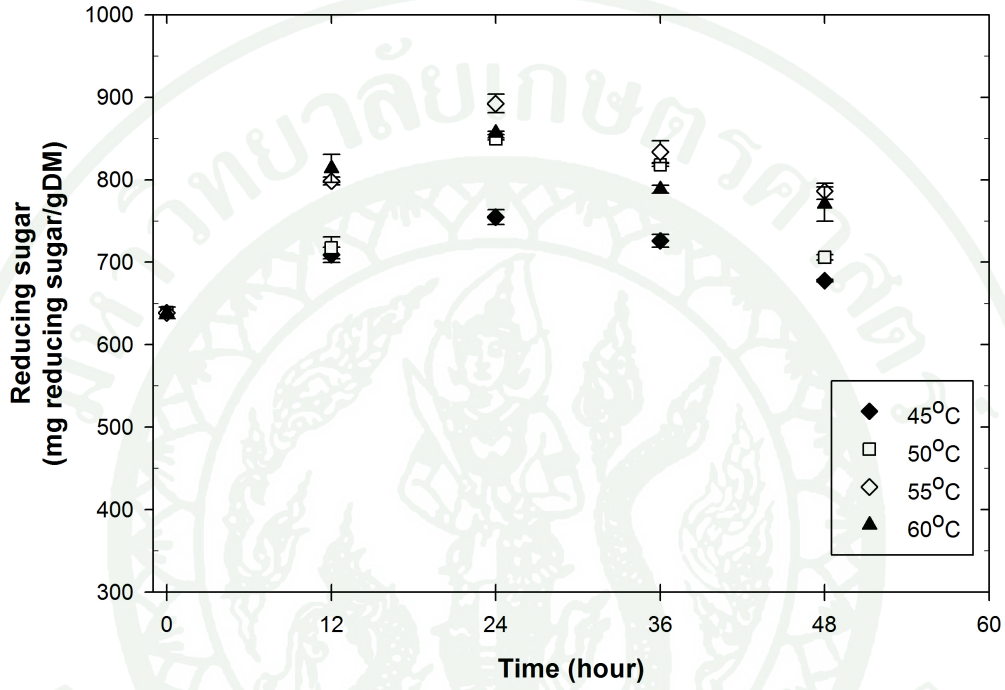
ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลส; 80 องศาเซลเซียส (◆); 90 องศาเซลเซียส (□); 100 องศาเซลเซียส (△)

ค. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสร่วมกับกลูโคอะไมเลส

หลังจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลสที่สภาวะที่เหมาะสมแล้ว นำกากมันสำปะหลังย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 14 ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยมากขึ้น ปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อระยะเวลาในการย่อยนานกว่า 24 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง เนื่องจากกลูโคสสามารถทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันได้ทำให้เกิดพอลิเมอร์ใหม่ของกลูโคสหรือโอลิโกแซคคาไรด์ ดังนั้นน้ำตาลรีดิวซ์จึงมีค่าลดลง (Cheng, 2010) ผลการทดลองมีแนวโน้มเดียวกันทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส; 45 องศาเซลเซียส (◆); 50 องศาเซลเซียส (□); 55 องศาเซลเซียส (◇); 60 องศาเซลเซียส (▲)

ผลการทดลองในภาพที่ 14 พบว่าการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าเพิ่มมากขึ้น โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 899.11 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลังเมื่อทำการย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น 264.93 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เมื่อเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสและแอลฟาอะไมเลส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถเข้าย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังและผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ลดลง ซึ่งการที่อุณหภูมิและเวลามีอิทธิพลต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยา แต่การใช้อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่าค่าเหมาะสม ส่งผลให้ประสิทธิภาพหรือการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง (Sun and Cheng, 2002)

การพิจารณาผลเบื้องต้นของเอนไซม์ที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำโดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้สูงสุดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ในขั้นตอนข้างต้นกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จากการย่อยเบื้องต้นด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงชนิดเดียวในขั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมของการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ โดยผลที่ได้แสดงว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด มีค่าสูงกว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงชนิดเดียวถึง 1.5 เท่า ทั้งนี้เป็นเพราะแป้งในกากมันสำปะหลังบางส่วนอยู่ในโครงสร้างผนังเซลล์ของพืช (กัลยา, 2546) ดังนั้น การเติมเอนไซม์เซลลูเลสเป็นการย่อยโครงสร้างของเส้นใยทำให้แป้งที่อาจติดอยู่ในโครงสร้างของเส้นใยเป็นอิสระมากขึ้น (Prasad *et al.*, 2007) ทำให้เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถย่อยและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากขึ้น เมื่อปริมาณแป้งอิสระเพิ่มมากขึ้น ทำให้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถเข้าย่อยและเปลี่ยนแป้งอิสระให้เป็นน้ำตาลได้มากขึ้น โดยน้ำตาลที่ได้จะเป็นสารละลายน้ำตาลผสมของกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ ดังนั้นการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยครั้งสุดท้าย เพื่อทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นรูปของน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล (Rattanachomsri *et al*, 2007; Cheng, 2010) นอกจากนี้การย่อยเส้นใยสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลได้โดยตรง จึงเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อีกทางหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม สภาวะที่ใช้ย่อยของแอลฟาอะไมเลสในการศึกษาสภาวะทั้งสองข้างต้นแตกต่างกัน คือ การใช้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการใช้ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่สภาวะทั้งสองสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 203.50 และ 210.52 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลข้างต้นเพื่อเปรียบเทียบเบื้องต้นถึงผลของการใช้เอนไซม์ชนิดเดียวหรือการใช้เอนไซม์ร่วมกันหลายชนิดที่มีต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในงานศึกษานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากเอนไซม์ชนิดต่างๆ ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แต่ละประเภท คือ เอนไซม์ย่อยเส้นใย (เซลลูเลส) และเอนไซม์ย่อยแป้ง (แอลฟาอะไมเลสและกลูโอะไมเลส) โดยคำนวณประสิทธิภาพของเอนไซม์แต่ละประเภทจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ภายใต้สภาวะที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สภาวะควบคุม (การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำที่ไม่เติมเอนไซม์หรือเติมเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียว) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้นจากสภาวะควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ เท่ากับ 303.87 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยแป้ง คือ การย่อยขั้นแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและย่อยครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์กลูโอะไมเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเมื่อเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเอนไซม์ย่อยแป้งกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 424.22 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง ผลการศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์กลุ่มย่อยแป้งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังที่พบว่ามีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น เอนไซม์ย่อยแป้งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

แต่ทั้งนี้หากทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ย่อยแป้งเพียงอย่างเดียวตามสภาวะที่เหมาะสม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้อาจมีค่าต่ำกว่าค่าที่รายงานข้างต้น เพราะโครงสร้างเซลลูโลสอาจขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง ดังนั้น การใช้เอนไซม์ย่อยเส้นใยจึงมีความสำคัญในย่อยกากมันสำปะหลัง เพราะช่วยย่อยโครงสร้างเซลลูโลสและทำให้แป้งหลุดออกและเป็นอิสระมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ จึงช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้งให้สามารถทำปฏิกิริยากับแป้งได้ดีขึ้น

ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของจิรศักดิ์ (2547) ที่ทำการย่อยกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดส ตามลำดับ ที่พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า เมื่อเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและอะไมโลกลูโคซิเดส เนื่องจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นการย่อยเซลลูโลสและช่วยทำให้โมเลกุลของแป้งถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ทำให้แป้งอยู่ในรูปอิสระมากขึ้น สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้มากขึ้น และเอนไซม์เซลลูเลสสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลได้ (Yoonan *et al*., 2005; Rattanachomsri *et al,* 2007) และงานศึกษาของชลดา (2546) ให้ผลในลักษณะเดียวกันที่ว่า การเติมเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสย่อยกากมันสำปะหลังก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส จะทำให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยเส้นใยและเอนไซม์ย่อยแป้ง

ประเภทเอนไซม์	**สภาวะที่เหมาะสม**	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)**		
		สภาวะควบคุม	**สูงสุด**	**ปริมาณที่เพิ่มขึ้น**
เอนไซม์ย่อยเส้นใย	เอนไซม์เซลลูเลส (45 องศาเซลเซียส, 72 ชั่วโมง)	199.52[a]	503.39	303.87
เอนไซม์ย่อยแป้ง	การย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (90 องศาเซลเซียส, 2 ชั่วโมง) และการย่อยครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (55 องศาเซลเซียส, 24 ชั่วโมง)	474.89[b]	899.11	424.22

หมายเหตุ: [a] สภาวะควบคุมคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ และไม่มีการเติมเอนไซม์

[b] สภาวะควบคุมคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส

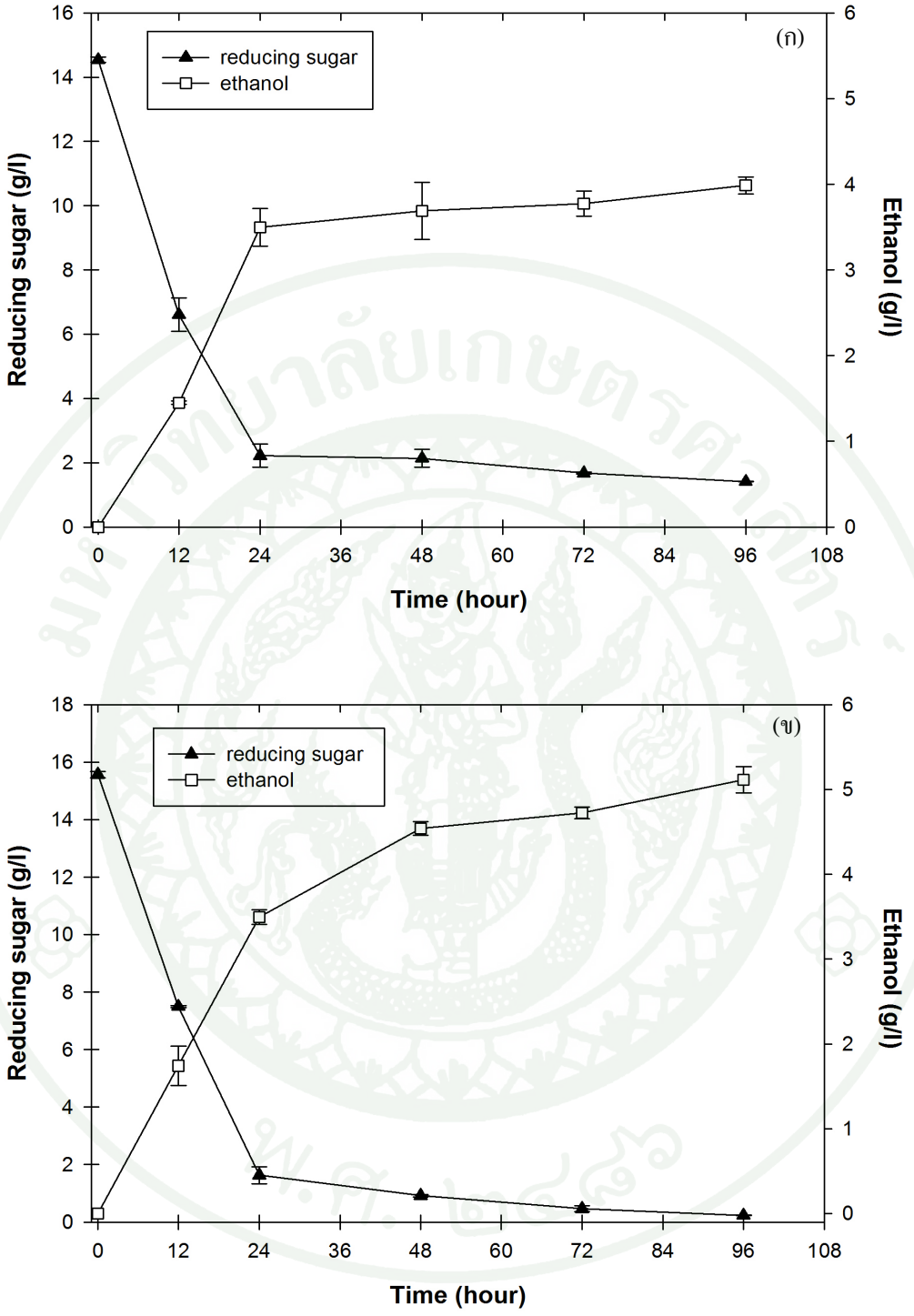
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลการศึกษาเบื้องต้นของการผลิตเอทานอลจากการหมักน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลจากการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก (1) การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ (2) การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.2 และหมักด้วยยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองเป็นดังนี้

การหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 14.54 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 15ก) พบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรกของการหมักและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว และหลังจากชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ปริมาณเอทานอลค่อนข้างมีค่าคงที่ ซึ่งเป็นเพราะน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปที่ยีสต์สามารถย่อยเพื่อใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตและใช้ในการผลิตเอทานอลได้มีปริมาณน้อยลง โดยน้ำตาลที่เหลือเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือเซลโลไบโอส (กัลยา, 2546; ชลดา, 2546; อิสรี, 2550) งานศึกษานี้พบว่าการใช้กากมันสำปะหลังที่บำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 96 โดยมีค่าเท่ากับ 3.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารเท่ากับ 0.303 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ดังตารางที่ 6 โดยผลผลิตเอทานอลคิดจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ยีสต์ใช้ไปในขั้นตอนการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลในขั้นตอนการหมักสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ก) และการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (ข) ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 15.57 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 15ข) พบว่ามีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก ส่วนปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตามเวลาการหมัก และผลผลิตเอทานอลได้สูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 96 โดยมีค่าเท่ากับ 5.11 กรัมต่อลิตร และเมื่อคิดปริมาณเอทานอลที่ได้เทียบกับความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไปพบว่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารเท่ากับ 0.333 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (ethanol yield) ในขั้นตอนการหมักสารละลายกากมันสำปะหลังด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ปัจจัยต่างๆ	การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง*	การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับเอนไซม์**
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	14.54	15.57
ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก (กรัมต่อลิตร)	3.99	5.11
ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	0.303	0.333
ชนิดของน้ำตาลในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์	กลูโคส ไซโลส กาแลกโตส และอะราบิโนส	กลูโคสและกาแลกโตส

หมายเหตุ: * การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์

** การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอลและผลได้ของเอทานอลจากงานวิจัยนี้เทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้จากการศึกษานี้ พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของกัลยา (2546) และพุทธิพร (2552) แต่ความเข้มข้นที่ได้มีค่าต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล อาจมีคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลของยีสต์ ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ถ้าไม่มีการระบายออกจากระบบทำให้ความดันในการหมักสูงขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการหมักลดลง (Bai *et al.,* 2008) นอกจากนี้การหมักเป็นกระบวนการคายความร้อน ซึ่งมากเกินไปทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น และทำให้การทำงานของเชื้อยีสต์ในการใช้น้ำตาลลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suresh *et al.* (1999) ที่การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากแป้งสาลีด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น ความเข้มข้นของเอทานอลลดลง และการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก อาจมีสารพิษหรือสารยับยั้งส่งผลให้ไปยับยั้งการทำงานของยีสต์ทำให้ประสิทธิภาพในการหมักลดลง (Agu *et al.*, 1997; Sun and Cheng, 2002; Lu *et al.,* 2008)

เมื่อพิจารณาค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารในการศึกษานี้เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ พบว่ามีค่าค่อนข้างต่ำ อาจเป็นเพราะในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ประกอบด้วยน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทส ซึ่งเชื้อยีสต์แต่ละชนิดจะสามารถใช้น้ำตาลแตกต่างกัน (Hernandez-Salas *et al.*, 2009) โดยน้ำตาลที่เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแลกโตส ฟรุกโตส มอลโตส (Scragg, 2009) นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงอาจเกิดจากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ มีการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต ไม่ใช่เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Bai *et al.*, 2008) ด้วยเหตุผลข้างต้น ทำให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่างานวิจัยอื่นๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลเบื้องต้นจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีการต่างๆ

การบำบัดขั้นต้น	เชื้อจุลินทรีย์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	อ้างอิง
เอนไซม์เซลลูเลสและแพคติเนส	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596	24	89.20	36.19	0.405	ชลดา (2546)
กรดซัลฟูริกเจือจาง	*Saccharomyces cerevisiae* 5049	18	10.85	4.93	0.454	กัลยา (2546)
ความร้อนและน้ำ	*Saccharomyces cerevisiae* 5049	18	5.20	2.28	0.438	กัลยา (2546)
เอนไซม์เซลลูเลสและแพคติเนส	*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596	24	89.20	60.20	0.675	ธีรภัทร และคณะ (2549)
โซเดียมไฮดรอกไซด์	*Zymomonas mobilis* TISTR 405	60	25.00	10.60	0.424	พรรณวิไล (2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 (ต่อ)

การบำบัดขั้นต้น	เชื้อจุลินทรีย์	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหาร (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์)	อ้างอิง
กรดซัลฟูริกเจือจาง	*Saccharomyces diastaticus* KM 2047	24	7.17	5.47	0.763	พุทธิพร (2552)
ความร้อนและน้ำ	*Saccharomyces cerevisiae*	72	37.20	18.60	0.500	Kosugi *et al.* (2009)
กรดซัลฟูริกเจือจาง	*Saccharomyces cerevisiae*	96	14.54	3.99	0.303	งานวิจัยนี้
ความร้อนและน้ำร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	*Saccharomyces cerevisiae*	96	15.57	5.11	0.333	งานวิจัยนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่บำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางกับการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์

ผลการศึกษาพบว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์หลายชนิดเป็นวิธีที่จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์เข้าทำการย่อยได้ง่ายขึ้น อีกทั้งเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูง ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ในปริมาณเพิ่มขึ้นและลดการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง เช่น สารเฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซิเมธทิลเฟอร์ฟูรัล และกรดอะซิติก เป็นต้น (Palmqvist and Hagerdal, 2000) จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลชนิดที่ยีสต์สามารถใช้เพื่อผลิตเอทานอลได้ (Bai *et al*., 2008) แต่ในการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง ปฏิกิริยาในการย่อยกากมันสำปะหลังเกิดแบบสุ่ม เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีน้ำตาลกลูโคส ไซโลส กาแลกโตส และอะราบิโนส ซึ่งน้ำตาลไซโลสและอะราบิโนสเป็นรูปของน้ำตาลที่เชื้อยีสต์ *Saccharomycese cerevisiae* ไม่สามารถใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ นอกจากนี้จากงานวิจัยที่ทำการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางรายงานว่าการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางจะก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เช่น สารเฟอร์ฟูรัล ไฮดรอกซิเมธทิลเฟอร์ฟูรัล และกรดอะซิติก เป็นต้น โดยปะปนอยู่ในสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ซึ่งเป็นตัวยับยั้งและเป็นอุปสรรคในขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล (พรรณวิไล, 2545; พักตร์ประไพ, 2546; Prasad *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2008) ดังนั้น การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เป็นวิธีที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง โดยศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการย่อยแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์และหมักเป็นเอทานอล สรุปผลการทดลองได้ดังนี้

กากมันสำปะหลังเป็นของเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยองค์ประกอบหลักคือ แป้ง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 60.80 ของน้ำหนักแห้งรองลงมาคือ เส้นใยร้อยละ 15.24 ซึ่งแป้งที่หลงเหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังจะเกาะอยู่กับโครงสร้างผนังเซลล์ของพืช เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยแป้งและเซลลูโลส การบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังจะเป็นการทำลายโครงสร้างของเส้นใย และเป็นการลดขนาดโมเลกุลของเม็ดแป้งในกากมันสำปะหลัง ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์และการผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์และการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีที่แตกต่างกัน คือ การบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง และการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำร่วมกับเอนไซม์ และทำการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเชื้อยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริก โดยการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ความร้อนด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 831.90 มิลลิกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง และสามารถผลิตเอทานอลได้ 3.99 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อคิดเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารเท่ากับ 0.303 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์

การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 587.43 มิลลิกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง แต่เมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปรียบเทียบกับการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการด้วยเอนไซม์หลายชนิด คือ ทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการย่อยแป้งครั้งแรกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย่อยครั้งสุดท้ายด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุดเท่ากับ 899.11 มิลลิกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง เนื่องจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก เพราะแป้งในกากมันสำปะหลังอาจอยู่ในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ในการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยเอนไซม์ สามารถผลิตเอทานอลได้ 5.11 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารอาหารเท่ากับ 0.333 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์

ผลการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์หลายชนิดเป็นวิธีที่จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการย่อยด้วยกรด เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยกรดมีน้ำตาลชนิดที่เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถนำไปใช้ในการหมักเพื่อผลิตเป็นเอทานอลได้ อีกทั้งการบำบัดขั้นต้นด้วยกรดเจือจางทำให้เกิดผลพลอยได้ที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ดังนั้น การบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เป็นวิธีที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังในงานศึกษานี้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการใช้การบำบัดขั้นต้นด้วยกายภาพร่วมกับทางชีวภาพ เพื่อเป็นการลดผลกระทบที่อาจเกิดจากการบำบัดขั้นต้นด้วยเคมี และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ อีกทั้งยังเป็นการลดความเข้มข้นของเอนไซม์ในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์

2. ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการลดขั้นตอนในการย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น การใช้เอนไซม์ผสมเพื่อลดขั้นตอนในการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือควรมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยเส้นใยชนิดอื่น เช่น แพคติเนส ไซลาเนส เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแตกพันธะของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณสูงเพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ควรศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยให้ชัดเจนขึ้น เพื่อจะเลือกชนิดยีสต์ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลให้ได้ประสิทธิภาพยิ่งขึ้น รวมไปถึงการวิเคราะห์สารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการบำบัดขั้นต้นด้วยวิธีต่างๆ

4. การหมักเพื่อผลิตเอทานอล ควรมีการศึกษาถึงรูปแบบในการหมักเอทานอลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตให้สูงขึ้น เช่น วิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน การหมักแบบกึ่งกะ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2551. **ผลิตเอทานอลเพื่อแก๊สโซฮอล์ (Gasohol)**. กระทรวงพลังงาน. แหล่งที่มา: http://www.ieat.go.th/escc/index.php?option=com_content&view=article&id=34:-gasohol&catid=14:2008-12-24-14-18-33&Itemid=36, 25 มีนาคม 2552.

_____. 2554. **สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย เดือนมิถุนายน 2553**. กระทรวงพลังงาน. แหล่งที่มา: http://www.energysavingmedia.com/news/page.php?a=10&n=50&cno=397, 17 มกราคม 2554.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2552. **การศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง ประจำปี 2552**. กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2540. **คู่มือการจัดการสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันดัดแปร และแป้งมันแปรรูป**. กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2550. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์สถานภาพการผลิตหัวมันสำปะหลังและคุณภาพหัวมันสำหรับการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

_____ และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2550. **เทคโนโลยีของแป้ง**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, ปฐมา จาตกานนท์, เอ็จ สโรบล และรุ่งทิวา วันสุขศรี. 2553. **การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรในประเทศไทย.** แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch53/group06/granarong/index_04.html 17 มกราคม 2554.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กัลยา อยู่นาน. 2546. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลจากเปลือกและกากมันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

กัลยา อยู่นาน, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร และกนก รัตนะกนกชัย. 2548. **การผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรด โดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae*.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. 1-4 กุมภาพันธ์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสาตร์, กรุงเทพฯ.

กิตติศักดิ์ พนิกรณ์. 2551. **การใช้ประโยชน์กากมันสำปะหลังและชานอ้อยในการปรับปรุงดินเค็มสำหรับการปลูกผักบุ้งจีน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

คุณากรณ์ เชื้อสุวรรณ์. 2549. **การคัดเลือกยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชลดา ซื่อสัตย์. 2546. **การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาคร วิชกูล. 2548. **การศึกษาการหมักกากมันสำปะหลังในฟาร์มโค**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย. 2550. **Cellulosic Ethanol ทางเลือกใหม่ของการผลิตเอทานอลในอนาคต**. แหล่งที่มา: http://www.exim.go.th/doc/research/article/10586.pdf, 17 ธันวาคม 2551.

ธันยาภรณ์ เวทย์ไทยสงค์. 2548. **การผลิตเอทานอลจากมันเส้นโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและหมักพร้อมกัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร, เลิศลักษณ์ แก้ววิมล และละเอียด แซ่โง้ว. 2549. การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลในประเทศไทย. **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย** 31(1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธีระพงษ์ สุขสว่าง. 2550. **การหมักกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลสในถังหมักแบบแพคเบด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอนไซม์ทางอาหาร**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. **เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พักตร์ประไพ ประจำเมือง. 2546. **การผลิตกลูโคสไซรัปจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับโรงงานต้นแบบ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

_____ และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. **วารสารศูนย์บริการวิชาการ** 11(4): 28-31.พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. **การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิชิต เดชนีรนาท. 2546. เอทานอลแหล่งพลังงานใหม่ของไทย. **วารสารส่งเสริมการลงทุน** 14(4); 67-69.

พุทธิพร ศรวรเวทย์. 2552. **การพัฒนาการผลิตไบโอเอธานอลจากผักตบชวาและวัสดุเหลือทิ้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมักโดยอะไมโลไลติกยีสต์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิไลวรรณ ลีนะกุล. 2552. **ผลของการทำปฏิกิริยาด้วยกรดเจือจางกับไม้ไผ่ต่อการผลิตเอทานอล**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2549. **การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า**. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ. 2539. **การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN 39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ และผกาพรรณ สกุลมั่น. 2545. **อาหารหมักจากมันสำปะหลัง**. ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตกระบือและโค สถาบันสุวรรณวกจกกสิกิจฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุนีย์ โชตินีรนาท. 2539. **การผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากกากมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์และอัลทราฟิวเทรชัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาวดี ดิสโร.2543. **การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ผสมในเครื่องปฏิกรณ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสริมศักดิ์ มานะเลิศสกุล. 2546. **การผลิตอาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังและกากน้ำตาลโดยการหมักแบบแห้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสภิตา บุญเอนกทรัพย์, จิระพันธ์ เนื่องจากนิล, สินี จิระเสาวภาคย์, สุวิทยย์ เดีย และ วารุณี เดีย. 2540. การจัดการน้ำในโรงงานแป้งมันสำปะหลัง, หน้า 323-339. *ใน* **บทความิจัยและบทความวิชาการประจำปีงบประมาณ 2540**. คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2521. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง**. มอก. 274-2521.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกากมันสำปะหลังรายเดือนปี 2553**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุกูล จันทร์แก้ว, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย จีดจาง. 2551. **การผลิตเอทานอลจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้จังหวัดแพร่.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้

อิสรี รอดทัศนา. 2550. **การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิตเอทานอลจากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Agu, R.C., A.E. Amadife, C.M. Ude, A. Onyia, E.O. Ogu, M. Okafor and E. Ezejiofor. 1997. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (CGW) biomass for ethanol production. **Waste Management** 17:91-96.

AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**. 15th ed. Associating of Official Analytical Chemists International. Washington, D.C.

Badal, C.S., L.B. Iten, M.A. Cotta and Y.V. Wu. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry** 40: 3693-3700.

Bai, F.W., W.A. Anderson and M. Moo-Young. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnolohy Advances** 26:89-105.

Balagopalan, C., R.C. Ray, J.T. Sheriff and L. Rajalekshmy. 1994. Biotechnology for the Value Addition of Waste Water and Residues from Cassava Processing Industries. pp. 609-701. *In* CIAI **The Cassava Biotechnology Network (II): Proceeding of the Second International Scientific Meeting**. Bagor, Indonesia, 22-26 August 1994.

Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic material via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management** 52: 858-875.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Balat, M., H Balat and C. Oz. 2008. Progress in bioethanol processing. **Pregress in Energy and Combustion Science** 34: 551-573.

Ballestero, I., M. Ballesteros, P. Manzanares and M.J. Negro. 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal** 42: 84-91.

Brethauer, S. and C.E. Wyman. 2010. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology** 101:4862-4874.

Campo, I., I. Alegria, M. Zazpe, M. Echeverria and I. Echeverria. 2006. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production. **Industrial Crops and Products** 24:214-221.

Cara, C., E. Ruiz, M. Ballesteros, P. Manzanares, M.J. Negro and E. Castro. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel** 87: 692-700.

Cheng, J. 2010. **Biomass to renewable energy process**. Taylor and Francis group, Boca Raton.

Clark, J. and F. Deswarte. 2008. **Introduction to chemicals from biomass**. A John Wiley and Sons, Ltd, Publication.

Descotes, G. 1992. **Carbohydrates as organic raw materials II**. Weinheim, New York.

Dogaris, I., S. Karapati, D. Mamma, E. Kalogeris and D. Kekos. 2009. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Bioresource Technology** 100:6543-6549.

Fontana, J.D., D.A. Mitchell, O.E. Molina, A. Gaitan, T.M.B. Bonfim, J. Adelmann, A. Grzybowski and M. Passos. 2008. Starch Depolymerization with Diluted Phosphori Acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

and Application of the Hydrolysate in Astaxanthin Fermentation. **Food Technology Bioetechnology** 46(3): 305-310.

Galbe, M. and G. Zacchi. 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethnol Production. **Advance in Biochemistry Engineering/Biotechnology** 108: 41-65.

Han, J.A. and S.T. Lim. 2004. Structural changes of corn starches by heating and stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI system. **Carbohydrate Polymer** 55;265-272.

Hendriks, A.T.W.M. and G. Zeeman. 2009. Review Pretreatments to enhamce the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 100: 10-18.

Hernandez-Salas, J.M., M.S. Villa-Ramirez, J.S. Veloz-Rendon, K.N. Rivera-Hernandez, R.A. Gonzalez-Cesar, M.A. Plascencia-Espinosa and S.R. Trejo-Estrada. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology** 100:1238-1245.

Hideno, A., H. Inoue, K Tsukahara, S. Fujimoto, T. Minowa, S. Inouem T. Endo and S. Sawayama. 2009. Wet disk milling pretreatment with out sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology** 100: 2706-2711.

Hoover, R. 2000. Acid-treated starched . **Food Review International** 16(3):369-392.

Inoue, H., S. Yano, T. Endo, T. Sakaki and S. Sawayama. 2008. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. **Biotechnology for Biofuels** 1.

Konsula, Z. and M. Liakopoulou-Kyriakides. 2009. Hydrolysis of starches by action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry** 39:1745-1749.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kosugi, A., A. Kondo, M. Ueda, Y. Murata, P. Vaithanomsat, W. Thanapase, T. Arai and Y. Mori. 2009. Production of ethanol from cassava pulp *via* fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. **Renewable Energy** 34: 1354-1358.

Kumar, P., D.M. Barrett, M.J. Delwiche and P. Stroeve. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Effient Hydrolysis and Biofuel Prosuction. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 48: 3713-3729.

Kunhi, A.A.M., N.P. Ghildyal, B.K. Lonsane, S.Y. Ahmed and C.P. Natarajan. 1981. Studies on Production of Alcohol from Saccharified Waste Residue Cassava Starch Processing Industries. **Starch** 33: 275-279.

Lee, J.H., J.A. Han and S.T. Lim. 2009. Effect of pH on aqueous structure of maize starches analyzed by HPSEC-MALLS-RI system. **Food Hydrocolloids** 23:1935-1939.

Linde, M., M. Galbe and G. Zacchi. 2008. Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process streams from a dry-mill ethanol plant. **Bioresource Technology** 99: 6505-6511.

Lu, X., Y. Zhang, Y. Liang, J. Yang, S. Zhang and E. Suzuki. 2008. Kinetic studies of hemicellulose hydrolysis of corn stover at atmospheric pressure. **Korean Journal Chemistry Engineering** 25(2):302-307.

Martin, C., B. Alriksson, A. Sjode, N.-O. Nilvebrant and L.J. Jonsoon. 2007. Dilute Sufuric Acid Pretreatment of Agricultural and Agro-Industrial Residues for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 136: 339-352.

Moiser, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladish. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 96: 673-686.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mtui, G.Y.S. 2009. Review Recent advances in pretreatment of lignocellulosic waste and production of value added products. **African Journal of Biotechnology** 8: 1398-1415.

Negro, M.J., P. Manzanares, I. Ballesteros, J.M. Oliva, A. Cabanas and M. Ballesteros. 2003. Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 105: 88-100.

Palmarola-Adrdos, B., P. Choteborska, M. Galbe and G. Zacchi. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology** 96: 843-850.

Palmqvist, E. and B.H. Hangerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibiton. **Bioresource Technology** 74: 25-33.

Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, V.T. Soccol, L.P.S. Vandenberghe and P. Mohan. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology** 74:81-87.

Paturau, J. M. 1969. **By Product of Cane Sugar Industry.** Elsevies Publishing Company, Amsterdams.

Perez, J.A., I. Ballesteros, M. Ballesteros, F. Saez, M.J. Negro and P. Manzanares. 2008. Optimizing Liquid Hot Water Pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. **Fuel** 87: 3640-3647.

Prasad, S., A. Singh and H.C. Joshi. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. **Resources, Conservation and Recycling** 50:1-39.

Rattanachomsri, U., S. Tanapongpipat, L. Eurwilaichitr and V. Champreda. 2009. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

fermentation by *Canidida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 107: 488-493.

Reusch, W. 2004. **Carbohydrates**. Department of Chemistry, Michigan State University. Available source: www2.chemistry.msu.edu/faculty/research/VirTxt_Jml/carbhd.htm, 2 March 2011.

Roberto, I.C., S.I. Mussatto and C.I.B. Podrigues. 2003. Diluted-acid hydrolysis of xylose recovery from rice straw in semi-pilot reactor. **Industrail Crops and Products** 2: 112-116.

Ruiz, E., C. Ca, P. Manzanares, M. Ballesteros and E. Castro. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology** 42: 160-166

Saha, B.C. 2004. Lignocellulose biodegradation and application in biotechnology. In: Saha, B.C. and K. Hayashi. Editors. Lignocellulose biodegradation. Washington, DC: **American Chemical Society** 108: 2-34.

Sanjeev, K.S., I.K. Krishan and S.G. Harmeet. 2002. Enzymatic Saccharification of Pretreated Sunflower Stalks. **Biomass and Bioenergy** 23: 237-243.

Scragg, A.H. 2009. **Biofuels production, application and development**. Cambridge University Press, United Kingdom.

Shevehenko, S.M., K. Chang, J. Robinson and J.N. Saddler. 2000. Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicelluloses component after steam explosion of softwood chips. **Bioresource Technology** 72: 207-211.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Srichuwong, S., M. Fujiwara, S. Wang, T. Seyama, R. Shiroma, M. Arakane, N. Mukojima and K. Tokuyasu. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and bioenergy** 33:890-898.

Sriroth, K., R. Chollakup, S. Chotineernnat, K. Piyachomkwan and C.G. Oates. 2000. Processing of Cassava Waste for Improves Biomass Utilization. **Bioresource Technology** 71: 63-69.

Sun, Y. and J.J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology** 83: 1-11.

_____. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermuda grass for ethanol production. **Bioresource Technology** 96: 1599-1606.

Suresh, K., N. Kiransree and L.V. Rao. 1999. Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. **Bioprocess Engineering** 21:165-168.

Tasic, M.B., B.V. Konstantinovic, M.L. Lazic and V.B. Veljkovic. 2009. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal** 43:208-211.

Thompson, D.N., H.C. Chen and H.E. Grethlein. 1992. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology** 39:155-163.

Um, B.-H., M.N. Karim and L.L. Henk. 2003. Effect of Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 105: 115-125

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Voel, D. And J.G. Voel. 1995. **Biochemistry**. 2 nded. University of Pennsylvania and Swarthmore College.

Wyman, C.E., B.E. Dale, R.T. Elander, M. Holtzapple, M.R. Ladisch and Y.Y. Lee. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology** 96:1959-1966

Yoonan, K. and J. Kongkiattikajorn. 2005**. Fermentable sugars from cassava pulps hydrolysate for ethanol production**. Starch Update 2005: The 3rd Conference on Starch Technology (BioThailand 2005). November 4-5. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok, Thailand.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย DNS method (Millers, 1959)

1.1 สารเคมี

- กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิคไซลิค (DNS)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์
- โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต
- สารละลายมาตรฐานกลูโคส

1.2 การเตรียมสารละลาย

1.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล 50 มิลลิลิตร โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร

1.2.2 สารละลายกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิคไซลิค (DNS)

ชั่งสารกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิคไซลิค 1 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนสาร จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตทีละน้อยจนครบ 300 กรัม และกวนจนกระทั่งสารละลายหมด ปรับปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเจืองจางสารละลายที่ได้ให้มีความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

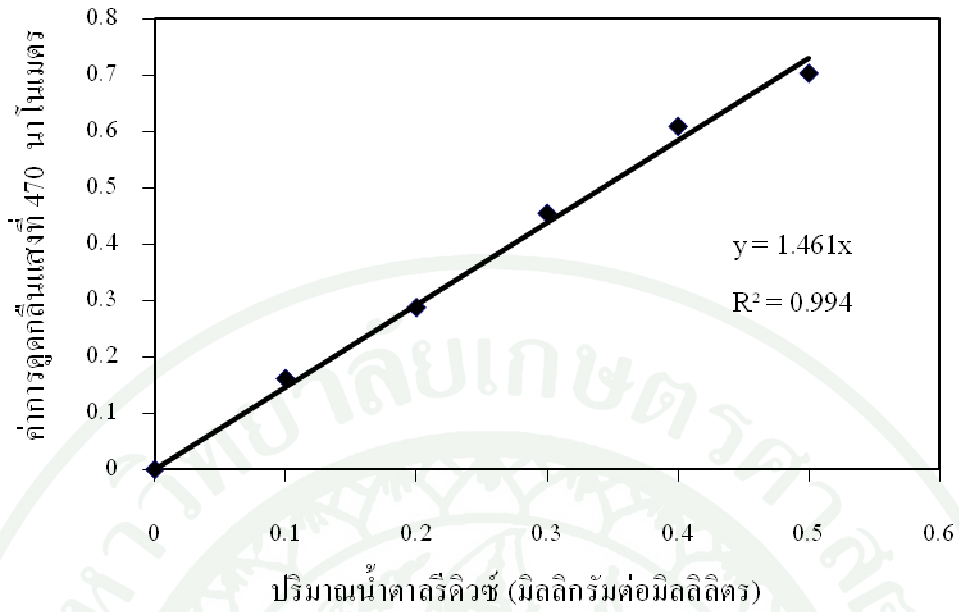
1.3 วิธีวิเคราะห์

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)
2) เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที
4) แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำแข็ง เพื่อทำให้ตัวอย่างเย็นอย่างรวดเร็ว 5 นาที
5) เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1 – 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก1 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DNS

ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (470 นาโนเมตร)
0.1	0.161
0.2	0.287
0.3	0.454
0.4	0.608
0.5	0.702

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธี DNS

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง ขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน และทำการเจือจางในกรณีที่สารละลายมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.5 วิธีคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่า } OD_{470} \text{ x อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาล โดยใช้เครื่อง High-performance liquid chromatograph (HPLC)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) บริษัท Jasco รุ่น DG-2080-53

2.1.2 คอลัมน์ Aminex-HPX-87P (carbo pack micro quard cartridge)

2.1.3 หัววัดชนิดรีเฟลคทีฟอินเด็กซ์ (refractive index detector, RI-2031 plus)

2.1.4 น้ำดีไอออนไนซ์ (deionized water)

2.1.5 สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

อุณหภูมิของคอลัมน์	80 องศาเซลเซียส ควบคุมด้วย CO 2065 plus, Jasco
ตัวทำละลาย	น้ำดีไอออนไนซ์
อัตราการไหล	1.0 มิลลิเมตรต่อนาที

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ บริษัท Shimadzu รุ่น GC-2014 series

3.1.2 คอลัมน์ Gaskuropack 54 60/80

3.1.3 หัววัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

3.1.4 เครื่องคอมพิวเตอร์ประมวลผล

3.1.5 เอทานอล analytical grade ความเข้มข้นร้อยละ 99.8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

อุณหภูมิหัวฉีดตัวอย่าง	250	องศาเซลเซียส
อุณหภูมิคอลัมน์	110	องศาเซลเซียส
แก๊สพา	แก๊สไนโตรเจน	
อัตราการไหลของแก๊ส	60	มิลลิลิตรต่อนาที

3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์

3.3.1 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

ทำการเจือจางเอทานอลร้อยละ 99.8 ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร บรรจุสารละลายมาตรฐานในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ปิดฝา เตรียมฉีดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ และใช้น้ำกลั่นเป็น blank

3.3.2 วิธีการวิเคราะห์

ก. ฉีดเอทานอลมาตรฐานและแบลงค์ (blank) 2 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟ บันทึกพื้นที่ใต้กราฟ สร้างกราฟมาตรฐาน

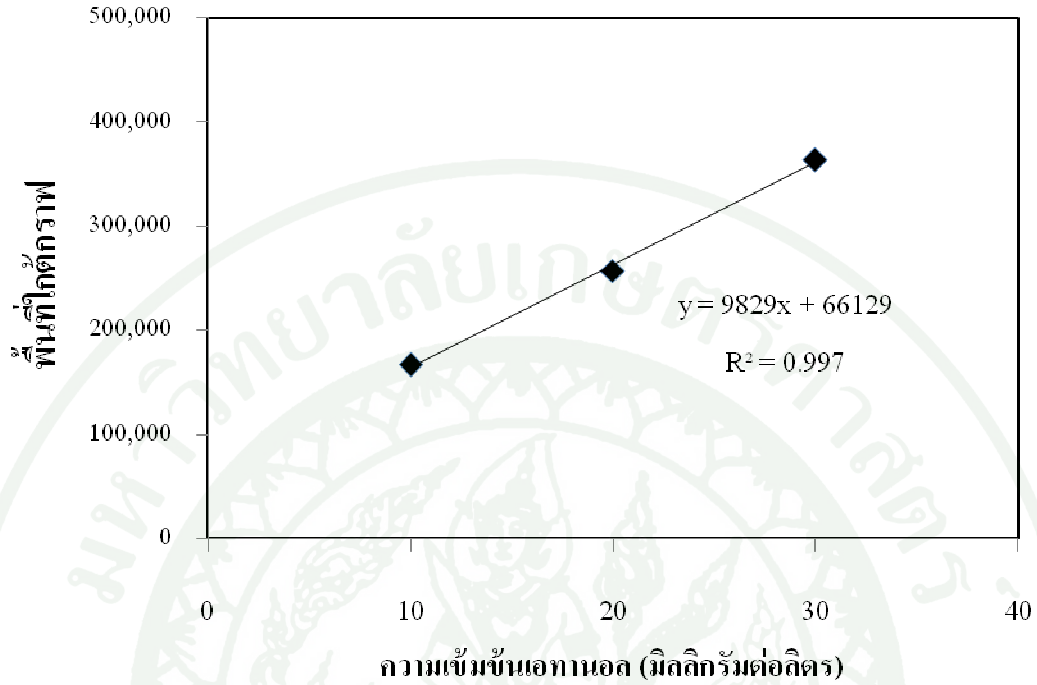
ข. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

ตารางผนวกที่ ก2 ตัวอย่างค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	**พื้นที่ใต้กราฟ**
10	167,194
20	257,177
30	363,784

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณเอทานอล



ภาพผนวกที่ ก2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางซัลฟูริกหรือฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอเป็นเวลา 15 นาที

ชนิดกรด	ความเข้มข้นกรด (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
กรดซัลฟูริก	0.000	0.73	31.63
	0.010	1.68	83.90
	0.025	4.14	191.49
	0.050	7.35	353.95
	0.100	7.82	384.92
	0.250	7.65	377.25
	0.500	7.71	379.86
กรดฟอสฟอริก		0.54	26.38
	0.010	2.58	103.36
	0.025	2.74	151.17
	0.050	2.74	162.38
	0.100	7.27	347.47
	0.250	6.92	325.41
	0.500	7.14	337.56

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
115	0	1.24	58.93
	15	4.96	245.46
	30	6.61	324.96
	60	6.74	331.49
	90	10.86	533.88
120	0	1.24	58.93
	15	8.80	429.29
	30	13.86	676.02
	60	16.78	831.91
	90	14.62	731.28
125	0	1.24	58.93
	15	10.99	549.64
	30	13.78	690.44
	60	14.86	743.33
	90	12.64	632.44
130	0	1.24	58.93
	15	16.17	808.34
	30	16.57	828.58
	60	16.96	848.26
	90	16.37	815.46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดฟอสฟอริก ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
115	0	0.73	36.49
	15	1.47	69.89
	30	2.35	116.58
	60	3.79	184.46
	90	6.32	316.14
120	0	0.73	36.49
	15	10.32	498.09
	30	10.71	535.44
	60	10.77	538.27
	90	11.33	546.00
125	0	0.73	36.49
	15	8.56	417.81
	30	6.45	431.23
	60	8.65	421.56
	90	9.02	439.90
130	0	0.73	36.49
	15	11.02	540.30
	30	11.66	571.58
	60	11.18	547.87
	90	11.47	562.50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
115	0	7.18	360.33
	15	10.48	516.27
	30	10.59	522.16
	60	10.81	531.95
	90	10.68	532.15
120	0	7.18	360.33
	15	10.17	498.07
	30	10.84	535.41
	60	10.86	544.27
	90	11.05	550.62
125	0	7.18	360.33
	15	11.36	561.81
	30	11.90	587.43
	60	11.84	583.84
	90	11.75	578.87
130	0	7.18	360.33
	15	10.99	531.88
	30	11.61	560.99
	60	11.09	550.85
	90	11.41	551.95

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
45	0	4.01	199.52
	3	5.16	254.08
	6	5.49	270.65
	12	6.49	319.75
	18	6.95	343.15
	24	7.23	356.61
	36	7.42	367.11
	48	7.84	385.55
	72	10.38	503.39
	96	10.01	486.87
50	0	4.01	199.52
	3	4.28	211.04
	6	4.54	223.81
	12	4.94	243.04
	18	5.02	246.82
	24	5.39	264.61
	36	6.06	299.62
	48	7.73	382.45
	72	9.60	472.74
	96	8.97	438.04

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และแอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
80	0	9.56	474.89
	1	10.51	526.50
	2	12.34	620.35
	4	11.82	593.54
90	0	9.56	474.89
	1	11.48	578.21
	2	13.36	675.41
	4	12.18	612.83
100	0	9.56	474.89
	1	9.94	501.15
	2	12.83	643.82
	4	12.01	607.89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันสำปะหลัง)
45	0	12.76	634.18
	12	13.69	705.61
	24	14.80	754.86
	36	14.24	726.04
	48	13.24	677.78
50	0	12.76	634.18
	12	13.98	717.51
	24	16.46	849.72
	36	15.98	817.98
	48	14.60	756.05
55	0	12.76	634.18
	12	15.59	798.60
	24	17.61	899.11
	36	16.17	833.90
	48	15.31	786.18
60	0	12.76	634.18
	12	15.74	806.99
	24	16.55	856.80
	36	15.31	788.70
	48	14.89	763.77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล จากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาทีด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระยะเวลาการหมัก 0 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง

เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
0	14.54	0
12	6.60	1.45
24	2.22	3.50
48	2.14	3.69
72	1.68	3.77
96	1.41	3.99

ตารางผนวกที่ ข9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล จากการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการบำบัดขั้นต้นกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนและน้ำ ที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ระยะเวลาการหมัก 0 12 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ที่ผ่านการบำบัดขั้นต้นด้วย

เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
0	15.57	0
12	7.50	1.61
24	1.63	3.54
48	0.92	4.54
72	0.46	4.72
96	0.24	5.11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสิริวรรณ แก้วชิงดวง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 มกราคม พ.ศ.2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2547 จบการศึกษา วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2. ทุนสนับสนุนโครงการส่งเสริมการวิจัยร่วมแบบทวิภาคี (Bilateral Research Cooperation, BRC) ปี 2552 ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2552 3. ทุนสนับสนุนการเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่าในการประชมวิชาการระดับนานาชาติ ปี 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์