

การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยการหมักด้วย แชนคาโรไมซิส ซีรีวีซีอี 5049

ETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA PULP HYDROLYSATE USING FERMENTATION BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 5049

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร และกัลยา อยู่นาน

Jirasak Kongkiattikajorn and Kanlaya Yoonan

Division of Biochemical Technology,
School of Bioresources and Technology,
King Mongkut's University of Technology Thonburi,
Bangkok, Thailand,

E-mail address: jirasak.kon@kmutt.ac.th

Abstract: The objective of this study was to produce the fermentable sugars from cassava pulp by enzymatic hydrolysis and use the fermentable sugars as substrates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. The experimental was performed by enzymatic saccharification of 1.5%w/v cassava pulp by α -amylase was pH 6.0, 90°C for 2 hours and produced 31.76% yield of reducing sugars. The reaction mixture was then reacted with amyloglucosidase at pH 4.0, 50°C for 24 hours. The hydrolysate contained reducing sugars of 52.85% yield. For ethanol production, the process was studied using cassava hydrolysate as carbon source (5.20 g/l reducing sugars) incubated with 5049 in a shaker with 150 rpm at 30 °C. Under condition study, ethanol was produced with a yield of 2.28 g/l and the substrate conversion yield was 44.23%.

บทคัดย่อ: ในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตน้ำตาลที่สามารถใช้เป็นสารอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยการย่อยสลายกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ และนำน้ำตาลที่ได้มาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการหมักเชื้อยีสต์ แชนคาโรไมซิส ซีรีวีซีอี เพื่อผลิตเอทานอล ในการศึกษาทดลองได้ทำโดยการย่อยสลายกากมันสำปะหลัง 1.5%น้ำหนัก/ปริมาตร ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวส์ได้เท่ากับ 31.76% จากนั้นนำสารละลายมาย่อยด้วยอะไมโลกลูโคซิเดสที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 52.85% สำหรับการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลรีดิวส์จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (5.20 กรัมต่อลิตร) มาหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* 5049 และกวนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ปริมาณเอทานอล 2.28 กรัมต่อลิตรคิดเป็นการผลิตเอทานอล 44.26 กรัมต่อกากมันสำปะหลัง 100 กรัม

Methodology: Dry cassava pulp was collected from the factory of cassava starch production in Chonburi province, was dried in hot air oven at 55 °C for 24 h and milled into 63-425 μ m of particle size. The milled cassava pulp was stored in desiccator. Two enzyme solutions, α -amylase and amyloglucosidase (Sigma, St. Louis, MO), were used for the enzymatic hydrolysis. Hydrolysis was performed in 25 ml Erlenmeyer flasks containing a 10 ml mixture of 1.667 U α -amylase in 0.2 M Citrate-phosphate buffer solution and 1.5 g milled cassava pulp (at pH 6.0). The flasks

were incubated in waterbath at temperature 90 °C for 2 h. The pH of the α -amylase hydrolysate was adjusted to 4.0. The hydrolysis was continuously performed by adding 3.333 U amyloglucosidase. The flasks were incubated in waterbath at temperature 60 °C for 24 h. *S. cerevisiae* 5049 was obtained from Bangkok MIRCEN. The E-flasks were incubated in a rotary shaker at 30 °C and 250 rpm for 18 h. After supplementation, the hydrolysates were adjusted pH to 5.5 and then filtrated through a membrane (pore size of 0.22 μ) so that they could be used as fermentation media. The inoculum of 10⁷ cells/ml *S. cerevisiae* 5049 was grown in the media in Erlenmeyer flasks at 30°C on a rotary shaker at 150 rpm for 18 h. The cell concentration was determined from turbidity measured at 660 nm. After centrifugation of the culture broth at 17,000 xg for 10 min to remove yeast cells, the supernatant obtained was analyzed for reducing sugars and ethanol. Ethanol concentration was measured by gas chromatography (GC-12A, Shimadzu) using a Chromosorb 101 column and a flame ionization detector (1).

Results, Discussion and Conclusion: Figure 1(A, B) shows the optimal condition of the α -amylase hydrolysis of milled cassava pulp used in this study. The optimal conditions for saccharification of 1.5%w/v cassava pulp by α -amylase was pH 6.0, 90°C for 2 hours and produced 31.76% yield of reducing sugars. % Yield of reducing sugars showed different efficiency of the enzyme at different pH and time. Figure 2(A, B) shows the optimal condition of the amyloglucosidase hydrolysis after α -amylase treated cassava pulp. The optimal conditions for saccharification was at pH 4.0, 50°C for 24 hours. The hydrolysate produced 52.85% yield of reducing sugars. % Yield of reducing sugars showed efficiency of the enzyme at different pH and time.

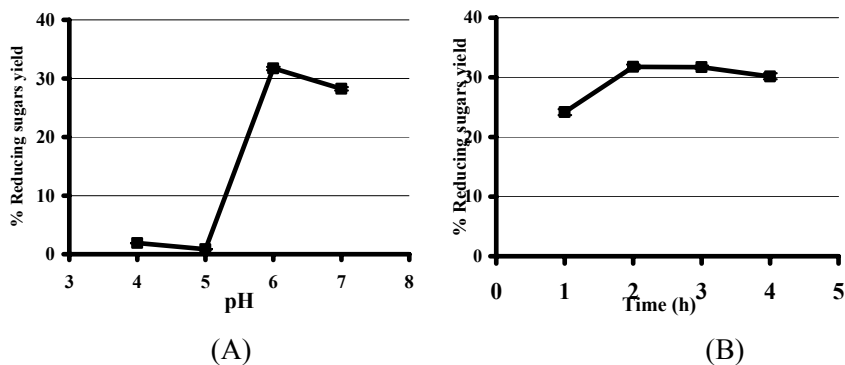


Figure 1. Effects of α -amylase on the enzymatic hydrolysis. (A) plot of % reducing sugars yield (after 2 h of hydrolysis) as a function of pH. (B) Time course of % reducing sugars yield in hydrolysate

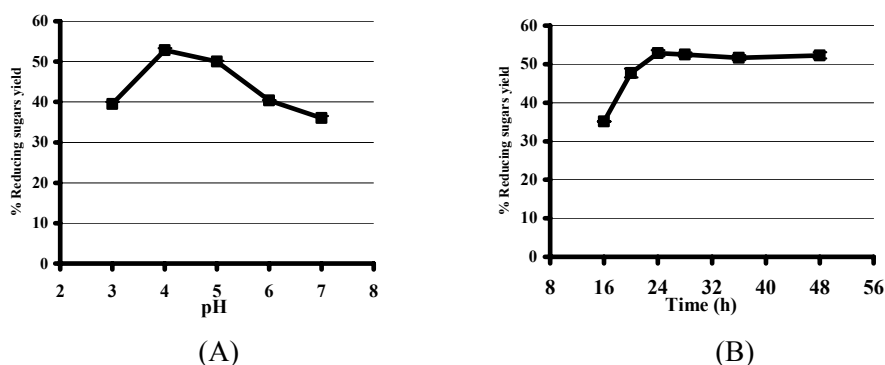


Figure 2. Effects of amyloglucosidase on the enzymatic hydrolysis. (A) Plot of % reducing sugars yield (after 24 h of hydrolysis) as a function of pH. (B) Time course of % reducing sugars yield in hydrolysate

Table 1 Reducing sugars, ethanol yield and productivity achieved under culture conditions.

Reducing Sugars(g/l)	Ethanol Production(g/l)	Ethanol yield (%)	Productivity (g/l/h)
5.20 ± 0.12	2.28 ± 0.37	0.45 ± 0.07	0.12 ± 0.021

In Table 2 the ethanol concentrations, ethanol yields, and reducing sugars conversions obtained after 18 h of fermentation are summarized for the cassava pulp hydrolysate substrates using by *S. cerevisiae* to produce ethanol. It can be stated that the generally used *S. cerevisiae* for the ethanol fermentation can be applied at 30 °C, pH 5.5 in the fermentation process. Table 1 which indicates that cassava pulp hydrolysate was suitable for substrates for ethanol production. The cassava pulp conversions were considered about 50% of the material was unutilized, so the material possibly be converted to more fermentable sugars by using associated with the other hydrolytic enzymes for higher ethanol production.

Acknowledgement: The research was supported by the National Research Council of Thailand.

References: [1]. Tanieuchi, M., Tohma, T., Itava, T. and Fujii. M. (1997). *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, 83, 364-370.

Keywords: Ethanol, Reducing sugars, Cassava pulp