การย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์เพื่อการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

Enzymatic Hydrolysis of Taro Peel Skin for *Clostridium acetobutylicum* Cultivation DSM 792

สิริมา สัตย์ชาพงษ์ อภิญญา สุทธิสารศักดิ์ อรวรรณ เทียบภู และ วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์*
Sirima Satchapong Apinya Suthisarnsak Orawan Theabpoo and Vorapat Sanguanchaipaiwong*
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วันที่ส่ง : 26 เมษายน 2561 วันที่แก้ไข : 21 พฤษภาคม 2561 วันที่ตอบรับ : 22 มิถุนายน 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยเปลือกเผือกเพื่อการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยนำเปลือกเผือกมาปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ หรือน้ำกลั่น ในสภาวะ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที และนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 9.64 ±0.42 กรัมต่อลิตร เมื่อปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ จึงนำเปลือกเผือกมาเจลลาติไนซ์และย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งสตาร์ช ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ คือ 8.54 ±0.27 กรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงนำเอนไซม์ผสมประกอบด้วยเซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสมาใช้ และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 30.12 ±0.81 กรัมต่อลิตร ในขั้นต่อไป ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ พบว่าเปลือกเผือก 15 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร และใช้เซลลูเลส 0.2 มิลลิลิตรต่อเปลือกเผือก 1 กรัม ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 31.79 ±1.14 กรัมต่อลิตร และนำมาเติมกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 พบความเข้มข้นของเอทานอล 11.01 ±0.55 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 5.33 ±0.27 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง

คำสำคัญ: เผือก *Clostridium acetobutylicum* การหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล การหมักไม่ใช้ออกซิเจน การย่อยด้วยเอนไซม์

Abstract

This research was conducted to study the optimization of enzymatic hydrolysis of taro peel for the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Taro peel was pretreated with 1 M H_2SO_4, 1 M NaOH or distilled water at 121°C, 15 psi for 20 min and

* ที่อยู่ติดต่อ E-mail address: vorapats@hotmail.com

hydrolyzed by 1 mL cellulase per 1 g of sample. The basic pretreatment provided the highest concentrations of reducing sugar of 9.64 ±0.42 g/L from 1 M NaOH, which was inadequate for microbial production. Subsequently, to hydrolyze starch, taro peel was gelatinized and hydrolyzed by α-amylase and glucoamylase. The amount of reducing sugar obtained from amylase was 8.54 ±0.27 g/L. As a consequence, the mixed enzymes, cellulase, α-amylase and glucoamylase, were utilized and the reducing sugar content was 30.12 ±0.81 g/L. Afterwards, the optimization of enzymatic hydrolysis conditions was carried out. The optimal conditions were 15 g taro peel in 100-mL solution and 0.2 mL cellulase per 1 g of taro peel. The concentration of reducing sugars gained from this procedure was 31.79 ±1.14 g/L. Subsequently, this taro peel hydrolysate was utilized as a carbon source for the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 with 50 g/L reducing sugar equivalence. It has been found that the highest concentrations of ethanol and butanol were 11.01 ±0.55 g/L and 5.33 ±0.27 g/L at 48 h, respectively.

Keywords: taro, *Clostridium acetobutylicum*, acetone-butanol-ethanol fermentation, anaerobic fermentation, enzymatic hydrolysis.

1. บทนำ

ในปัจจุบัน มีความสนใจในการนำวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงทางชีวภาพเพิ่มขึ้น มีสาเหตุมาจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณมากและไม่สามารถนำมาบริโภคเป็นอาหารมนุษย์ได้ เนื่องจากองค์ประกอบหลักคือลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส [1] จึงต้องอาศัยการปรับสภาพเพื่อให้เอนไซม์เข้าไปทำงานได้สะดวก ในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำหัวเผือก (Taro ชื่อวิทยาศาสตร์ *Colocasia esculenta* (L.) Schott) มาแปรรูปมาอย่างยาวนาน โดยส่วนใหญ่เมื่อปอกเปลือกเสร็จก็จะถูกทำไปทิ้งและกำจัดโดยกองไว้ให้เกิดการย่อยสลายตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นเวลานานกว่าที่วัสดุจะเกิดการย่อยสลาย ส่งผลต่อสภาพแวดล้อมได้ในภายหลัง ในงานวิจัยนี้จึงต้องนำเปลือกเผือกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างบิวทานอล เนื่องจากในปัจจุบันบิวทานอลได้รับความสนใจและได้รับการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไบโอบิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับก๊าซโซลีน หรือน้ำมันเบนซิน มากกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล นอกจากนี้ บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่า จึงสามารถผสมกับก๊าซโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ [2] โดยสามารถผลิตบิวทานอลจากเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ได้ ซึ่งเชื้อนี้เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาศึกษาการสร้างบิวทานอล [3] และอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สามารถสร้างสปอร์ และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยบิวทานอลเป็นผลิตผลหนึ่งที่ได้จากกระบวนการหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-butanol-ethanol

fermentation) โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ผลิตแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลได้ความเข้มข้น 4.5, 9.5 และ 0.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ [3, 4] งานวิจัยนี้จึงได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ผสมย่อยเปลือกเผือก และนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการผลิตแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้เปลือกเผือกเป็นวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหาร เพราะนอกจากจะเป็นการลดการกำจัดเศษวัสดุที่เหลือทิ้งลงแล้วยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงอีกด้วย

2. วิธีการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 และทำการถ่ายเชื้อและเก็บใน Difco™ Reinforced Clostridial Medium (RCM, BD, USA) ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน ใช้อาหาร glucose–yeast extract–casein–cysteine (GYCC) ซึ่งดัดแปลงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Badr, Toledo และ Hamdy [5] โดยในการเตรียมหัวเชื้อ ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตบิวทานอล ใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม ทำการปรับระดับความเป็นกรดเบสให้ได้ 6.8 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในการใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำการเติมกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

2.2 เปลือกเผือกและการเตรียม

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน) นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร นำมาล้างเปลือกให้สะอาด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบด (Retsch รุ่น SK 100) จากนั้น นำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือก ศึกษาการปรับสภาพเปลือกเผือก การย่อยด้วยเอนไซม์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

2.3 กระบวนการปรับสภาพเปลือกเผือก

นำเปลือกเผือกที่เตรียมไว้มาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ดัดแปลงจาก Zheng *et al.* [6] และ Trevorah *et al.* [7]) จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman No.1 ของแข็งนำไปปรับ โดยทำการล้างน้ำกลั่น จนกว่าระดับความเป็นกรดเบสของน้ำที่ล้างเป็นกลาง และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.4 กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์

2.4.1 การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ทำการเติมเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500 ประกอบด้วยกิจกรรมเอนโดกลูคาเนส 2200 – 2800 หน่วย CMC ต่อกรัม และกิจกรรมเบต้ากลูโคสิเดส 450 – 775 หน่วย pNPG ต่อกรัม) 1.0 มิลลิลิตร ลงในเปลือกเผือกที่ปรับสภาพด้วยกรด เบส น้ำ น้ำหนัก 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เป็น 5.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (2,258 x g, Hermle Z 383 K, Germany) เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS) [8]

2.4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

นำเปลือกเผือกที่เตรียมไว้ 15 กรัมมาเติมลงน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วทรงกระบอกขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปเจลาติไนซ์ (gelatinize) โดยให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (500-1,500 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ร้อยละ 0.05 ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (120 หน่วยต่อกรัม) ร้อยละ 0.015 ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง [9] แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิห้อง จากนั้น ปั่นเหวี่ยงด้วยสภาวะเดียวกับหัวข้อ 2.4.1 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS [8]

2.4.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ผสม

เตรียมตัวอย่างเปลือกเผือกตามหัวข้อ 2.4.2 เมื่อถึงขั้นตอนการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเล ทำการเติมเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิด้วยสภาวะเดียวกับหัวข้อ 2.4.1

2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยเปลือกเผือก

เพื่อหาปริมาณเปลือกเผือกที่เหมาะสม นำเปลือกเผือกน้ำหนักต่างๆ 10 กรัม, 15 กรัม และ 20 กรัม มาผสมกับน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดแก้วทรงกระบอกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเจลาติไนซ์ (gelatinize) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมในขั้นตอนที่ 2.4.3 จากนั้น นำปริมาณเปลือกเผือกที่ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดจากหัวข้อ 2.4.1 มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมในขั้นตอนที่ 2.4.3 โดยเปลี่ยนปริมาตรของเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500) เป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม

2.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

2.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เก็บในอาหารเหลว RCM ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว RCM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เพื่อให้เพียงพอต่อการผลิตแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล [5] ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

2.6.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

หัวเชื้อที่เตรียมไว้ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกเผือกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยของแข็งด้วยเอนไซม์ผสมด้วยสภาวะที่เหมาะสม ทำการทดลองสามซ้ำ จากนั้น บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 และนำตัวอย่างไปเตรียมวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

2.7 การวิเคราะห์ตัวอย่างทางเคมี

วิเคราะห์ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าระดับความเป็นกรดเบส ด้วยเครื่องวัดระดับความเป็นกรดเบส (Clean PH500) หลังจากนั้น นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที (2,258 x g, Hermle Z 383 K, Germany) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS [8] วิเคราะห์หาปริมาณของสารที่เชื้อสร้างขึ้นด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้กรดซิตริกร้อยละ 2 เป็น Internal standard ใช้คอลัมน์ Aminex® Fermentation Monitor (7.8 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร) ใช้ Mobile phase เป็นกรดซัลฟิวริก 5 mM อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของ column oven อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ refractive index detector และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอซีโตน บิวทานอล เอทานอล กรดแลคติก กรดแอซีติก และกรดบิวทิริก

2.8 จลนพลศาสตร์เบื้องต้น

คำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ , h^{-1}) อัตราผลผลิต (productivity, g/L·h) ค่าผลได้สำหรับการเจริญเติบโต ($Y_{x/s}$, g/g) ค่าผลได้สำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$, g/g) [10] โดยใช้สมการ (1) – (4)

$$\mu = \frac{\ln(x_{\max}/x_0)}{t} \quad (1)$$

$$Productivity = \frac{p_{\max} - p_0}{t} \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = \frac{x_{\max} - x_0}{s_0 - s} \quad (3)$$

$$Y_{p/s} = \frac{p_{\max} - p_0}{s_0 - s} \quad (4)$$

เมื่อ $x_{\max}$ และ x_0 คือค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) ค่า s และ s_0 คือค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นสุดท้ายและเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) ค่า $p_{\max}$ และ p_0 คือค่าความเข้มข้นของบิวทานอลหรือผลิตภัณฑ์รวม (กรัมต่อลิตร) และค่า t คือเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการผลิตบิวทานอล หรือเอทานอล (ชั่วโมง)

2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลองสามซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์แบบเป็นกลุ่มโดยใช้วิธีของ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) [11]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์

เมื่อนำผงเปลือกเผือกไปปรับสภาพก่อนการย่อย ด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ และน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500) แล้วทำวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อย พบว่าเปลือกเผือกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 9.64 กรัมต่อลิตร และรองลงมาคือเปลือกเผือกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดและน้ำกลั่น ซึ่งได้เท่ากับ 7.77 กรัมต่อลิตร และ 5.23 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 1 จากการศึกษาหาองค์ประกอบของเปลือกเผือกเบื้องต้น พบว่าเปลือกเผือกมีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 77 โดยมีเซลลูโลสร้อยละ 7.67 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8.70 และลิกนินร้อยละ 3.65 จึงมีแป้ง (Starch) เป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อย เนื่องจากใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อย

ต่อมา ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เพื่อย่อยผงเปลือกเผือกที่ผ่านการเจลาติไนซ์ แต่ไม่ผ่านการปรับสภาพ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้คือ 8.54 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเปลือกเผือกมีแป้งสตาร์ชเป็นองค์ประกอบ แต่พบน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นน้อยกว่าที่ควรจะย่อยได้ อาจมีสาเหตุมาจากการย่อยเปลือกเผือกซึ่งมีองค์ประกอบทั้งแป้ง starch และลิกโนเซลลูโลส ทำให้มีแป้งบางส่วนเกี่ยวพันกับลิกโนเซลลูโลสบางส่วน เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสจึงไม่สามารถเข้าไปย่อยได้ [12]

ตารางที่ 1. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

การย่อยด้วยเอนไซม์	การปรับสภาพ	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
เซลลูเลส	กรด	7.77^{d} ±0.34
	เบส	9.64^{b} ±0.42
	น้ำกลั่น	5.23^{e} ±0.25
อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส	Gelatinization	8.54^{c} ±0.27
เอนไซม์ผสม	Gelatinization	30.12^{a} ±0.81

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การย่อยโดยใช้เอนไซม์ผสมจึงถูกเลือกในการทดลองต่อไป โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500) ย่อยเปลือกเผือกที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ พบน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงขึ้นถึง เพิ่มขึ้นมากกว่าใช้เพียงเอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่ง คือ 30.12 กรัมต่อลิตรดังตารางที่ 1 จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวนี้มาเพื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก และการนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 จากการวิจัยเพื่อวิเคราะห์ต้นทุนและประสิทธิภาพในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ [12] ในขั้นตอนศึกษาการย่อยกากมันด้วยเอนไซม์ที่ต่างกัน คือ เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เซลลูเลสเพียงอย่างเดียวในการย่อยได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำ เช่นเดียวกับการใช้แอลฟาอะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลสในการย่อย เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดในการย่อยกากมันสำปะหลัง ผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูงถึง 82.37 กรัมต่อลิตร เป็นผลมาจากการทำงานของแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสที่ย่อยเม็ดแป้งที่เกาะอยู่บริเวณขอบเส้นใยลิกโนเซลลูโลสของกากมันสำปะหลัง ในขณะที่เซลลูเลสย่อยลิกโนเซลลูโลส ทำให้เม็ดแป้งที่อยู่ด้านในเป็นผลให้แป้งถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลได้ปริมาณสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ การใช้เอนไซม์สามชนิดรวมกัน จึงอาจเป็นสาเหตุให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์หลังย่อยความเข้มข้นสูงกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียวมาก

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก

3.2.1 ปริมาณเปลือกเผือก

จากการนำเปลือกเผือกที่น้ำหนักแตกต่างกัน 10, 15 และ 20 กรัม มาย่อยโดยใช้เอนไซม์สามชนิด คือ เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ในปริมาตรสารละลายที่เท่ากันคือ 100 มิลลิลิตร ได้ผลดังตารางที่ 2 พบว่าเมื่อใช้เปลือกเผือก 15 กรัม มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงสุด 34.19 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อใช้เปลือกเผือกหนัก 10 และ 20 กรัม น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าความเข้มข้นน้อยลง เนื่องจากปริมาณเปลือกเผือกไม่เหมาะสมกันทำให้เอนไซม์ย่อยเปลือกเผือกได้ไม่ดี ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อย อย่างไรก็ตาม พบว่าเปลือกเผือก 15 กรัม และ 20 กรัม (ตารางที่ 2) ให้ผลน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกปริมาณเปลือกเผือก 15 กรัมไปทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2. ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสของเปลือกเผือกซึ่งผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ผสม คือเซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยใช้เปลือกเผือกที่แตกต่างกัน

น้ำหนักเปลือกเผือก (กรัม)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
10	17.79^{b} ±0.89
15	30.14^{a} ±1.38
20	28.93^{a} ±1.25

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.2 ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองแปรผันปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างเปลือกเผือก คือ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ร่วมกับเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะ-ไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE® 1500) ที่ 1.0 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด 33.18 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ การใช้เซลลูเลสที่ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8 มิลลิลิตร ได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 25.56 กรัมต่อลิตร 31.79 กรัมต่อลิตร 29.36 กรัมต่อลิตร 31.33 กรัมต่อลิตร และ 30.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ที่ 0.2 มิลลิลิตร จึงเลือกปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสนี้ไปทำการทดลองต่อไป เปรียบเทียบกับการหาสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ในการย่อยเศษเหลือทิ้งของเผือก (taro waste) 120 กรัมน้ำหนังแห้งต่อลิตร เพื่อนำไปเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.9 มิลลิลิตรต่อลิตร อุณหภูมิ 79 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง ได้น้ำตาลริดิวซ์ 30.57 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนต่อมา ใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคสิเดส 0.6 มิลลิลิตรต่อลิตร อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 61.35 กรัมต่อลิตร [13]

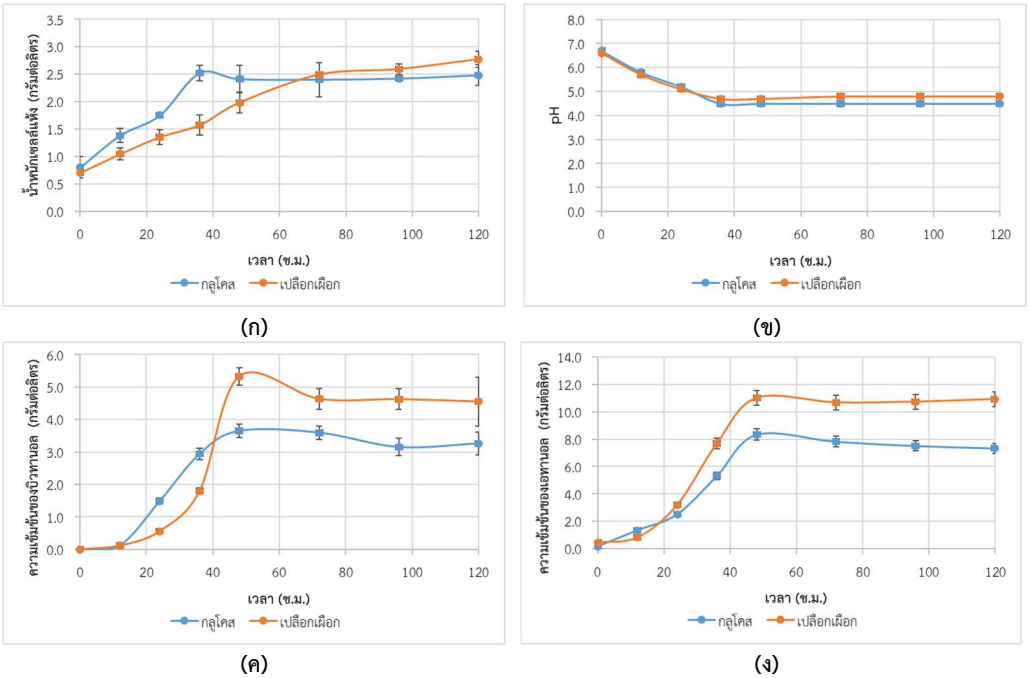
ตารางที่ 3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน

ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0.0	25.56^{b} ± 1.33
0.2	31.79^{a} ± 1.14
0.4	29.36^{ab} ± 4.59
0.6	31.33^{a} ± 0.42
0.8	30.10^{ab} ± 3.76
1.0	33.18^{a} ± 1.39

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันหมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ด้วยเปลือกเผือก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม โดยเปรียบเทียบกับการใช้เปลือกเผือกเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เท่ากัน และวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ระดับความเป็นกรดเบสของน้ำหมัก และค่าความเข้มข้นของแอซีโตน บิวทานอล เอทานอล ได้ผลดังรูปที่ 1 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เห็นได้ว่าว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคสทำให้เชื้อเจริญได้เร็วกว่า (รูปที่ 1ก) โดยที่เวลา 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้น คือ 1.72 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยเปลือกเผือกที่ถูกย่อย การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ 36 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเพียง 0.87 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อถึงชั่วโมงที่ 72 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.51 ±0.31 กรัมต่อลิตร และสารที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกได้ความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.49 ±0.05 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 1. รูปแบบการเจริญเติบโตตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ระดับความเป็นกรดเบส (pH) (ค) ค่าความเข้มข้นของบิวทานอล และ (ง) ค่าความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหาร GYCC ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (จุดและเส้นสีฟ้า) และเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อย (จุดและเส้นสีแดง) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ในขณะที่การสร้างสารผลิตภัณฑ์ของ *Clostridium acetobutylicum* เมื่อใช้เปลือกเผือกเป็นส่วนหนึ่งของแหล่งคาร์บอนในอาหาร GYCC โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์รวม 50 กรัมต่อลิตร ผลแสดงในรูปที่ 1ค และรูปที่ 1ง พบว่าเชื้อสามารถสร้างบิวทานอล (5.33 ±0.27 กรัมต่อลิตร) และเอทานอล

(11.01 ±0.55 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วนบิวทานอลต่อเอทานอลเท่ากับ 1:2.07) ได้ความเข้มข้นสูงกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในชุดควบคุมพบบิวทานอลความเข้มข้น 3.65 กรัมต่อลิตร และเอทานอลความเข้มข้น 8.34 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นอัตราส่วนบิวทานอลต่อเอทานอลเท่ากับ 1:2.28) เมื่อเทียบกับการนำขยะอาหาร ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 81 กรัมต่อลิตร [14] มาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 พบแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล รวมสูงถึง 18.8 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์รวม เท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัม และค่าอัตราผลผลิตผลิตภัณฑ์รวม 0.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ Joshi และคณะ [15] ใช้เปลือกส้มที่ปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำมาเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* NCIM 2877 โดยไม่เติมสารอาหารอื่น พบความเข้มข้นของบิวทานอลสูงถึง 19.5 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นที่คำนวณได้หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคสและสารที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือก (ตารางที่ 4) จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ได้จากการใช้กลูโคสสูงกว่าการใช้เปลือกเผือก ในขณะที่ผลได้ของการสร้างเซลล์ การผลิตบิวทานอล การผลิตผลิตภัณฑ์รวม ไม่แตกต่างกันมาก แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลจากกลูโคสและเปลือกเผือกไม่มีความแตกต่างกัน ในทางกลับกัน เมื่อพิจารณาอัตราผลผลิตผลิตภัณฑ์ การใช้เปลือกเผือกที่ย่อยได้ทำให้มีอัตราผลผลิตสูงกว่าการใช้กลูโคส ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการนำน้ำตาลกลูโคสไปสร้างเซลล์มากกว่าการสร้างผลิตภัณฑ์ [16]

ตารางที่ 4. ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเจริญเติบโตและการสร้างสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ด้วยอาหาร GYCC ที่ใช้แห่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อย ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ค่าจลนพลศาสตร์	กลูโคส	เปลือกเผือก
μ (h^{-1})	0.031	0.017
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.173	0.155
$Y_{p/s}$ ของบิวทานอล (g/g)	0.366	0.398
อัตราผลผลิตบิวทานอล (g/L·h)	0.076	0.111
$Y_{p/s}$ ของเอทานอล (g/g)	0.820	0.787
อัตราผลผลิตเอทานอล (g/L·h)	0.170	0.219

หมายเหตุ ค่าที่แสดงมาจากการคำนวณค่าเฉลี่ยจึงไม่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติ

4. สรุปผลการทดลอง

เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมสามชนิด ได้แก่ เซลลูโลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 และสร้างบิวทานอลได้ความเข้มข้น 5.33 กรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องมีการใช้สารเคมีในการปรับสภาพ จึงควรใช้เป็นข้อมูลเป็นแนวทางเพื่อปรับปรุงกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างบิวทานอลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนรายได้ประจำปีงบประมาณ 2560 อุดหนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณบริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง (References)

[1] อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. *วารสารสิ่งแวดล้อม*, 16(2), 36-43. [Arunee Supasinsathit. 2012. Energy from high lignocellulose biomass. *Environmental Journal*, 16(2), 36-43. (in Thai)]

[2] ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, 22(3), 703-709. [Chanika Ouephanit, Chompunuch Virunanon and Warawut Chulalaksananukul. 2012. Biobutanol: Liquid energy substituting ethanol. *The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok*, 22(3), 703-709. (in Thai)]

[3] Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J. and Jung, K.S. 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209–228.

[4] Cheng, H.H., Whang, L.M., Chan, K.C., Chung, M.C., Wu, S.H., Liu, C.P., Tien, S.Y., Chen, S.Y., Chang, J.S. and Lee, W.J. 2015. Biological butanol production from microalgae-based biodiesel residues by *Clostridium acetobutylicum*. *Bioresource Technology*, 184, 379-385.

[5] Badr, H.R., Toledo, R. and Hamdy, M.K. 2001. Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass Bioenergy*, 20(2), 119–132.

[6] Zheng, Q., Zhou, T., Wang, Y., Cao, X., Wu, S., Zhao, M., Wang, H., Xu, M., Zheng, B., Zheng, J. and Guan, X. 2018. Pretreatment of wheat straw leads to structural changes and improved enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports,* 8, 1321-1329.

[7] Trevorah, R.M. and Othman, M.Z. 2015. Alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of Australian timber mill sawdust for biofuel production. *Journal of Renewable Energy*, 4, 126–130.

[8] Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

[9] กรวิกา ตั๊นพัฒนกิจ, ซารีนา สาเล็ง และนัฏกาญจน์ จิตรแก้ว. 2553. การผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง [Kornwika Tunpattanakit, Sareena Saleng and Nuttakarn Jitkeaw. 2010. Ethanol

production from sweet potato by enzymes and *Saccharomyces cerevisiae*. Special Project, Bachelor of Science in Industrial Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai)]

[10] Hong, J. 1989. Yield coefficients for cell mass and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 506–507.

[11] อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2539. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. [Ananchai Kheuoenthum. 1996. Experimental Design. Department of Statistics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)]

[12] ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล และเศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. 2558. การศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์. รายงานการประชุมวิชาการและนำเสนอผลการวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่6 กลุ่มระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา, กรุงเทพมหานคร. 249-259. [Nattapong Ditkunchaimongkol and Seathawat Chamsart. 2015. The Study of Efficiency and Cost of Cassava Pulp Hydrolysis by Acid and Enzymes. The 6th Academic Meeting National and International Conference, National Group, Science Section, Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok. 249-259. (in Thai)]

[13] Hsieh, S.-C., Liu, J.-M., Pua, X.-H., Ting, Y., Hsu, R.-J. and Cheng, K.-C. 2016. Optimization of *Lactobacillus acidophilus* cultivation using taro waste and evaluation of its biological activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2629–2639.

[14] Huang, H., Singh, V. and Qureshi, N. 2015. Butanol production from food waste: A novel process for producing sustainable energy and reducing environmental pollution. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 147-159.

[15] Joshi, S.M., Waghmare, J.S., Sonawane, K.D. and Waghmare, S.R. Bio-ethanol and bio-butanol production from orange peel waste. *Biofuels*, 6(1-2), 55-61.

[16] Maier, R.M. 2009. Bacterial growth. Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. (eds.) in Environmental Microbiology, 2nd ed. Academic Press, Burlington, MA, USA. P.37-54.