จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

โครงการวิจัยการสังเคราะห์บิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

(Bioproduction of butanol from lignocellulosoic biomass)

โดย

รศ.ดร.อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย
วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี
กรกฎาคม พ.ศ.๒๕๕๔

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง การสังเคราะห์บิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร สำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในวาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2553 กลุ่มวิจัยพลังงาน (Energy Cluster) ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ยิ่งต่อการวิจัย รวมทั้งสนับสนุนการทำวิจัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วง

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย...การสังเคราะห์บิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
ชื่อผู้วิจัย......รศ.ดร.อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย/รศ.ดร.สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์/ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส
เดือน และ ปี ที่ทำวิจัยเสร็จ......กรกฎาคม 2554

เชื้อเพลิงชีวภาพผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นเชื้อเพลิงทางเลือก ที่มีประสิทธิผลต่อเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากแป้งหรือน้ำตาลโดยตรง ขั้นตอนการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักและ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ดังนั้นการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อจำกัดปริมาณตัวยับยั้งเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน มีนัยสำคัญต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุดประสงค์หลักของงานวิจัยคือการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยกรดเจือจาง ดังนั้นทางงานวิจัยใช้กรดซัลฟูริกเจือจางปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ หลังจากการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจางภายใต้ภาวะที่เหมาะสม (120 องศาเซลเซียส, 5 นาที) ให้ผลผลิตน้ำตาล 24.73 กรัมต่อลิตร หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้ผลผลิตน้ำตาล 22.37 กรัมต่อลิตร สุดท้ายผลผลิตน้ำตาลทั้งหมดรวม 47.11 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยกรดซัลฟูริกเจือจางสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และจากการศึกษาการผลิตบิวทานอลของเชื้อ C. beijerinckii TISTR1461 พบว่าภายใต้สภาวะไร้อากาศ พบว่าได้ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลรวม 20.58 กรัมต่อลิตร

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title ...... Bioproduction of butanol from lignocellulosoic biomass
Name of the Investigators...Assoc.Prof.Apanee Luengnaruemitchai/Assoc.Prof.Sujitra Wongkasemjit/ Dr.Kittinan Komolpis
Year...2011..

Biofuels produced from lignocellulosic materials, so called second generation biofuel, showed energetic economic and environmental advantages in comparison to biofuels produced from starch or sugar. There are mainly two processes involved in the conversion routes: hydrolysis of cellulose to produce reducing sugar and fermentation of sugars to biofuels. Therefore, pretreatment of lignocellulosic materials to remove hemicellulose and lignin can significantly enhance the hydrolysis of cellulose. The main goal of research is to increase the enzyme accessibility by improving digestibility of cellulose. Accordingly, dilute sulfuric acid was used to pretreat corn cobs prior to enzymatic hydrolysis. After pretreatment of corn cobs by dilute acid under the optimal condition (120 °C, 5 min), the highest yield of total sugars of 24.73 g/l was obtained. After enzymatic hydrolysis, the highest yield of total sugars of 22.37 g/l was obtained and the final total sugar yield reached 47.11 g/l. It can be concluded that dilute sulfuric acid pretreatment can be successfully applied for corn cobs to achieve high yields of monomeric glucose and xylose. In addition, the butanol production by C. beijerinckii TISTR1461 was studied under anaerobic batch culture. It was found that the maximum concentration of acetone-butanol-ethanol products of 20.58 g/l was obtained.

สารบัญ

บทที่		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	i
	บทคัดย่อภาษาไทย	ii
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
1	**บทนำ**	1
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
	1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	1.4 ขอบเขตการวิจัย	6
	1.5 วิธีดำเนินการวิจัย	6
	1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2	**การผลิตเชื้อเพลิงบิวทานอล**	7
	2.1 บิวทานอล	7
	2.2 การใช้งาน	7
	2.3 กระบวนการผลิตบิวทานอล	7
	2.4 วัตถุดิบ	8
	2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบ	9
	2.6 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง	10
	2.7 วิธีการทดลอง	11
3	**ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง**	12
	3.1 ส่วนประกอบทางเคมีของซังข้าวโพด	12
	3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทของซังข้าวโพดโดยใช้กรดซัลฟูริก	12
	3.3 ผลการศึกษาการย่อยเซลลูโลสโดยเอมไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)	14
	3.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนและกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (Total Fermentable Sugar)	16
	3.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบของซังข้าวโพดก่อนการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนและหลังกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	17
	3.6 การผลิตบิวทานอล	20
4	**สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป**	26
5	**เอกสารอ้างอิง**	27
	ภาคผนวก	29

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นบิวทานอล	2
3.1	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสในส่วนของของเหลว หลังจากการปรับสภาพโดยกรดซัลฟูริก (ปริมาตร / ปริมาตร) ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (a) 5 นาที (b) 15 นาที, (c) 30 นาที, และ (d) เวลา 60 นาที	13
3.2	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสในส่วนของ Hydrolyzate หลังจากกระบวนการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์	15
3.3	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เอนไซม์ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลา (—•—) น้ำตาลกลูโคสและ (—■—) น้ำตาลทั้งหมด	15
3.4	ซังข้าวโพด (a) ก่อนปรับสภาพด้วยกรดอ่อน (b) หลังปรับสภาพด้วยกรดอ่อน	18
3.5	แสดงความหนาแน่นของเซลล์เมื่อวัดด้วย UV-Spectrophotometer และการลดลงของน้ำตาลกลูโคสระหว่าง (—) C. beijerinckii TISTR1461 และ (---) C. acetobutylicum TISTR1462	20
3.6	แสดงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์และกรด Yield, Productivity และร้อยละของน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด ระหว่าง C. beijerinckii TISTR1461 (ที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 2, 4 และ 6) และ C. acetobutylicum TISTR1462 (ที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 2)	21
3.7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล, เอทานอล, Yield และ Productivity กับปริมาณ Ammonium acetate	22
3.8	ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณกลูโคสที่ใช้ เมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium acetate	23
3.9	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นผลิตภัณฑ์อะซีโตน, บิวทานอล, เอทานอล และกรด กับระยะเวลาในการหมัก	24

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	สมบัติของเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ	2
2.1	คุณสมบัติทางเคมีของชีวมวลแต่ละชนิด	9
3.1	ส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่างซังข้าวโพด	12
3.2	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและอะราบิโนสในส่วนของของเหลวหลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยใช้กรดอ่อน	14
3.3	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนและกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	17
3.4	ผลการศึกษาองค์ประกอบของซังข้าวโพดก่อนการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนและหลังกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	19
3.5	ความเข้มข้นของสารประกอบต่าง ๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Overliming	24
3.6	เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองอื่นที่มีการตีพิมพ์	25

บทที่ 1
บทนำ

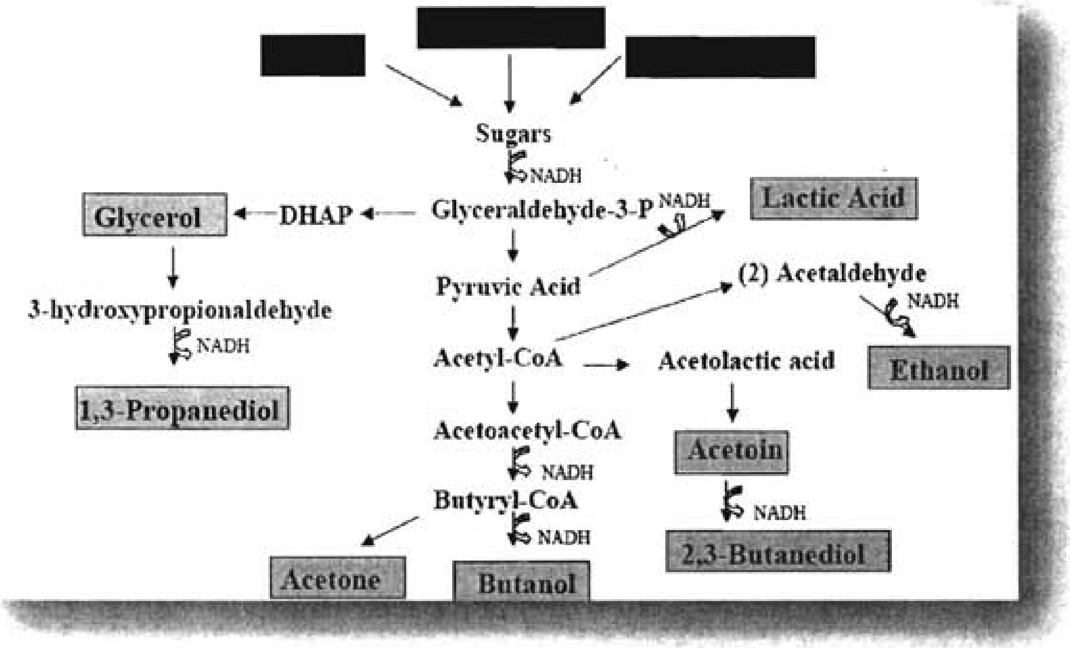
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันปัญหาด้านพลังงานเชื้อเพลิงมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องมาจากการลดปริมาณลงของน้ำมันดิบ สถานการณ์ความไม่แน่นอนของราคาน้ำมันดิบ และปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น พลังงานทดแทนจึงก้าวเข้ามามีบทบาทที่สำคัญ โดยเฉพาะเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น ไบโอดีเซล และเอทานอล อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเอทานอล คือ ต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลจะต้องผ่านกรรมวิธีการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยอาศัยพลังงานความร้อนที่ได้จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงเป็นพลังงานหลัก เพื่อให้ได้เอทานอลความเข้มข้นสูง

บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนสี่อะตอม โดยบิวทานอล (Biobutanol) สามารถผลิตได้จากน้ำตาลเช่นเดียวกันกับเอทานอลและยังมีโอกาสที่จะเป็นเชื้อเพลิงที่ได้รับความนิยมในอนาคต ในตารางที่ 1.1 (http://en.wikipedia.org/wiki/Butanol) ในปริมาณเท่ากัน บิวทานอลสามารถให้พลังงานออกมาได้มากกว่าเอทานอลถึง 25% ดังนั้นบิวทานอลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพจึงได้รับความสนใจมากขึ้น บิวทานอลมีความดันไอต่ำ RVP(Reid Vapor Pressure) ทำให้มีความปลอดภัยสูงกว่า นอกจากนี้เอทานอลจะดูดโมเลกุลของน้ำและมักจะกัดกร่อนท่อที่ขนส่งน้ำมัน ดังนั้นบิวทานอลซึ่งมีความกัดกร่อนที่น้อยกว่าเอทานอลทำให้ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นฐานของท่อส่ง หรือสถานีจ่ายเชื้อเพลิง เราสามารถนำบิวทานอลไปผสมกับน้ำมันเบนซินในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าเอทานอล โดยปราศจากการต้องปรับปรุงเครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังมีความประหยัดกว่าการที่ใช้เอทานอล และเมื่อมองในมุมของสิ่งแวดล้อม การเผาไหม้ของบิวทานอลไม่ก่อให้เกิด SOx, NOx หรือ คาร์บอนมอนอกไซด์ การใช้พลังงานความร้อนในกระบวนการแยกของบิวทานอลก็ยังใช้พลังงานน้อยกว่าเอทานอล
เนื่องจากคุณสมบัติในการละลายน้ำที่น้อยกว่า โดยทั่วไปในการหมักวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อผลิตบิวทานอลจะให้ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิดคือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ปริมาณหรืออัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านกระบวนการหมักขึ้นกับวัตถุดิบและสภาวะที่ใช้ในการหมัก ในงานวิจัยส่วนใหญ่มีการนำผลิตผลทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี น้ำตาล ข้าวฟ่าง มาใช้เป็นวัตถุดิบ และในอนาคตกำลังมีการวิจัยเพื่อนำวัสดุจำพวกที่มีเซลลูโลส (Cellulose-based-crops) เช่น ฟางข้าวโพด หรือ หญ้าจำพวก Switchgrass นอกจากนี้การใช้วัตถุดิบที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งเป็นวัสดุจำพวกที่มีเซลลูโลส จะช่วยลดต้นทุนของราคาวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ

ตารางที่ 1.1 สมบัติของเชื้อเพลิงชนิดต่าง ๆ

Fuel	Energy density (MJ/L)	Air-fuel ratio	Specific energy (MJ/kg air)	Heat of vaporization (MJ/kg)	Research octane No.	Motor octane No.
Gasoline & Biogasoline	32	14.6	2.9	0.36	91-99	81-89
Butanol fuel	**29.2**	**11.2**	**3.2**	**0.43**	**96**	**78**
Ethanol fuel	19.6	9.0	3.0	0.92	129	102
Methanol fuel	16	6.5	3.1	1.2	136	104



รูปที่ 1.1 กระบวนการเปลี่ยนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นบิวทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาขั้นตอนในการปรับสภาพวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ให้ได้ปริมาณบิวทานอลสูงที่สุด

1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง

ประเทศไทยมีปริมาณชีวมวลจากเซลลูโลสสูงที่สามารถนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ วัตถุดิบทางการเกษตรหรือชีวมวลที่มีความเป็นไปได้สูงในการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล ได้แก่ ฟางข้าว, ชานอ้อย, ซังข้าวโพด ซึ่งการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับราคาในท้องถิ่นและองค์ประกอบภายในที่สามารถนำมาย่อยเป็นน้ำตาลได้ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสจะต้องใช้การแตกย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ที่มาจากพืชพลังงานชีวภาพ หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยการทำลายผนังเซลที่เป็นโพลีเมอร์ (Biopolymers) ไปสู่น้ำตาล ดังนั้นการเลือกวัสดุทางการเกษตรที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นโดยผ่านกระบวนการ pretreatment ซึ่งกระบวนการ pretreatment ที่นิยมคือการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง, การใช้เบสและการใช้เอนไซม์ การใช้กรดซึ่งถือเป็นวิธีย่อยที่ง่ายที่สุดก็สามารถทำได้ การใช้กรดเจือจางเพียงอย่างเดียวจะเป็นการย่อยเฉพาะ Xylan และเหลือส่วนที่เป็นเซลลูโลสไว้ ดังนั้นการใช้กรดเจือจางร่วมกับเอนไซม์ Cellulase และ Cellobiase ทำให้ได้น้ำตาลรวมในปริมาณที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามการใช้กรดเจือจางย่อยวัสดุทางการเกษตรมีผลทำให้เกิดสารยับยั้งการหมัก Furfural, Hydroxy methyl furfural และสารประกอบ Ferulic แม้จะสามารถใช้วัสดุโพลีเมอร์ในการดูดซับก็ไม่สามารถกำจัดได้โดยสมบูรณ์ โดย Qureshi et al. ศึกษาการนำใยข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นและใช้กรดเจือจางร่วมกับเอนไซม์ในการ pretreatment ซึ่งผลปรากฏว่าการใช้กรดเจือจางร่วมกับเอนไซม์นั้น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีค่าน้อยกว่าการใช้กรดเจือจางเพียงอย่างเดียวร่วมกับ เรซิน XAD-4 ซึ่งทำหน้าที่ดูดซับสารยับยั้งการหมักที่เกิดจากการย่อยโดยใช้กรดเจือจาง โดยมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองควบคุมที่ใช้เพียงกลูโคสอย่างมาก ในขณะที่การทดลองของ Qureshi et al. ได้มีการทดลองเปรียบเทียบการ pretreatment 2 วิธี คือ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) และ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยใช้ฟางข้าวสาลีซึ่งเป็นวัสดุทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้น ทั้ง 2 วิธีใช้ทั้งกรดซัลฟิวริกเจือจางและเอนไซม์(เซลลูเลส , Glucosidase และ Xylanase) แต่ SSF จะเป็นการใส่เอนไซม์ลงไปในขณะการหมัก ผลที่ได้พบว่า SHF ให้ productivity ของผลิตภัณฑ์สูงกว่า SSF ในขณะที่ yield มีค่าต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการใช้ทั้งกรดและเอนไซม์แบบ SSF (Simultaneous saccharification and fermentation) ในการย่อยฟางข้าวสาลีและ Gas Stripping เพื่อนำผลิตภัณฑ์ออกจากระบบให้ค่าผลิตภัณฑ์

ใกล้เคียงกับการใช้สารตั้งต้นจากกลูโคส แต่ก็ยังไม่สามารถผลิตตัวทำละลายจากชีวมวลเองได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากจำเป็นต้องเติมสูตรอาหาร P2 ลงในสารตั้งต้นด้วย

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลว เชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพและปริมาณการผลิตของเชื้อเพลิงเหลวที่ได้ ดังงานวิจัยที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ *C. beijerinckii* BA101 ในการหมักร่วมกับเมล็ดข้าวโพดที่นำผิวออกพบว่าการลดการเติมสารอาหาร P2 ลงครึ่งหนึ่งของปกติไม่ทำให้ผลิตภาพลดลงแต่เมื่อไม่เติมก็ไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ขึ้นเลย ทำให้การหมักจากชีวมวลแบบกะมีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้สารตั้งต้นจากน้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามการหมักแบบกะเมื่อเสร็จสิ้นและนำเชื้อไปใช้ในการหมักกะต่อไปมักเกิดความด้อยลงในการผลิตตัวทำละลาย (Degeneration) จึงต้องเติมอะซีเตตลงในสูตรอาหารซึ่งให้ผลดีสำหรับ *Clostridium beijerinckii* NCIMB และ *C. beijerinckii* BA101 นอกจากนั้นสำหรับ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 เมื่อเติมบิวทิเรทลงในสูตรอาหารยังพบว่าอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ผลิตได้มีค่าเปลี่ยนแปลงไป

เนื่องจากแบคทีเรียใช้น้ำตาลเป็นอาหารในการหมักให้ได้ผลิตภัณฑ์ ดังนั้นถ้าเซลล์ใช้น้ำตาลไปเร็วกว่าน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสารตั้งต้นก็จะทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงัก Qureshi et al. ได้เพิ่มชุดการทดลองเปรียบเทียบโดยมีชุดหนึ่งที่เพิ่มน้ำตาลตั้งแต่ตอนเริ่มต้น ผลที่ได้พบว่า productivity และ yield ของ ABE มีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งน้ำตาลจากการย่อยเพียงอย่างเดียว โดยเมื่อตรวจปริมาณน้ำตาลที่เวลาต่างๆ พบว่าการเติมน้ำตาลลงไปแต่ต้น ปริมาณน้ำตาลที่ลดลง (อันเนื่องมาจากเซลล์ใช้ในการหมัก) ไม่ได้ลดลงจนหมดเทียบกับกรณีที่ไม่เติมน้ำตาลพบว่าน้ำตาลหมดไปจากระบบตั้งแต่ 23 ชั่วโมงแรกของการหมัก ซึ่งในการหมักที่เหมาะสมควรมีน้ำตาลในระบบอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นการเพิ่มน้ำตาลก่อนกระบวนการหมักจึงมีผลทำให้การหมักเป็นไปได้อย่างราบรื่นกว่า

ปริมาณกรดที่เซลล์ผลิตได้จากการหมักนั้นก็มีผลเช่นเดียวกัน ดังที่กล่าวมาข้างต้นกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับช่วง Acidogenesis และ Solventogenesis การที่ไม่มีกรดในระบบเลยจะทำให้การเลื่อนของเมตาบอลิซึมเป็นไปได้ยาก *Sun-Mi Lee* ได้มีการทดลองโดยเพิ่มกรดบิวทีริกลงไปในตอนต้นของการหมัก พบว่าให้ผลที่ดีหลายประการ คือ นอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นสูงขึ้นแล้ว อัตราส่วนที่ได้ก็เปลี่ยนไป และยังทำให้เซลล์มีจำนวนลดลงที่ช้าลง โดยสามารถดำเนินการหมักต่อไปได้ถึง 150 วัน ในการทดลองแบบต่อเนื่อง อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เปลี่ยนไปนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใส่ เช่น ถ้าใส่กรดบิวทีริก สุดท้ายจะได้ปริมาณบิวทานอลเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการหมักจึงควรเติมกรดบิวทีริกมากกว่าที่จะเติมกรดอะซีติกซึ่งจะทำให้อะซีโตนมากขึ้น ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการแยกบิวทานอลสูงขึ้น

สารเคมีที่มีผลต่อกระบวนการหมักยังรวมถึงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก โดยบิวทานอลที่ผลิตได้เมื่อมีความเข้มข้นมากกว่า 13 กรัม/ลิตร จะส่งผลเสียต่อเชื้อแบคทีเรีย นอกจากบิวทานอลแล้วสารประกอบแอลกอฮอลล์ทั้งเมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล ฯลฯ ที่

เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นกลับมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง ในการหมักโดยใช้เชื้อ *C. saccharoper butylacetonicum* ATCC 27022 (ซึ่งเชื่อว่าผลิตบิวทานอลได้มากกว่า *C. acetobutylicum*) และใช้ฟางข้าวเป็นสารตั้งต้น เมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ร่วมกับถ่านกัมมันต์หลังการย่อยให้ปริมาณตัวทำละลายรวมเพิ่มขึ้น และมากขึ้นอีกเมื่อเพิ่ม $FeSO_4$ ในระหว่างการหมัก เทคโนโลยีการหมักปัจจุบันในระดับอุตสาหกรรมเป็นการหมักแบบต่อเนื่องซึ่งให้ผลิตภัณฑ์มากกว่าแบบกะถึง 20-50% แต่ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่องคือความไม่เสถียรในการผลิตเนื่องจากแบคทีเรียถูกชะออกจากระบบ ปัญหาดังกล่าวถูกแก้ด้วยการทำให้แบคทีเรียฝังลงบนวัสดุซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพแล้วยังทำให้ค่าผลิตภัณฑ์เพิ่มจากเดิมอีกมาก โดยก้อนอิฐให้ผลิตภัณฑ์ในการผลิตตัวทำละลายมากกว่าไคโตซานถึง 10 เท่า

ในการหมักแบบต่อเนื่องนั้น วิธีหนึ่งที่จะทำให้เซลล์มีความเข้มข้นอยู่ตลอดเวลาและทำให้ปฏิกิริยามีเสถียรภาพที่ดีนั้น มักมีการ immobilize เซลล์ลงบนวัสดุที่มีรูพรุน ซึ่ง *Sun-Mi lee* แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการหมักที่ใช้เซลล์แขวนลอยในตัวกลางกับเซลล์ที่มีการ immobilize ลงบน polyvinyl alcohol ที่มีรูพรุน พบว่าระบบที่มีการ immobilize ให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รวมและบิวทานอลสูงกว่า รวมถึง productivity และ yield ของผลิตภัณฑ์รวมที่สูงกว่า นอกจากนั้นอัตราส่วนของอะซีโตน/บิวทานอล มีค่าเปลี่ยนแปลงไป โดยบิวทานอลมีค่าลดลงเกือบ 2 เท่า ในขณะเดียวกันก็มีผู้ทดลองหาวัสดุที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการ immobilize เซลล์ เช่น Coke, chitosan matrix, Calcium alginate, Bonechar โดยผลของ Qureshi et al.ที่ใช้ Clay brick เป็นวัสดุรองรับได้ค่า productivity สูงที่สุด โดยจัดเป็นวัสดุที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของเซลล์นั้น อัตราส่วนทั่วไปจะอยู่ที่ประมาณ อะซีโตน:บิวทานอล:เอทานอล เท่ากับ 3:6:1 ในระบบเมื่อปริมาณบิวทานอลมากกว่า 10-13 กรัมต่อลิตร จะทำให้ระบบเป็นพิษต่อเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์จะถูกยับยั้ง ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าหาวิธีการที่จะนำบิวทานอลออกจากระบบ ไม่ว่าจะเป็นวิธีการ Adsorption, Extraction, Perstraction, Reverse osmosis, Pervaporation หรือ Gas stripping ซึ่งวิธีสุดท้ายนี้มีข้อดีมากกว่าวิธีอื่นคือไม่ได้เป็นแค่เพียงวิธีการที่จะนำบิวทานอลออกจากระบบแต่ยังเป็นการใช้แก๊สที่ผลิตได้จากการหมักมาใช้ในการกวนของระบบด้วย เนื่องจากภายในระบบที่ประกอบด้วยเซลล์นั้น การกวนแบบเชิงกลจะมีผลทำให้เซลล์เสียหาย Qureshi et al. ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง Reactor ที่มีระบบ Gas stripping และที่ใช้การกวนด้วยเครื่องกล พบว่า Gas stripping ช่วยทำให้ productivity มีค่าสูงขึ้นในขณะที่ yield มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก

1.4 ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ เป็นโครงการตั้งแต่กระบวนการผลิตจนถึงการประยุกต์การนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนโดยผสมกับน้ำมันเบนซินหรือดีเซลเพื่อใช้เป็นน้ำมันแก๊สโซออล์หรือดีโซออล์

1. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการ pretreatment วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล
3. การศึกษาคุณสมบัติของน้ำมันที่ผสมได้เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาหาสภาวะของขั้นตอนการ pretreatment ที่ดีสำหรับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิด
2. ศึกษาหาสภาวะที่ดีที่สุดในการหมักสำหรับการหมักแบบกะ
3. ศึกษาสมบัติของเชื้อเพลิงผสมที่ได้จากการนำบิวทานอลมาทดแทนการใช้เอทานอล
4. สรุปผลการวิจัยและเขียนบทความเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ส่งเสริมให้มีฐานความรู้ในการใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงแทนเอทานอลในประเทศไทย
2. ส่งเสริมให้มีการเรียนรู้การผลิตบิวทานอลจากวิธีการหมักซึ่งต่างจากกระบวนการในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี
3. ส่งเสริมให้มีการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาผลิตบิวทานอล โดยใช้เชื้อภายในประเทศที่เหมาะสมในการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ อะซีโตน บิวทานอลและเอทานอล
4 ผลิตมหาบัณฑิตที่มีความรู้ด้านนี้โดยเฉพาะ

บทที่ 2
การผลิตเชื้อเพลิงบิวทานอล

2.1 บิวทานอล

บิวทานอลมีชื่อเรียกอยู่หลายชื่อ เช่น butyl alcohol หรือ biobutanol ในกรณีที่ผลิตมาจากกระบานการทางชีวภาพ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยสายคาร์บอน 4 ตัวและหมู่ไฮดรอกซิลด์ (OH-) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เป็นมีสารมีขั้วอ่อนๆ ซึ่งมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่ต่ำ ในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะ ของเหลว และระเหยได้ง่าย บิวทานอลสามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิง

2.2 การใช้งาน

บิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ อีกทั้งยังใช้บิวทานอลในการเป็นตัวทำละลายที่ต้องการการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล ในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้ในเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซนต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลมีค่าความร้อนมากกว่าเอทานอลและมีค่าความร้อนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน (เบนซิน) และสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน จึงใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

1. ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซินทดแทนเอทานอล ได้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ (Gasohol)
3. นำไปผสมกับน้ำมันดีเซลทดแทนเอทานอล ได้น้ำมันดีโซฮอล์ (Diesohol)

2.3 กระบวนการผลิตบิวทานอล

บิวทานอลสามารถได้มาจากสองวิธีคือ

1. กระบวนการทางเคมี ที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน

2. กระบวนการ fermentation จากวัสดุชีวมวล (biomass)

วิธีที่นิยมในปัจจุบัน คือ fermentation โดยใช้แบคทีเรียและยีสต์ที่เหมาะสม ซึ่งเรียกว่า ABE fermentation โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในตระกูล Clostridium เช่น Clostridium butylicum และ Clostridium acetobutylicum ซึ่งเดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อผลิต acetone จากสารจำพวกแป้ง ซึ่งได้บิวทานอล เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม ที่ได้ออกมาจากการหมัก ซึ่งบิวทานอลที่ได้นั้นมากพอสมควร ในปัจจุบัน ABE fermentation มีกระบวนการดังนี้คือ เมื่อสารตั้งต้น เช่น อ้อย น้ำตาล ถูกหมักรวมกับยีสต์แล้วได้ผลผลิตเป็นเอทานอล ต่อมา anaerobic bacteria มีได้ผลิตผลหลัก 3 ชนิด คือ acetone, butanol, ethanol ในสัดส่วน 3:6:1 และให้ butyric acid, acetic acid, hydrogen, carbon dioxide เป็นผลพลอยได้

ในปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีสูงขึ้นทำให้บริษัทหลายบริษัท เช่น Dupont, British petroleum, British sugar operation ในประเทศอังกฤษ หันมาให้ความสนใจศึกษาการผลิตบิวทานอล แต่กระบวนการในการผลิตนั้นยังเป็นความลับ และบางส่วนอยู่ในขั้นของการวิจัยด้วย

2.4 วัตถุดิบ

เนื่องจากน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงหลักของโลกมีปริมาณลดน้อยลงและมีราคาที่สูงขึ้นทุกปี รวมทั้งมีความผันผวนมาก การหาพลังงานทดแทนพลังงานจากน้ำมันปิโตรเลียมจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น เอทานอล แบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ คือ

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีตรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น
3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือ "ชีวมวล" เช่น ชานอ้อย กากมัน แกลบ สามารถนำมาเป็นพลังงานได้ พลังงานชีวมวลจึงเป็นพลังงานทดแทนอย่างหนึ่งซึ่งประเทศไทยมีความได้เปรียบหลายอย่างเนื่องจากเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการผลิตชีวมวลสูง โดยชีวมวลมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน มีคุณสมบัติทางทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของชีวมวลแต่ละชนิด

ที่มา มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม **(http://www.efe.or.th)**

Proximate analysis	ทะลายปาล์ม	ลำต้นปาล์ม	ทางปาล์ม	ซังข้าวโพด	ลำต้นข้าวโพด	เหง้ามันสำปะหลัง	เปลือกไม้ยูคาฯ
Moisture, %	58.60	48.40	78.40	40.00	41.70	59.40	60.00
Ash, %	2.03	1.20	0.70	0.90	3.70	1.50	2.44
Volatile Matter, %	30.46	38.70	16.30	45.42	46.46	31.00	28.00
Fixed Carbon, %	8.90	11.70	4.60	13.68	8.14	8.10	9.56
Ultimate Analysis							
Carbon, %	21.15	23.90	10.13	28.19	27.83	18.76	18.60
Hydrogen, %	2.56	3.04	1.25	3.36	4.06	2.48	2.12
Oxygen, %	15.34	22.91	9.44	27.42	22.47	17.50	16.68
Nitrogen, %	0.27	0.56	0.07	0.12	0.13	0.32	0.15
Sulfur, %	0.04	0.06	0.02	0.03	na	0.04	0.02
Chlorine, %	0.16	na	0.12	0.05	na	0.05	0.10
Ash, %	2.03	1.20	0.70	0.90	3.70	1.50	2.44
Moisture, %	58.60	48.40	78.40	40.00	41.70	59.40	60.00
Other Characteristics							
Bulk Density, kg/m^3	380	na	na	na	na	250	na
Higher heating value, kJ/kg	9,196	9,370	3,908	11,298	11,704	7,451	6,811
Lower heating value, kJ/kg	7,240	7,556	1,760	9,615	9,830	5,494	4,917

2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบ

ในการสังเคราะห์บิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาย่อยให้เป็นน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar) เพื่อนำไปผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation) นำไปผลิตบิวทานอลต่อไป

ขั้นตอนที่ 1 การปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคส) (Hydrolysis) เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลหรือบิวทานอลด้วยยีสต์ในขั้นต่อไป โดยวิธีการย่อยแป้งอาจใช้กรดย่อยแป้ง (Acid Hydrolysis) หรือใช้เอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุน

ขั้นตอนที่ 1 ในงานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment) ด้วยการใช้เครื่องปฏิกรณ์ให้ความร้อน (Autoclave) และกรดซัลฟูริก ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนหลักดังนี้

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature Control)
- ขดลวดให้ความร้อนหุ้มด้วยฉนวนกันความร้อน (Coil Heater with Ceramic Plate)
- ตัวเครื่องปฏิกรณ์ สแตนเลสสตีลชนิดทนกรด (Stainless Steel Type 316)

จากนั้นทำการทดสอบระบบทั้งหมดและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งได้แก่อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก

ขั้นตอนที่ 2 ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ เมื่อได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 1 ในการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ จากนั้นได้ศึกษาโดยใช้เอนไซม์โดยได้ศึกษาสภาวะของอุณหภูมิ เวลา และค่าความเป็นกรดด่าง ที่ส่งผลต่อการย่อยเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเสร็จสมบูรณ์แล้ว

2.6 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. Autoclave
2. Incubator shaker
3. Oven
4. Water bath
5. Glassware
6. Perkin Elmer Series 200 LC/S/N291N5060508: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a refractive index detector using an Aminex–HPX 87H column (300 mm x78 mm, Bio–Rad Lab, USA)
7. Scanning Electron Microscope (SEM)

8. Thermogravimetric Analyzer (TGA)
9. X–ray Diffraction (XRD)
10. Gas Chromatography (GC)
11. Corn cobs obtained from Betagro company
12. Sulfuric acid (H_2SO_4)
13. pH meter
14. Citrate buffer
15. Filter paper
16. Enzyme (Novozyme, Genencer)
17. Standard glucose, xylose, arabinose, galactose and mannose

2.7 วิธีการทดลอง

2.7.1 การปรับสภาพด้วยกรดอ่อน

นำตัวอย่างซังข้าวโพดที่มีขนาดเท่ากันมาทำการปรับสภาพโดยกรดซัลฟิวริกเจือจางใน Autoclave โดยผสมตัวอย่างซังข้าวโพดกับกรดซัลฟูริกในอัตราส่วน 1:15 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2–10 % (v/v) อุณหภูมิที่ศึกษาอยู่ในช่วง 100–160 °C ระยะเวลาในการทดลอง 5–60 นาที หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยการใช้เทคนิค HPLC

2.7.2 Enzymatic Hydrolysis

ในการทดลองนี้ใช้ศึกษาขั้นตอนนี้โดยใช้เอนไซม์ Cellulase ของบริษัท Novozyme ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างและซิเตรต บัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:30 และปรับสภาพความเป็นกรดด่างไว้ที่ pH = 4.8 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.05 N citric acid–sodium citrate buffers) ที่อุณหภูมิ 48 °C 150 rpm.

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 ส่วนประกอบทางเคมีของซังข้าวโพด

การวิเคราะห์องค์ประกอบของตัวอย่างซังข้าวโพดพบว่า มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดคือร้อยละ 42.60 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือปริมาณเซลลูโลส และปริมาณลิกนินคือร้อยละ 39.04 และ 7.56 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบทางเคมีของตัวอย่างซังข้าวโพด

Chemical components	Dry solid (%)
Cellulose	39.04
Hemicellulose	42.60
Lignin	7.56
Ash	2.19

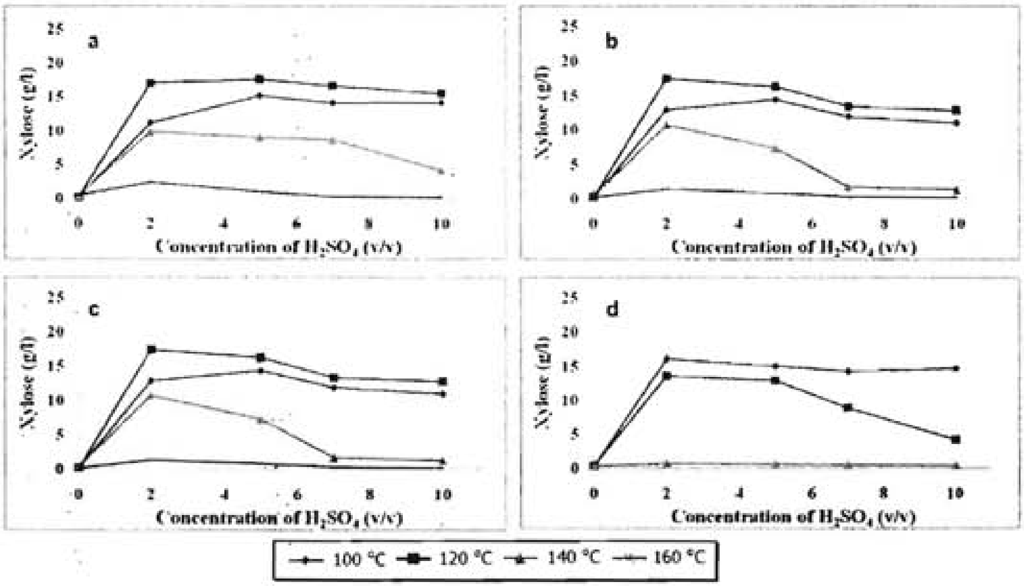
3.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไฮโดรไลเสทของซังข้าวโพดโดยใช้กรดซัลฟูริก

การใช้กรดซัลฟูริกย่อยสลายสารประกอบจำพวกชีวมวลหรือลิกโนเซลลูโลสจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากวัตถุดิบดังกล่าวประกอบด้วย ลิกนิน เพกติน เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และโปรตีนที่มีโครงสร้างแบบทุติยภูมิ และโครงสร้างแบบตติยภูมิ ทำให้ย่อยสลายได้ยาก ดังนั้นก่อนการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก จึงจำเป็นที่ต้องมีขนาดเหมาะสมและโครงสร้างที่เป็นผลึก ตลอดจนเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการสัมผัสกับกรดซัลฟูริก ซึ่งสารละลายดังกล่าวจะทำลายโครงสร้างที่เป็นไฟเบอร์

ในการใช้กรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อนใน Autoclave มีการศึกษาตัวแปร 3 ตัวแปร ได้แก่ การศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อนที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย, การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโดยใช้กรดซัลฟูริกร่วมกับความร้อน ในการศึกษาเริ่มต้นใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2-10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร อัตราส่วนระหว่างกรดซัลฟูริกต่อปริมาณซังข้าวโพดเท่ากับ 15:1 เวลาในการย่อยสลาย 5-60 นาที โดย

ส่วนใหญ่จะใช้กรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นต่ำในการย่อยสลายวัตถุดิบประเภทชีวมวล เนื่องจากการใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีอันตราย

จากผลการทดลองพบว่าผลผลิตน้ำตาลไซโลสสูงสุดของในส่วนของของเหลวคือ 17.58 กรัมต่อลิตร หลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 5, อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียสและเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที อย่างไรก็ตาม น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2 อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียสและเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาทีและการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2 อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียสและเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15 นาที พบว่ามีผลิตผลที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 3.1 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสในส่วนของของเหลว หลังจากการปรับสภาพโดยกรดซัลฟูริก (ปริมาตร / ปริมาตร) ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (a) 5 นาที (b) 15 นาที, (c) 30 นาที, และ (d) เวลา 60 นาที

ในส่วนของของเหลวหลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดยังมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และน้ำตาลอะราบิโนส (Arabinose) ผลแสดงในตารางที่ 3.2 แสดงให้เห็นน้ำตาลทั้งหมดที่ได้หลังจากการปรับสภาพโดยใช้กรดอ่อน นอกจากนั้นยังแสดงอีกว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิหรือความเข้มข้นของกรด ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลอะราบิโนส เนื่องจากภายใต้ภาวะการปรับสภาพที่รุนแรงขึ้น ทำให้เฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสได้

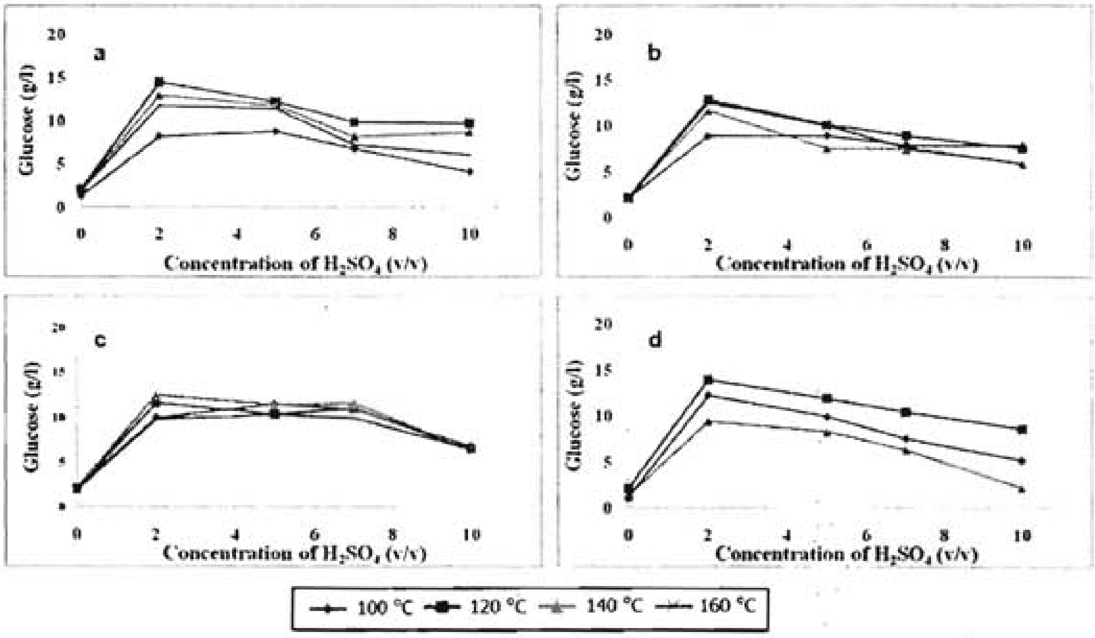
อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นเซลลูโลสจะถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและอะราบิโนส เป็นต้น (Lloyd และ Wyman 2005)

3.3 ผลการศึกษาการย่อยเซลลูโลสโดยเอมไซม์ (Enzymatic Hydrolysis)

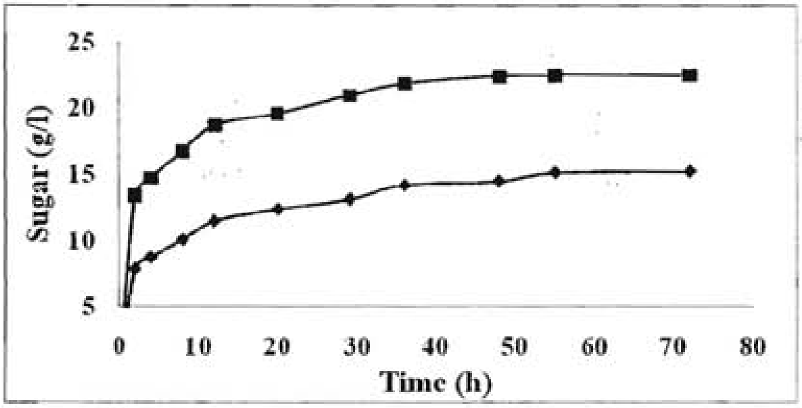
หลังจากกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ของเหลว (Hydrolyzate) ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวถูกวิเคราะห์หาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำพวก น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น ผลแสดงดังรูปที่ 2 ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดที่วัดได้ใน Hydrolyzate ได้ 14.48 กรัมต่อลิตร และ 22.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้จากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2 อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียสและเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที ผลแสดงในรูปที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและอะราบิโนสในส่วนของของเหลวหลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดโดยใช้กรดอ่อน

Sulfuric acid concentration % (v/v)	Temperature (°C)	Time (min)	Glucose (g/l)	Arabinose (g/l)	Total sugar (g/l)
2	100	30	2.16	6.21	24.93
2	120	5	3.34	3.17	24.74
2	120	15	3.42	3.58	25.97
5	100	30	2.97	5.31	25.73
5	120	5	3.58	3.46	25.53
5	120	15	4.49	3.49	25.17
10	120	60	2.63	1.39	8.23



รูปที่ 3.2 น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสในส่วนของ Hydrolyzate หลังจากกระบวนการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์



รูปที่ 3.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เอนไซม์ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลา (—◆—) น้ำตาลกลูโคสและ (—■—) น้ำตาลทั้งหมด

รูปที่ 3.3 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์ Cellulase ของ Novozyme ที่ประกอบด้วยเซลลูเลส (Celluase), เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase), และ β–glucosidase โดยที่ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการย่อยของเอนไซม์คือ กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 2 อุณหภูมิที่ 120 องศาเซลเซียส และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที จาก

รูปแสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เอนไซม์ผลิตได้ในแต่ละช่วงเวลา ผลสรุปได้ว่าปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่เอนไซม์ผลิตได้คือที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์คือที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งผลสอดคล้องกับ Sumphanvanich et al., 2008

ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่ได้ในขั้นตอนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากการกำจัดเฮมิเซลลูโลสเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสเพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสหลังจากย่อยสลายของเอนไซม์ (Redding et al., 2011)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพซังข้างโพดไม่ได้เป็นเพียงการกำจัดเฮมิเซลลูโลส แต่ยังรวมถึงการเพิ่มอัตราการย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้จำเป็นต้องประเมินประสิทธิภาพในการปรับสภาพโดยรวมทั้งหมดทั้งน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสหลังจากผลผลิตทั้งการปรับสภาพและกระบวนการของเอนไซม์ ตามลำดับ

3.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังจากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนและกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (Total Fermentable Sugar)

น้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพซังข้าวโพด 2 ขั้นตอน ซึ่งประกอบไปด้วยด้วยกรดอ่อน (Prehydrolyzate) และกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (Hydrolyzate) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3 น้ำตาลรวมทั้งหมดที่มีปริมาณสูงได้แก่ การปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก ร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15 นาที, ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที (ภาวะที่ปริมาณน้ำตาลสูงสุดหลังจากการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน) และความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที (ภาวะที่ปริมาณน้ำตาลสูงสุดหลังจากกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์) โดยรวมทั้งหมดแล้วพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตน้ำตาลคือที่ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 5 นาที ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 47.11 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนและกระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

Sulfuric acid concentration % (v/v)	Temperature (°C)	Time (min)	Acid Pretreatment		Enzymatic hydrolysis		Total Sugar (g/l)
			Xylose (g/l)	Total sugar (g/l)	Glucose (g/l)	Total sugar (g/l)	
2	120	5	17.05	24.73	14.48	22.37	47.11
2	120	15	17.57	25.52	12.23	18.79	44.32
5	120	5	17.41	25.97	12.88	21.11	47.09

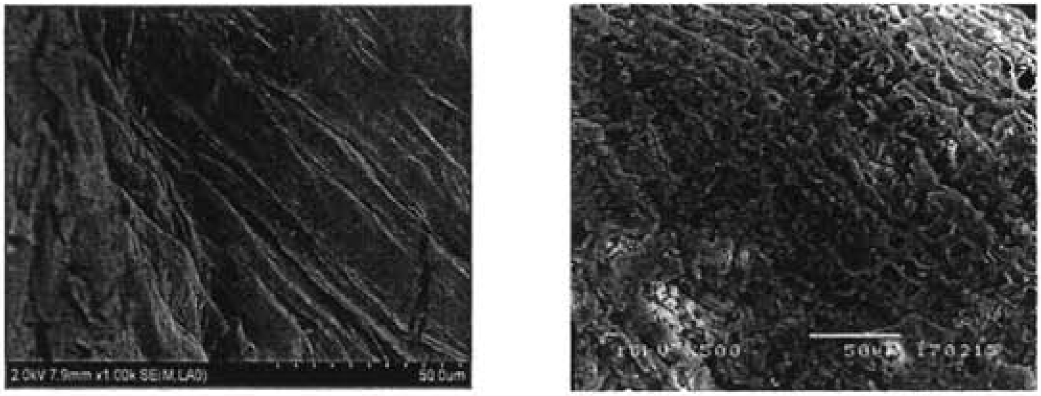
3.5 ผลการศึกษาองค์ประกอบของซังข้าวโพดก่อนการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนและหลังกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการสูญเสียปริมาณน้ำหนักของซังข้าวโพด (Weight loss) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสูญเสียปริมาณน้ำหนักของซังข้าวโพดที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากการกำจัดของอสัณฐานวัสดุ (Amorphous materials) โดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลส การสูญเสียปริมาณน้ำหนักของซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดอ่อนมีปริมาณที่สูงกว่าการปรับสภาพด้วยน้ำเพียงอย่างเดียวที่สภาวะเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.4 ส่วนปริมาณของเซลลูโลสไม่ได้รับผลกระทบจากการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนซึ่งสอดคล้องกับงานของ Kostic et al., 2008 การกำจัดเฮมิเซลลูโลสโดยการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อนเนื่องจากอิออนโปรตอนของกรดซัลฟูริก สามารถแทรกเข้าไปในพื้นผิวของซังข้าวโพด จากนั้นต่อด้วยกระบวนการ De–acetylation และ Hydrolysis ตามลำดับ ซึ่งจะตัดพันธะ β–(1,4)–glycosidic ของเฮมิเซลลูโลสกลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลส (Chen et al., 2011) ส่วนปริมาณของลิกนินได้ไม่ถูกกำจัดออกเพราะความแข็งแรงโครงสร้างในพันธะของคาร์บอน–คาร์บอนในโมเลกุลของลิกนิน (Pejic et al, 2008)

ผลการศึกษาความเป็นผลึกของเซลลูโลสได้ในตารางที่ 3.4 ความเป็นผลึกของเซลลูโลสเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยเซลูโลส (Mosier et al., 2005) ดังนั้นความเป็นผลึกเป็นตัวบ่งชี้การจัดเรียงตัวของผลึกเซลลูโลส และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกำจัดส่วนที่เป็นอสัณฐานโดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน (Gabhane et al, 2010) รวมถึง

การทำลายพันธะไฮโดรเจนทั้งในและระหว่างกลุ่มเซลลูโลส ดังนั้นการกำจัดเฮมิเซลลูโลสในการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนส่งผลให้ดัชนีความเป็นผลึกสูงขึ้น

ผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) พบว่าลักษณะทางกายภาพก่อนการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน พื้นผิวของซังข้าวโพดมีลักษณะเรียบและไม่มีรูพรุน ส่วนซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน (ดังแสดงในรูปที่ 3.4) พื้นผิวของซังข้าวโพดมีรูพรุนมากขึ้น เนื่องจากการกำจัดจำพวกสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่เซลลูโลส, สารอนินทรีย์, ไข เป็นต้น ออกจากพื้นผิวซึ่งสามารถช่วยในการเข้าถึงเอนไซม์มากขึ้น เนื่องจากวัสดุชีวมวลมีพื้นที่ผิวมากขึ้น (Gabhane et al, 2010) เพื่อเป็นการสนับสนุนผลการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทางงานวิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ผิว, ปริมาตรของรูพรุนและขนาดของรูพรุน ของซังข้าวโพดก่อนการปรับสภาพและหลังการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 3.4 พบว่าปรับสภาพด้วยกรดอ่อน มีผลต่อการเพิ่มพื้นที่ผิว และภาวะของการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มพื้นที่ผิวจาก 0.994 ตารางเมตรต่อกรัม ถึง 3.87 ตารางเมตรต่อกรัม (Chen et. al., 2011)



รูปที่ 3.4 ซังข้าวโพด (a) ก่อนปรับสภาพด้วยกรดอ่อน (b) หลังปรับสภาพด้วยกรดอ่อน

ตารางที่ 3.4 ผลการศึกษาองค์ประกอบของซังข้าวโพดก่อนการปรับสภาพด้วยกรดอ่อนและหลังกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

Sample	Weight loss (%)	Composition (Acid pretreatment)[b]			Physical properties			Composition (Enzymatic hydrolysis)[d]		
		Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	CrI[c] (%)	BET (m^2/g)	Particle size (nm)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Untreated	–	39.04	42.6	7.56	29.07	0.99	7.34	–	–	–
Acid Pretreatment[a]	65	67.63	4.06	25.53	33.19	3.87	5.85	38.38	3.18	38.53
Water Pretreatment[a]	14.85	42.01	40.36	9.63	31.42	1.36	7.12	38.93	38.33	12.36

[a] The sample were pretreated at 120 °C 5 min 2 % of H_2SO_4

[b] Each value is the average of three replicates and calculated on the basis of dry weight.

[c] CrI (%) = $(I_{002}-I_{am})/I_{002}*100$ where I_{002} is intensity of the 002 peak at 2O = 22.4° and I_{am} is intensity of the background scatter at 2O = 18.7° (Kim and Holtzapple, 2006).

[d] After 48 h of enzymatic hydrolysis

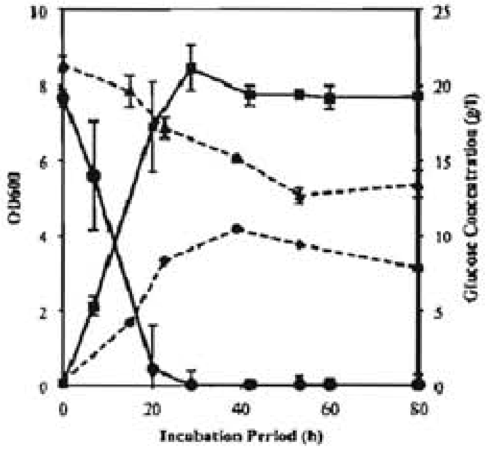
3.6 การผลิตบิวทานอล

เนื่องจากการใช้แหล่งอาหารที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (ซังข้าวโพด) ไม่สามารถ ควบคุมองค์ประกอบสารอาหารได้อย่างสมบูรณ์ ในการทดลองจึงเลือกที่จะเริ่มต้นด้วยการใช้อาหารสังเคราะห์
ก่อนเพื่อดูปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ในการจำกัดสารอาหาร และสุดท้ายจึงใช้อาหารที่ได้จากการย่อยซัง
ข้าวโพดร่วมกับอาหารเสริม โดยแบ่งเป็น 4 การทดลองหลัก ดังนี้

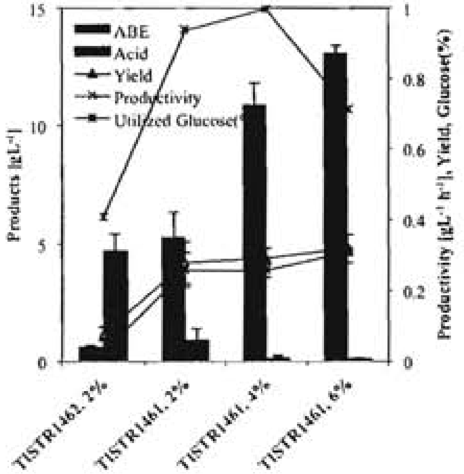
1. ศึกษาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหมาะสมกับเชื้อ C. beijerinckii TISTR1461
2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตโดยปรับปรุงสูตรอาหาร
3. ศึกษาการปรับปรุงอาหารในขั้นก่อนผลิตให้เหมาะสมกับชนิดของน้ำตาลที่ใช้ในขั้นผลิต
4. ทดลองผลิตบิวทานอลโดยใช้แหล่งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด

3.6.1 <u>ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหมาะสมกับ C. beijerinckii TISTR1461</u>

ในขั้นแรกเริ่มมีการเลือกเชื้อที่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอล โดยผ่านกระบวนการ ABE fermentation ซึ่งใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ในงานวิจัยนี้เลือกเชื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ C. beijerinckii TISTR1461 และ C. acetobutylicum TISTR1462 และนำมาใช้กับสูตรอาหาร P2 ซึ่งใช้กับ C. beijerinckii BA101 ซึ่งเป็นสูตรอาหารและเชื้อสามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นมากที่สุด โดยเริ่มจำกัดปริมาณน้ำตาลที่ 20 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณเริ่มต้น



รูปที่ 3.5 แสดงความหนาแน่นของเซลล์เมื่อวัดด้วย UV-Spectrophotometer และการลดลงของน้ำตาลกลูโคสระหว่าง (—) C. beijerinckii TISTR1461 และ (---) C. acetobutylicum TISTR1462



รูปที่ 3.6 แสดงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์และกรด Yield, Productivity และร้อยละของน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด ระหว่าง C. beijerinckii TISTR1461 (ที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 2, 4 และ 6) และ C. acetobutylicum TISTR1462 (ที่ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 2)

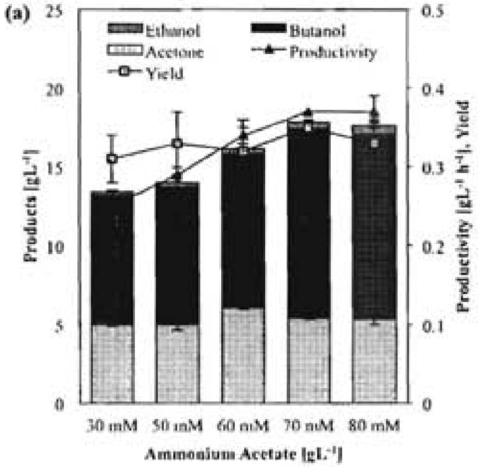
จากรูปที่ 3.5 พบว่าเมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกัน (P2) และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสปริมาณเท่ากัน (2% โดยน้ำหนัก) พบว่าค่าดูดกลืนแสงเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของ C. beijerinckii TISTR1461 มีค่ามากกว่า C. acetobutylicum TISTR1462 แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเซลล์ที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 มีมากกว่าซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ โดยในตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าสามารถใช้น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรหมดภายใน 24 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อดูผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักในรูปที่ 3.6 พบว่านอกจาก C. acetobutylicum TISTR1462 จะเจริญเติบโตได้ไม่ดีในสูตรอาหารชนิดนี้แล้ว ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ก็เป็นกรดเสียเป็นส่วนใหญ่ซึ่งไม่ใช่เป้าหมายของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยผลสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำหมัก ที่ไม่สามารถเปลี่ยนเฟสจากการผลิตกรดเป็นการผลิตสารละลายได้ตามทฤษฎี โดยเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า "Acid Crash" ในขณะที่ C. beijerinckii TISTR1461 สามารถผลิตสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลได้ในปริมาณที่เทียบได้กับที่มีการรายงานในวารสารปัจจุบัน (เมื่อเทียบทั้ง Productivity และ Yield)

ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงศึกษาเฉพาะ C. beijerinckii TISTR1461 และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส เนื่องจากที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อ C. beijerinckii TISTR1461 สามารถใช้น้ำตาลได้หมดภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 40 กรัมต่อลิตร และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีทั้งสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลเพิ่มขึ้น ในการเพิ่มสารตั้งต้นและใช้หมดสำหรับความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สำหรับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ที่เวลาเดียวกัน มีการใช้สารตั้งต้นมากกว่าและได้ผลิตภัณฑ์มากกว่า และไม่ได้ใช้สารตั้งต้นจนหมดเมื่อการหมักสิ้นสุด

3.6.2 <u>การปรับปรุงสูตรอาหาร</u>

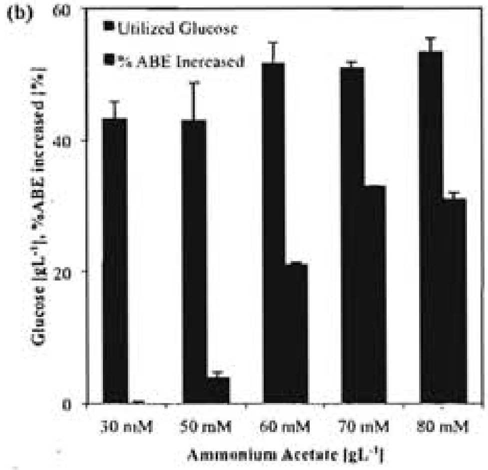
จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มการผลิตสารละลายอะซีโตน บิวทานอลและเอทานอล โดยเพิ่มกรด Acetic และ Butyric ลงในสูตรอาหารเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ต้องการโดยศึกษาร่วมกับการดำเนินไปของปฏิกิริยาภายในเซลล์ด้วย สารประกอบชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาคือ Ammonium acetate ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มลงในสูตรอาหาร ยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลมีการปรากฏแถบที่ชัดเจนขึ้นเมื่อสังเกตด้วยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการเติม Ammonium acetate ต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยเติม Ammonium acetate ในสูตรอาหาร P2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 30, 50, 60, 70, 80 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ซึ่งมีผลดีต่อการเป็นบัฟเฟอร์ด้วย เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ Ammonium acetate เดิม ค่าความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่า 5.0 ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอล เมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium acetate ขึ้น พบว่าค่าความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าไม่ต่ำกว่า 5.0 ตลอดการหมัก ซึ่งทำให้คาดการณ์ได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นด้วยดังแสดงในรูปที่ 3.7 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium acetate ทำให้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีค่าสูงขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละมากที่สุดที่ความเข้มข้นของ Ammonium acetate เท่ากับ 70 มิลลิโมลาร์ และลดลงเล็กน้อยที่ 80 มิลลิโมลาห์ โดยร้อยละที่เพิ่มขึ้นมากที่สุดมีนัยยะสำคัญเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีทางสถิติ ANOVA นอกจากความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มากขึ้นแล้ว Productivity ที่มากขึ้นยังบอกได้ถึงการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่ระยะเวลาเท่ากัน ส่วน Yield ที่มีค่าไม่แตกต่างกันมากแต่ปริมาณน้ำตาลที่ใช้เพิ่มขึ้น บอกถึงการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 3.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล, เอทานอล, Yield และ Productivity กับปริมาณ Ammonium acetate

เมื่อเทียบกับสูตรอาหารเดิม (P2) ที่มีความเข้มข้นของ Ammonium acetate เท่ากับ 30 มิลลิโมลาร์ การเพิ่มปริมาณเป็น 70 มิลลิโมลาร์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 33 และมีการใช้น้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร โดยอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังคงเท่าเดิมคือ อะซีโตน:บิวทานอล เท่ากับ 1:2



รูปที่ 3.8 ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณกลูโคสที่ใช้ เมื่อเพิ่มปริมาณ Ammonium acetate

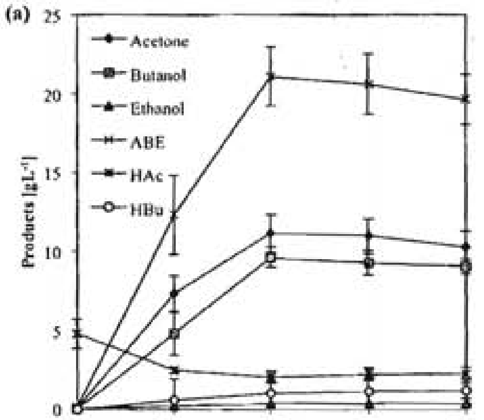
3.6.3 <u>ทดลองผลิตบิวทานอลโดยใช้แหล่งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด</u>

จากการทดลองโดยการเปลี่ยนอัตราส่วนของน้ำตาลในขั้นตอนก่อนผลิตบิวทานอลพบว่าสามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ในขั้นผลิตได้และใช้น้ำตาลรวมสูงสุดประมาณ 50 กรัมต่อลิตร (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตรและไซโลส 20 กรัมต่อลิตร) ในการทดลองโดยใช้แหล่งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดจึงมีการเติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงไปให้ได้น้ำตาลรวมเป็น 50 กรัมต่อลิตร (เนื่องจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางมีปริมาณน้อยอาจไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในตอนต้นของการหมัก) และการย่อยโดยใช้กรดและความร้อนสูง (ร้อยละ 0.75 โดยปริมาตรของกรดซัลฟูริก และให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ทำให้เกิดสารประกอบ Furfural ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จึงต้องมีการกำจัดออกด้วยกระบวนการ Overliming โดยใช้ $Ca(OH)_2$ ในปริมาณสูงมีผลทำให้องค์ประกอบรวมมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยดังแสดงในตารางที่ 3.5 และสามารถลดปริมาณ Furfural ลงอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 3.5 ความเข้มข้นของสารประกอบต่างๆ ก่อนและหลังผ่านกระบวนการ Overliming

	Before Overliming $[gL^{-1}]$	After Overliming $[gL^{-1}]$
Glucose	1.60	1.96
Xylose	15.85	14.68
Arabinose	3.43	4.46
Total Sugar	20.88	21.10
Acetic acid	2.16	2.85
Furfural	0.04	0.01

รูปที่ 3.9 แสดงความเข้มข้นของสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลที่ผลิตได้โดยมีปริมาณสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในส่วนของการใช้น้ำตาลที่มีการเติมเพื่อให้มีความเข้มข้นรวมเป็น 50 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการใช้น้ำตาลอย่างมีประสิทธิภาพซึ่งรวมถึงน้ำตาลไซโลสและอะราบิโนสที่ได้โดยตรงจากการย่อยซังข้าวโพด ดังนั้นถ้ามีการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยซังข้าวโพดให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นโดยใช้เอนไซม์ก็จะสามารถใช้เป็นแหล่งน้ำตาลสำหรับการผลิตสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลได้เป็นอย่างดี เนื่องจากการย่อยด้วยกรดเพียงอย่างเดียวเป็นการทำลายโครงสร้างและได้น้ำาลไซโลสมาเพียงบางส่วนเท่านั้น



รูปที่ 3.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นผลิตภัณฑ์อะซีโตน, บิวทานอล, เอทานอล และกรด กับระยะเวลาในการหมัก

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลกับงานวิจัยอื่นๆที่มีการตีพิมพ์ โดยใช้แหล่งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ต่างกัน รวมถึงการย่อยและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าปริมาณความเข้มข้นรวมของสารละลายอะซีโตน, บิวทานอลและเอทานอลที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าสูง (แต่อัตราส่วนของ อะซีโตน:บิวทานอลเพิ่มขึ้นจาก 1:2 เป็น 5:4) และค่า Yield และ Productivity ก็เป็นที่น่าพอใจ

ตารางที่ 3.6 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการทดลองอื่นที่มีการตีพิมพ์

Substrate	Hydrolysis	Culture	ABE (gL^{-1})	ABE yield	ABE productivity	Reference
Rice straw	Alkaline	C. saccharoper butylacetonicum ATCC27022	20.40	0.35	0.24	(Soni et al. 1982)
Defatted rice bran	Dilute sulfuric acid	C. beijerinckii NCIMB8052	13.19	0.44	0.37	(Jieun et al. 2009)
Wheat bran	Dilute sulfuric acid	C. beijerinckii ATCC55025	11.18	0.32	0.16	(Liu et al. 2010)
Corn fiber	Dilute sulfuric acid	C. beijerinckii BA101	9.3	0.39	0.10	(Qureshi et al. 2008)
Corncobs	Dilute sulfuric acid	C. beijerinckii TISTR1461	20.58	0.45	0.44	This work

บทที่ 4
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากการศึกษาเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีประโยชน์มากในแง่การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาผลิตเป็นเชื้อเพลิง แต่ในงานวิจัยเกี่ยวข้องมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมากกว่าการใช้วัสดุประเภทอื่นคือต้องทำการแปรสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน มาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมักและการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ดังนั้นการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มีความสำคัญมากต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยกรดซัลฟูริกเจือจาง และตามด้วยขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสของเอนไซม์ ในขั้นตอนการปรับสภาพของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรใช้กรดซัลฟูริกเจือจางมีตัวแปรที่ต้องศึกษาหลายตัว เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา ค่าความเป็นกรดด่าง จากผลการทดลองพบว่าผลผลิตน้ำตาลทั้งหมดรวมทั้งสิ้น 47.11 กรัมต่อลิตร และมีการนำน้ำตาลที่ได้ไปผ่านกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลโดยใช้เชื้อ *C. beijerinckii* TISTR1461 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ พบว่าได้ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลรวม 20.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งควรจะต้องมีการพัฒนางานวิจัยต่อไปเพื่อเพิ่มปริมาณบิวทานอล โดยขณะนี้นิสิตปริญญาเอกได้ไปทำงานวิจัยในต่างประเทศเพื่อจะได้มาต่อยอดงานที่กำลังศึกษาอยู่

บทที่ 5
เอกสารอ้างอิง

[1] Jin, S., Chen, H. (2005), Structural properties and enzymatic hydrolysis of rice straw, Process Biochemistry, 41, 1261-1264

[2] Weil, J.R., Dien, B.S., Bothast, R., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R. (2002), Removal of Fermentation Inhibitors Formed during Pretreatment of Biomass by Polymeric Adsorbents, Industrial & Engineering Chemistry Research, 41, 6132-6138

[3] Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J., Dien, B.S., Cotta, M.A., Blaschek, H.P. (2007), Butanol production by *Clostridium beijerinckii.* Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber, Bioresource Technology, 99, 5915-5922

[4] Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R., Cotta, M.A. (2008), Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation, Biomass and Bioenergy, 32, 168-175

[5] Qureshi, N., Blaschek, H.P. (1999), Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance, Biomass and Bioenergy, 17, 175-184

[6] Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P. (2006), Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*, Process Biochemistry, 42, 34-39

[7] Chen, C., Blaschek, H.P. (1998), Effect of acetate on molecular and physiological aspects of Clostridium *beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration, Applied and Environmental Microbiology, 65, 499-505

[8] Chen, C.K., Blaschek, H.P. (1999), Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101, Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 170-173

[9] Chen, W., Pen, B., Yu, C., and Hwang, W. (2011), Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilite –acid and steam explosion for bioethanol production. Bioresource Technology 102, 2916–2924.

[10] Liu Z., Ying Y., Li F., Ma C., and Xu P. (2011), Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 37 (5), 495-501.

[11] Jieun L., Seo E., Kweon D.-H., Park K., and Jin Y.-S. (2009), Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using Clostridium beijerinckii NCIMB 8052 J. Microbiol. Biotechnol. 19(5), 482–490.

[12] Lee, S., Cho, M.O., Park, C.H., Chung, Y., Kim, J.H., Sang, B., Um, Y. (2008), Continuous Butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate, Energy and Fuels, 22, 3459-3464

[13] Izard, A., Goma, G., Soucaille, P. (1989), Effects of various alcoholic supplements on the growth rate of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 179-183

[14] Soni, B.K., Das, K., Ghose, T.K. (1982), Bioconversion of agro-wastes into Acetone Butanol, Biotechnology Letters, 4, 19-22

[15] Gabhane, J., William, S.P.M., Vaidya, Atul., Mahapatra, Kalyani., and Chakrabarti, T. (2010), Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment – A cellulosic ethanol perspective. Biomass and Bioenergy, 1–7.

[16] Redding, A., Wang, Z., Keshwani, D., and Cheng, J. (2011) High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology 102, 2916–2924.

[17] Lloyd, T., and Wyman, C. (2005) Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresource Technology 96, 1967–1977.

[18] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., and Ladisch, M. R. (2005). Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology 96(6), 673-686.

[19] Pejic B.M., Kostic M.M., Skundric P.D., Praskalo J.Z. (2008) The effects of hemicelluloses and lignin removal on water uptake behavior of hemp fibers. Bioresource Technology 99 (15), 7152-7159.

[20] Kostic M., Pejic B., Skundric P. (2008) Quality of chemically modified hemp fibers, Bioresource Technology 99, 94–99.

[21] Sumphanwanich J., Leepipatpiboon N., Srinorakutara T., Akaravharanya A. (2008) Evaluation of dilute–acid pretreated bagasse, corn cobs and rice straw for ethanol fermentation by Saccharomyces Cerevisiae. Annals of microbiology 58, 219–225.

[22] "แอลกอฮอล์" โครงการการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงาน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ร่วมกับ สำนักนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ สำนักปลัดกระทรวงพลังงาน กระทรวงพลังงาน

ภาคผนวก

งานวิจัยที่ได้เสนอในที่ประชุม The 2nd Research Symposium on Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials and The 17th PPC Symposium on Petroleum, Petrochemicals, and Polymers ในวันอังคารที่ 26 เมษายน 2554 เวลา 08.30 – 17.00 น. ณ ห้อง Meeting Room 1-4 ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ และเขียนเป็น manuscript เพื่อส่งในวารสาร Bioresource Technology

Combined Acid and Enzymatic Hydrolysis Pretreatment of Corn Cobs

Kasid Tangmanasakul[a], *Apanee Luengnaruemitchai*[a,b*], *Sujitra Wongkasemjit*[a,b]

[a]The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University

[b]Center for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Chulalongkorn University

ABSTRACT

Biofuels produced from lignocellulosic materials, so called second generation biofuels, shown energetic, economic and environmental advantages in comparison to biofuels produced from starch or sugar. There are two main processes involved in the various conversion routes: hydrolysis of cellulose to produce reducing sugar and fermentation of sugars to biofuels. Therefore, the pretreatment of lignocellulosic materials to remove hemicellulose and lignin can significantly enhance the hydrolysis of cellulose. The main goal of research is to increase the enzyme accessibility by improving digestibility of cellulose. Accordingly, dilute sulfuric acid was used to pretreat corn cobs prior to enzymatic hydrolysis. After the pretreatment of corn cobs by dilute acid under the identified optimum condition (120 °C, 5 min), the highest yield of total sugars of 24.73 g/l was obtained. After enzymatic hydrolysis, the highest yield of total sugars of 22.37 g/l was obtained and the final total sugar yield reached 47.10 g/l. It can be concluded that dilute sulfuric acid pretreatment can be used to achieve high yields of monomeric glucose and xylose from corn cobs.

***apanee.l@chula.ac.th**

INTRODUCTION

Lignocellulosic materials can be used as substrates for the production of bioethanol because of abundance, cheapness, and renewability (Gabhane *et al.*, 2010). Normally, lignocellulosic biomass like corn, cassava, sugarcane etc. is mainly composed of cellulose (38-50%), hemicellulose (23-32%), and lignin (15-30%) of biomass material on dry basis along with smaller amounts of extractive and ash.

Corn cobs are the most abundant agriculture waste around the world and the amount available in Thailand has been estimated to 3.85 million tons of corn per year Therefore, corn cobs are considered to be an attractive source for bioethanol production (Chen *et al.*, 2011). The most common processing of lignocellulosic biomass to bioethanol consists of four majors; pretreatment of raw materials, enzymatic hydrolysis of the pretreated materials into fermentable sugars, fermentation of the fermentable sugar into bioethanol, and ethanol separation (Lin *et al.*, 2010).

Pretreatment is an important step for enzymatic hydrolysis required to alter the structure of cellulose and to make it more accessible for enzymatic hydrolysis. Therefore, the main objective of pretreatment is to remove both hemicellulose and lignin and to enhance the surface area of substrates. Pretreatment methods are either physical or chemical. Among the chemical pretreatment methods, dilute acid hydrolysis is widely used, since there is the fermentable sugar known xylose after acid pretreatment in the aqueous phase. Moreover, this method is an effective and inexpensive method. (Gabhane *et al.*, 2010).

The objective of this work is to improve the production of fermentable sugar (xylose, glucose, and arabinose) of corn cobs, by using dilute sulfuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis.

EXPERIMENTAL

A. Pretreatment

The effect of pretreatment conditions (reaction temperature, acid concentration and residence time) on the sugar yields in the hydrolysate liquors was investigated. Sulfuric acid concentrations of 2%, 5%, 7%, and 10% (v/v) were examined at temperatures of 100, 120, 140, and 160 °C and residence times of 5, 15, 30, and 60 min.

After pretreatment, the reactor was cooled. Then, the samples were filtered for solid and liquid fraction recovery. The liquid phase called hydrolysate was stored to investigate the content sugar. And the solid residue was washed by tap water until neutral pH and dried for 24 h at 65 °C. The pretreatment procedure flow diagram is shown in Figure 1.

B. Enzymatic Hydrolysis

The solid residue was transferred to a 250 ml shake flask and then the pH was adjusted to 4.8 by adding 50 mM citrate buffer at 3% (w/v) solid loading. The flask was put in an incubator shaker. The enzymatic digestion was carried out at 50 °C and 150 rpm for 48 h.

C. Ethanol Production

Saccharomyces cerevisiae is a high efficiency ethanol producing yeast strain. Active yeast was mixed with sugar solution after adjusting pH from 4.8 to 7 in ratio 1:10 and transferred to an incubator shaker at 37 °C for 1 day to 3 days. After this process completed, the solution was stored in order to analyze the ethanol concentration by a GC instrument.

RESULTS AND DISCUSSION

A. Dilute Acid Pretreatment

Figure 2 contains four graphs corresponding to each residence time. Each graph shows the monomeric xylose measured in the hydrolysate. The results showed that the effect of combination of temperature and acid concentration because the effects of temperature and acid concentration offer the greatest influence, about 25% (Redding *et al.*, 2011). The highest yield of xylose measured in the hydolyzate of 17.58 g/l was obtained after the sample pretreated with 5% H_2SO_4, 120 $^{\circ}$C, and 5 min residence time.

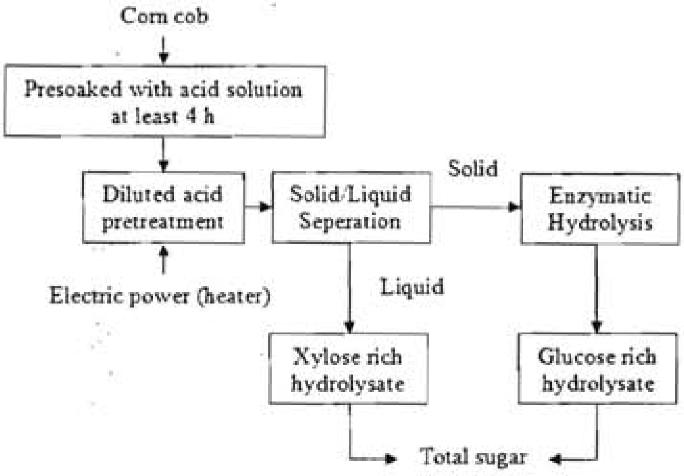


Figure 1 Flow diagram of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis

Figure 2 also shows xylan oligomer content at the point of the highest total yields when corn cobs were pretreated with dilute sulfuric acid. The amount of xylan oligomers as a fraction of the total solubilized xylose was greatest at short pretreatment times, coinciding with the breakdown of the fast xylan fraction (Esteghlalian *et al.*, 1997). After the optimum point each condition was under harsh conditions, which were too long residence time and too high reaction temperature, carbohydrates are degraded into furfural and HMF which in turn are degraded into levulinic acid and formic acid, respectively (Redding *et al.*, 2011).

B. Enzymatic Hydrolysis

After the enzymatic hydrolysis, the hydrolysate was analyzed for glucose, xylose and arabinose monomers. Figure 3 shows the monomeric glucose measured in the hydrolysate. The highest yield of glucose and total sugar measured in the hydolysate were 14.48 g/l and 22.38 g/l, respectively, with 2% sulfuric acid at 120 ^{o}C for 5 min. The acid pretreatment gave high glucose yields because hemicellulose is removed from pretreatment.

C. Total Sugar

The total sugars (fermentable sugars) were the summation of the xylose and glucose monomers found in both the prehydrolysate and the hydrolysate. The highest total glucose and xylose yields were obtained with the sample pretreated at 120 ^{o}C with a sulfuric acid concentration of 2% and 5 min reaction time. At this condition the total sugar 47.11 g/l was obtained.

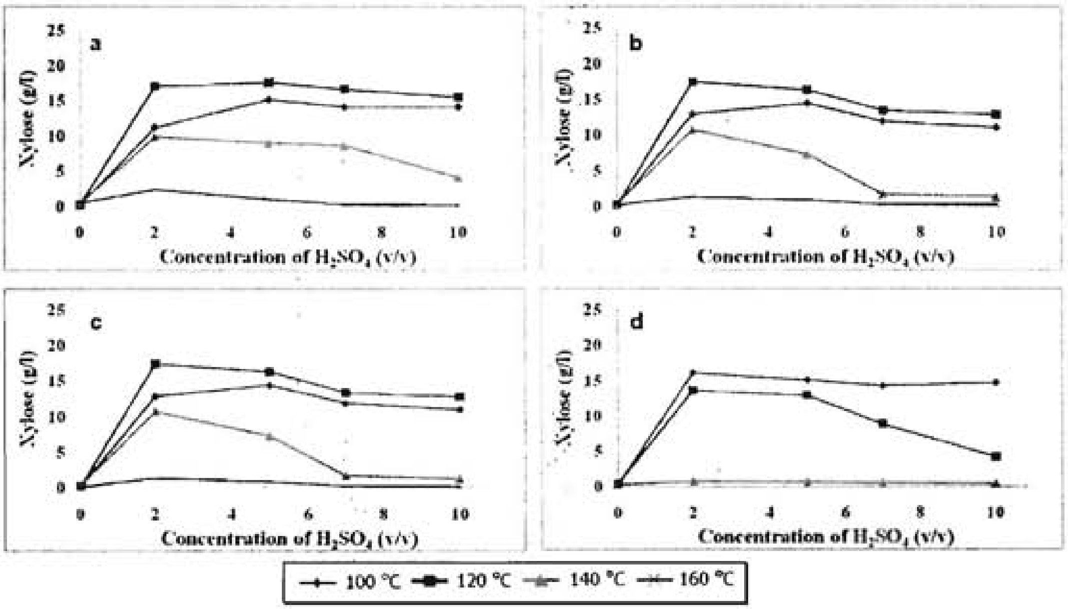


Figure 2 Monomeric xylose measured in the prehydrolysate after pretreatment as a function of sulfuric acid concentration (v/v) and temperature for (a) 5 min (b) 15 min, (c) 30 min, and (d) 60 min residence time.

D. Ethanol Production

After hydrolysis, the sample was fermented with *Saccharomyces Cerevisiae*, the highest ethanol yield of 5.6 and 7.0 g/l were obtained from prehydrolysate sugar and hydrolysate sugar, respectively.

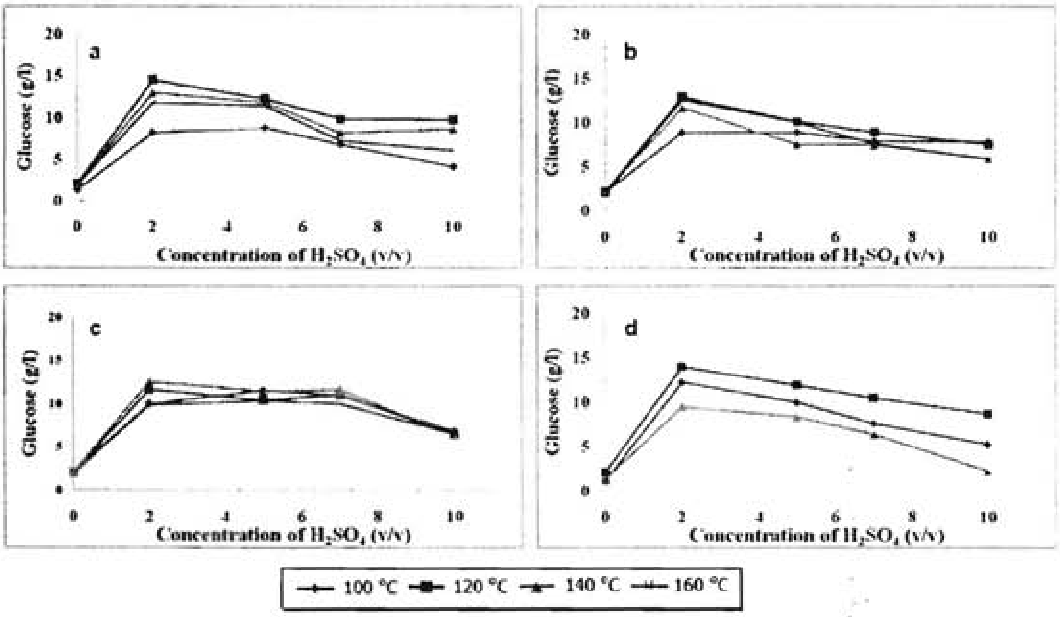


Figure 3 Monomeric glucose measured in the hydrolyzate after pretreatment as a function of sulfuric acid concentration (v/v) and temperature for (a) 5 min (b) 15 min, (c) 30 min, and (d) 60 min residence time.

CONCLUSION

The dilute acid pretreatment studies described above satisfy and meet some of the more important requisites for an effective pretreatment process. This dilute acid hydrolysis is to maximize the xylose conversion and to destroy the corn cob structure in order to enhance enzymatic hydrolysis. Our study shows that there may be opportunities for further process optimization, finding the right pretreatment temperature, reaction time, concentration of sulfuric acid and /or enzyme combinations. Moreover, this research also shows that the ethanol production can be obtained from the fermentable sugar.

ACKNOWLEGEMENT

The authors would like to thank the Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Thailand. The authors also sincerely thank Betagro company for providing corn cobs. Their contribution to this thesis work is highly appreciated.

REFFERENCES

Chen, W., Pen, B., Yu, C., and Hwang, W. (2011) Bioresource Technology. **102**, 2916-2924.

Gabhane, J., William, S.P.M., Vaidya, Atul., Mahapatra, Kalyani., and Chakrabarti, T. (2010) Biomass and Bioenergy, 1-7.

Lin, L., Yan, R., Liu, Y., and Jiang W. (2010) Bioresource Technology. **101**, 8217-8223.

Redding, A., Wang, Z., Keshwani, D., and Cheng, J. (2011) Bioresource Technology._**102**, 2916-2924.

Sumphanwanich, J., Leepipatpiboon, N., Srinorakutara, T., and Akaravharanya, A. (2008) Annals of microbiology. **58**, 219-225

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. ชื่อหัวหน้าโครงการ (ภาษาไทย) ...ดร. อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย....................................
(ภาษาอังกฤษ) ...Dr. Apanee Luengnaruemitchai.....................................
ตำแหน่งทางวิชาการ (ภาษาไทย) ...รองศาสตราจารย์..... (ภาษาอังกฤษ) ... Associate Professor....
ภาควิชา ....-....................................... คณะ/ สถาบัน ..วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี
โทรศัพท์ ..... 02-2184121........... โทรสาร .. 02-2154459...... E-mail ... apanee.l@chula.ac.th
รายละเอียดของภาระงานที่รับผิดชอบ......วางแผนการวิจัย ร่วมทำวิจัยในการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตบิวทานอล

2. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์.......................................
(ภาษาอังกฤษ) ... Dr. Sujitra Wongkasemjit...
ตำแหน่งทางวิชาการ (ภาษาไทย) ...รองศาสตราจารย์.... (ภาษาอังกฤษ) .... Associate Professor....
ภาควิชา ......-.................................... คณะ/ สถาบัน ....วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี
โทรศัพท์ ....02-2184133......... โทรสาร .....02-2154459...... E-mail ...dsujitra@chula.ac.th......
รายละเอียดของภาระงานที่รับผิดชอบ ..วางแผนการวิจัย ร่วมทำวิจัยในการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบและการหมักวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

3. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ...ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส ....
(ภาษาอังกฤษ) ...... Kittinan Komolpis..................
ตำแหน่งทางวิชาการ (ภาษาไทย) ......นักวิจัย.................. (ภาษาอังกฤษ) ....Researcher............
ภาควิชา ....-.......... คณะ/ สถาบัน ....สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ..
โทรศัพท์ ...... 02-2188073.... โทรสาร .. 02-2533543....... E-mail ...... kittinan.k@chula.ac.th ...
รายละเอียดของภาระงานที่รับผิดชอบ ....วางแผนการวิจัย ร่วมทำวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา ชนิดของสายพันธุ์ ชนิดของวัตถุดิบ

4. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ...นายอัครินทร์ บุญสมบัติ ....
(ภาษาอังกฤษ) ...... Akarin Boonsombuti..................
ตำแหน่งทางวิชาการ (ภาษาไทย) ....นิสิตปริญญาเอก... (ภาษาอังกฤษ) ....PhD student.....
ภาควิชา ....-.......... คณะ/ สถาบัน ....วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี...........
โทรศัพท์ ...... 02-2184121............. โทรสาร .. 02-6117220....... E-mail ...... akarinb@me.com...
รายละเอียดของภาระงานที่รับผิดชอบ ทำงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา ชนิดของสายพันธุ์

5. ชื่อผู้ร่วมโครงการ (ภาษาไทย) ...นายกษิด ตั้งมานะสกุล ....
(ภาษาอังกฤษ) ...... Kasid Tangmanasakul ....
ตำแหน่งทางวิชาการ (ภาษาไทย) ....นิสิตปริญญาโท... (ภาษาอังกฤษ) ....MS student........
ภาควิชา ....-.......... คณะ/ สถาบัน ....วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี...........
โทรศัพท์ ...... 02-2184121.... โทรสาร .. 02-6117220....... E-mail ...... irin_fa_fa@hotmail.com ...
รายละเอียดของภาระงานที่รับผิดชอบ ทำงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดอ่อน ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา