

บทคัดย่อ

ชื่อแผนงาน การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส

Ethanol from Cellulose

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2551 จำนวนเงิน 4,229,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 13 ตุลาคม 2551 – 12 ตุลาคม 2552

ชื่อผู้วิจัย ¹รศ.ดร.ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์ ²ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ ³รศ.ดร. วรทัศน์ อินทร์คัมพร

⁴ผศ.ดร. นงพงา คุณจักร ⁵ผศ.ดร. วรนุช เกิดสินธุ์ชัย ⁶ผศ.ดร.จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร ⁷ดร.บัณฑิต

ฝั่งสินธุ์ ⁸ดร.วรรณพ วิเศษสงวน ⁹ผศ. ดร.สุรพงษ์ พิณีกลาง ¹⁰ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสง ¹¹ดร.ธีร

ภัทร ศรีนรคุตร ¹²รศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา ¹³ผศ.ดร.ณัฐชนัน ธิพิพัฒน์ไพบุลย์

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพฯ

10140 โทรศัพท์ 02-470-8885 โทรสาร 02-427-8050, 02-470-8885 E-mail : pravate.tui@kmutt.ac.th

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร 02 579-2351 E-mail fscipms@ku.ac.th

³ ภาควิชาส่งเสริมการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทร 053 944-018 ต่อ 105

e-mail wallrata@chiangmai.ac.th

⁴ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มจร. โทรศัพท์ 02-470-8888 โทรสาร 02-470-8891, 02-470-8885

E-mail : nongpagha.kun@kmutt.ac.th

⁵ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มจร. โทรศัพท์ 02-470-8922 โทรสาร 02-470-8891, 02-470-8885

E-mail: iworanut@kmutt.ac.th

⁶ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยา

เขตบางขุนเทียน E-mail Address: jirasak.kon@kmutt.ac.th

⁷ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โทรศัพท์ 02-577-9055 โทรสาร 02-

577-9058

⁸ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โทรศัพท์ 02-564-6700 โทรสาร 02-564-6707

⁹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 10400 โทรศัพท์ 02-

697-6525 โทรสาร 02-277-7007

¹⁰ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

จ. สงขลา 90112 โทร. 0 7428 6372 โทรสาร 0 7444 6727 E-mail: piyarat.b@psu.ac.th

¹¹ ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 เทคโนโลยีธานี ถนนเลียบ

คลองห้า ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 โทร (02) 5779057 โทรสาร (02) 5779058 E-

- ¹² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. (02) 218-5070-1 โทรสาร (02) 252-7576 E-mail : sanchari@chula.ac.th
- ¹³ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท ปทุมวัน กทม. 10330 โทร. (02) 218-7608 โทรสาร (02) 218-7598 E-mail : natchanun.l@chula.ac.th

แผนงานวิจัย การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ทำการการศึกษาวิจัยใน 4 โครงการย่อย โดยโครงการที่ 1. เป็นการประเมินศักยภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตเอทานอล ส่วนโครงการที่ 2-4 เป็นการวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolysis) ให้ได้น้ำตาลสูงที่สุด ด้วยวิธี pre-treatment ด้วยกรด/ด่าง อาจร่วมกับการใช้ความร้อนและ/หรือความดัน การย่อยให้ได้น้ำตาลเชิงเดี่ยวด้วยกรดแก่/ด่าง หรือเอนไซม์ และการหมักด้วยยีสต์/แบคทีเรียชนิดต่างๆ แบบการหมักแยกกัน หรือการหมักร่วมกับของระบบการย่อย เพื่อแสดงศักยภาพในเชิงกระบวนการผลิตของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สำคัญได้แก่ วัสดุเหลือทิ้งจากมันสำปะหลัง ผักตบชวา ปาล์มน้ำมัน ยอดและใบอ้อย เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลจากการย่อยสูงสุด และการหมักน้ำตาล C5 และ C6 ที่เหมาะสมได้เอทานอลในปริมาณสูง

การประเมินศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในการผลิตเอทานอล โดยการรวบรวมข้อมูล ประกอบกับการสำรวจภาคสนามในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551-2552 พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีศักยภาพสูงและยังคงมีเหลือจากการใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ รวมแล้วประมาณ 30,000 เมกกะน้ำมัน (Mtoe) เรียงตามลำดับได้แก่ ฟางข้าว (7,297 ktoe) มีมากในภาคกลาง อีสานและภาคเหนือ จังหวัด นครสวรรค์ นครราชสีมา อุบลราชธานี สุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด สุพรรณบุรี พิษณุโลก รองลงไปได้แก่ ยอดและใบ 6,059 ktoe เมื่อไม่มีการเผาหรือ 1,756 ktoe เมื่อมีการเผา มีมากในภาคกลาง อีสานและภาคเหนือ ได้แก่กาญจนบุรี นครราชสีมา อุตรธานี ลพบุรี สุพรรณบุรี ขอนแก่น นครสวรรค์ ชัยภูมิ และกำแพงเพชร กากและเห้งมันสำปะหลัง (6,117 ktoe) มีมากในจังหวัดนครราชสีมา กำแพงเพชร ชัยภูมิ สระแก้ว ฉะเชิงเทรา ชลบุรี กาญจนบุรี กาฬสินธุ์ จันทบุรี และระยอง ลำต้น ใบและขังข้าวโพด (665 ktoe) ในจังหวัดภาคเหนือ อีสานและภาคกลาง โดยเฉพาะเพชรบูรณ์ นครราชสีมา นครสวรรค์ ตาก ลพบุรี ส่วนทะเลสาบเปล่าปาล์มน้ำมัน (587 ktoe) มีมากในภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดกระบี่ และสุราษฎร์ธานี และชุมพร และขุขะพร้าว (133 ktoe) มีมากในภาคกลางตอนล่าง เช่นสมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ตามลำดับ วัสดุที่ต้องรวบรวมใหม่แปลงได้แก่ ฟางข้าว, ต้นและใบอ้อยและ ใบและลำต้นข้าวโพด ทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มในส่วนการรวบรวมและการขนส่งอีกด้วย ส่วนขานอ้อย, กากมัน

สำปะหลังและทะลายปาล์มเปล่า ไม่ต้องรวบรวมเพราะอยู่ที่โรงงานแปรรูปอยู่แล้วทำให้มีต้นทุนการผลิตเอทานอลต่ำกว่าวัสดุที่ต้องรวบรวม ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่แตกต่างกันของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไม่มีผลต่อการแปรรูปเป็นเอทานอล สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุเสริมในการผลิตเพื่อให้สามารถมีวัตถุดิบตลอดปี และทำให้การบริหารวัตถุดิบเป็นไปได้สะดวกขึ้น ลิกนินที่ย่อยไม่ได้ แต่สามารถนำไปเผาให้เป็นพลังงานได้

เทคโนโลยีการผลิตแบบ hydrolysis based ยังมีข้อจำกัดของการย่อยเบื้องต้นด้วยกรดแก่หรือกรดอ่อน ที่ทำให้ต้นทุนสูงต้องมีวิธีการนำกลับมาใช้ใหม่ที่เหมาะสม กรดทำให้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นสารพิษที่อาจส่งผลกระทบต่อกรรมกรหมักเป็นเอทานอลได้ การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายมีต้นทุนสูง และต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนทั้งน้ำตาล C5 และ C6 ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลได้ การย่อยสลายรวมกับการหมักสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ ส่วนเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 800°C (Thermochemical Conversion) มี 2 รูปแบบคือ การเผาพร้อมกับการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (gasification/fermentation) หรือ ร่วมกับการใช้คะตะลิสต์ (gasification/catalytic) ต้นทุนการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสโดยวิธี hydrolysis จากเซลลูโลสที่ไม่จำเพาะกับวัตถุดิบจะเสียค่าใช้จ่าย 1.48-1.517 \$/galEtOH คิดเป็นต้นทุนในประเทศไทยเท่ากับ 13.68-14.03 บาท/ลิตร และต้นทุนการผลิตเอทานอลโดยวิธี Gasification ที่ไม่จำเพาะกับวัตถุดิบจะเสียค่าใช้จ่าย 1.739 \$/galEtOH หรือ 16.08 บาท/ลิตร ทดลองผลิตเอทานอลจากชานอ้อยในประเทศไทยพบว่าใช้น้ำในการผลิตเพียงประมาณ 6 (cellulolysis) และ 1.9 ส่วน (gasification) ส่วนต่อเอทานอล 1 ส่วนที่ผลิตได้

แนวโน้มเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสในประเทศสหรัฐอเมริกา เรียงปริมาณการผลิตจากมากไปน้อยคือวิธี gasification/fermentation 130 ล้านแกลลอน (mil gal), enzymatic hydrolysis 105 mil gal, gasification/catalyst 78 mil gal, diluted acid hydrolysis 37 mil gal, simultaneous saccharification/fermentation 31 mil gal, และ concentrated acid hydrolysis 21 mil gal ตามลำดับ

เมื่อนำผักตบชวาและวัสดุเหลือทิ้งจากมันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบ เพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลก่อนการหมัก (SHF) และกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมัก (SSF) จากผักตบชวาและต้นมันสำปะหลัง ใบผักตบชวาและรากผักตบชวาที่บดละเอียดถูกนำมาเติมด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์โดยการอบด้วยไอน้ำและทำการย่อยด้วยเอนไซม์ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสได้เป็น 5.81 และ 8.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสของรากผักตบชวาเท่ากับ 4.83 และ 5.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับการผลิตเอทานอลโดยวิธี SHF จากใบและส่วนรากผักตบชวาโดยเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *C. tropicalis* TISTR 5045 ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุด จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย

วิธี SSF จากส่วนใบและรากผักตบชวาพบว่า *S. cerevisiae* KM 1195 ให้ผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักขั้วสดเตรตและปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยวิธี SSF จากผักตบชวาทั้งต้น พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *C. tropicalis* TISTR 5045 ให้ผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักขั้วสดเตรตและปริมาณผลผลิตเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.19 กรัมต่อกรัมขั้วสดเตรต 2.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การหมักโดยวิธี SHF พบว่าในใบมันสำปะหลังและส่วนลำต้นมันสำปะหลัง การใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* KM 1195 ให้อัตราการผลิตเอทานอลต่อชั่วโมงสูงที่สุด การใช้ส่วนลำต้นมันสำปะหลังให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าจากใบมันสำปะหลัง ประมาณ 2 เท่า จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยวิธี SSF จากใบมันสำปะหลัง *S. cerevisiae* KM 1195 ให้ผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักขั้วสดเตรตและปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยวิธี SSF จากส่วนลำต้นมันสำปะหลัง พบว่า การใช้เชื้อยีสต์เดี่ยวสายพันธุ์ *S. cerevisiae* KM 1195 ให้ผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักขั้วสดเตรตและปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด จากผลการทดลองพบว่าการใช้ส่วนลำต้นมันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลโดยวิธี SSF ให้ผลผลิตมากกว่าการใช้ใบมันสำปะหลังเป็นขั้วสดเตรต ประมาณ 2 เท่า การใช้เชื้อยีสต์เดี่ยว สายพันธุ์ *S. cerevisiae* KM 1195 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดทั้งในผักตบชวาและต้นมันสำปะหลัง

การศึกษาวิธีการปรับสภาพเส้นใยปาล์มด้วยต่าง การย่อยสลายเส้นใยปาล์มในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ และการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ทำการทดลองโดยปรับสภาพเส้นใยปาล์มโดยใช้สารละลายต่าง NaOH 10% ต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส (NaOH/boil) เปรียบเทียบกับการใช้ NaOH 10% ร่วมกับการใช้ไมโครเวฟ (NaOH/microwave) และ ร่วมกับการอบไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส (NaOH/autoclave) เป็นเวลา 15 นาที พบว่า การปรับสภาพเส้นใยทำให้สัดส่วนของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ขณะที่สัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง โดยการปรับสภาพทั้งสามวิธีให้ปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ใกล้เคียงกันโดยมีเซลลูโลส เท่ากับ 56.5-60.4% เฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 11.0-12.2% และลิกนินเท่ากับ 18.6-20.4% เมื่อนำเส้นใยปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและไซลันเนส พบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน แต่การปรับสภาพเส้นใยปาล์มด้วยต่างและต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย คือ การใช้เอนไซม์เซลลูเลส 8 FPU/กรัมสารตั้งต้นร่วมกับเอนไซม์ไซลันเนส 6 U/กรัมสารตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดลองพบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุดในวันที่ 3 เท่ากับ 12.845 กรัม/ลิตร

หลังจากนั้นทำการทดลองผลิตเอทานอลจาก palm fiber hydrolysate liquid ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยปาล์มด้วย *Rhizopus oryzae* STR 3099, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และ *Candida shehate* TISTR 5834 ในสภาวะที่มีการเขย่า 150 รอบ/นาทีและไม่มี การเขย่า พบว่า *C. shehate* TISTR 5834 ให้ปริมาณเอทานอลมากที่สุดเท่ากับ 3.24 กรัม/ลิตร ในสภาวะที่ไม่มี การเขย่า นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ prehydrolysate liquid ที่ได้จากการปรับสภาพเส้นใยปาล์ม พบว่า ไม่มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากมีผลผลิตเอทานอลต่ำ ทั้งนี้อาจมีสารยับยั้งจุลินทรีย์ใน prehydrolysate liquid และเมื่อใช้เส้นใยปาล์มที่ได้ผ่านการปรับสภาพแล้ว จากนั้นทำการย่อยสลายร่วมกับการหมักเอทานอล โดยใช้ *Mucor indicus* STR 3237, *M. hiemalis* STR 3047

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากยอดและใบอ้อยเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล ยอดและใบอ้อยที่ใช้ในงานวิจัยนี้ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเท่ากับร้อยละ 38 และ 30.6 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณลิกนินค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 12.8 โดยน้ำหนักแห้ง ทำให้อุดและใบอ้อยมีความแข็งไม่มากนัก ง่ายต่อขั้นตอนการลดขนาด สำหรับขั้นตอนการผลิตน้ำตาลจากยอดและใบอ้อยประกอบด้วย การลดขนาดวัตถุดิบ การเตรียมด้วยวิธีทางเคมีร่วมกับการให้ความร้อน และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ จากผลการทดลองได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาล ดังนี้คือ ขนาดยอดและใบอ้อยระหว่าง 0-10 มิลลิเมตร ปริมาณ 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เตรียมด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ความร้อนโดยหม้อนิ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปรับพีเอชของสับสเตรทที่ได้จากการเตรียมให้เป็น 5 และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Accellerase 1000 ปริมาณ 40 เอฟพี ต่อกรัมสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที และพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เท่ากับ 59 กรัมต่อลิตร หรือ 386.38 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท คิดเป็นประสิทธิภาพการย่อยไฮโดรเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเท่ากับร้อยละ 50.69 ในระยะเวลาเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น

การดำเนินการของชุดโครงการวิจัย “การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส” ทำให้ทราบว่า ศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของประเทศไทย เรียงจากมากไปหาน้อยได้แก่ ชานอ้อย ยอดและใบ ฟางข้าว เหน้าและกากมันสำปะหลัง ทะลายปล่าปาล์มน้ำมัน ลำต้น ใบและซังข้าวโพด และขุยมะพร้าวตามลำดับ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร สามารถใช้เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลอันเดียวกันได้ เนื่องจากองค์ประกอบไม่แตกต่างกันมากนัก และเห็นควรให้มีการพัฒนาและใช้เครื่องมือราคาต่ำในการเก็บรวบรวมเศษวัสดุทางการเกษตรจากไร่ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป จากผลการตรวจสอบเอกสารวิชาการและ

ศึกษาในห้องปฏิบัติการในโครงการที่ 1-4 พบว่า เทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสด้วยการหมัก (hydrolysis/fermentation) ของประเทศไทยยังขาดเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการสลายเซลลูโลส ยังต้องการ การวิจัยด้านการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolysis) และ การเผา (thermochemical: gasification) อีกมาก ตัวอย่างเช่น การพัฒนากระบวนการย่อยสลายด้วยกรดแก่/กรดอ่อนที่มีประสิทธิภาพสามารถย่อยให้ได้ น้ำตาลสูงสุด (ปัจจุบันได้ประมาณร้อยละ 30-40) ไม่ให้เสียไปเป็นฟิวเพอรอลหรือสารพิษต่อการหมักอื่นๆ ตลอดจนเทคโนโลยีการแยกกรดที่เหลือออกจากน้ำตาลแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ เพื่อลดต้นทุนการผลิต กรณี ที่ต้องการใช้เอนไซม์ย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลเพื่อการหมักแทนการย่อยด้วยกรด พบว่าเอนไซม์ยังมี ราคาสูง ประเทศไทยยังไม่มี การวิจัยที่สามารถไปสู่เชิงพาณิชย์ได้ในปัจจุบัน ในต้นทุนการผลิตที่แข่งขันได้ เทคโนโลยีการแยกสาร (separation technology) เช่นการแยกน้ำตาล C5 และ C6 ออกจากกันเพื่อการ หมักเอทานอล ยังมีความสำคัญ การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย/ยีสต์/รา) ที่มีประสิทธิภาพในการหมัก น้ำตาลทั้งสองชนิด แยกกัน หรือหมักร่วมกัน ในสภาวะต่างๆ เช่นทนร้อน ผลผลิตเอทานอลสูง เป็นต้น ประเทศไทยควรพัฒนาเทคโนโลยี Gasification ให้มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อผลิตเอทานอล และสารเคมีมูลค่าสูงอื่นๆจากเซลลูโลสเพื่อเพิ่มทางเลือก ตามแนวโน้มการพัฒนาเทคโนโลยีโลก

คำสำคัญ : เซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว ยอดและใบอ้อย ผักตบชวา, ต้น มันปะหลัง, เซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส การย่อยด้วยกรด การย่อยด้วยเอนไซม์ เอทานอล การหมัก แกสซิฟิเคชัน

The objectives of this research program were to evaluate agricultural residues as a potential source of ethanol production. Data gathered from many sources and surveys on major producing provinces suggested that unused agricultural residues could provide energy as high as 30 megatons oil equivalent (Mtoe) altogether. Rice straw with 7,297 ktoe, sugarcane, shoots and leaves ranks second, accounted for 6,059 ktoe, cassava waste and stems, corn stalk and leaves, and corn cobs, empty palm fruit, coconut dust constitute for 6,117 ktoe, 665 ktoe, 587 ktoe and 133 ktoe per annum, respectively.

Rice straw is rich in central, northeast, and northern provinces, especially Nakhon Sawan, Nakhon Rachasima, Ubol Ratchathani, Surin, Buri Ram, Si Sa Ket, and Khon Kaen, Roi Et, Suphun Buri, and Phitsanulok. Sugarcane bagasses are recorded at high volume at central, northeastern, and some northern provinces: Kanchanaburi, Nakhon Rachasima, Udon Ratchathani, Lopburi, Suphun Buri, Khon Kaen, Nakhon Sawan, Chaiyaphum and Kamphaeng Phet. Cassava residues are plenty in northeastern and central provinces with the top production at Nakhon Rachasima, Kamphaeng Phet, Chaiyaphum, Sa Kaeo, Chachoengsao, Chon Buri, Kanchanaburi, Kalasin, Chanthaburi, and Rayong, respectively. Corn stalk and core are rich in the North and Northeast provinces such as Petchabun, Nakhon Rachasima, Nakhon Sawan, Tak, Lopburi, and Phayao province. Empty palm fruit is abundant and unused at Krabi, Surat Thani, and Chumphon.

Residues that require collection from the fields are rice straw, corn stalk and cob. This collection adds cost to ethanol production. Sugarcane bagasse, cassava residues and empty palm fruits do not have gathering cost and are available in the respective factories. Plant residues contain different proportions of cellulose, hemicelluloses and lignin contents but could be treated with the same process.

Ethanol production using diluted and concentrated acid hydrolysis requires effective recovery to reduce production cost. Acids hydrolyze cellulose and hemicelluloses to C5 and C6 sugars but could further produce toxic furfural compounds. Enzyme hydrolysis is effective but

costly. Organisms that could convert both types of sugars to ethanol is essential. Thermochemical based gasification that uses temperature higher than 800°C in corporation with either fermentation or catalysis appears to be more promising and cost effective than hydrolysis/fermentation process. Production cost of cellulolytic ethanol in the United States for any raw materials would cost 1.48-1.517 \$/galEtOH which is 13.68-14.03 Baht/litre in Thailand. For gasification, it costs less at 16.08 Baht/litre because of no pretreatment cost. The lowest production cost is gasification/catalytic conversion, followed by cellulose hydrolysis/fermentation and gasification/fermentation, respectively.

Trends of cellulosic ethanol production in the US indicate that the top productions are from gasification/fermentation 130 mil gallon, enzymatic hydrolysis 105 mil gal, gasification/catalyst 78 mil gal, diluted acid hydrolysis 37 mil gal, simultaneous saccharification/fermentation 31 mil gal, and concentrated acid hydrolysis 21 mil gal.

Water hyacinth and cassava top were evaluated experimentally as substrates for ethanol production using separated hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods. The milled water hyacinth leaves and roots were pretreated with 0.1 M sulfuric acid and steam and further hydrolyzed by enzymes. Glucose and reducing sugars in the hydrolysate of hyacinth leaves were 5.81 and 8.52 g/l, while those of hyacinth roots were 4.83 and 5.99 g/l, respectively. For SSF using water hyacinth leave and water hyacinth roots as substrates, the maximum ethanol yield per unit biomass and ethanol production were obtained by *S. cerevisiae* KM 1195. For using water hyacinth as substrate for SSF, the coculture of *S. cerevisiae* TISTR 5048 and *C. tropicalis* TISTR 5045 produced the ethanol yield per unit biomass and ethanol production of 0.19 g (g-biomass)⁻¹ and 2.81 g/l, respectively.

The maximum ethanol production rate using cassava leaves and cassava stalks as substrates of SHF were obtained by *S. cerevisiae* KM 1195 and cassava stalks using as substrate were about two fold higher ethanol yield than cassava leaves. From this study, SSF using cassava stalks as substrate produced about two fold higher ethanol yields than cassava

leaves. This study showed that *S. cerevisiae* KM 1195 produced the maximum ethanol product from both water hyacinth and cassava top.

Palm fiber was also used as a possible raw material for ethanol production. The pretreatment by using NaOH 10% with boiling at 100°C (NaOH/boil) was compared to NaOH 10% with microwave (NaOH/microwave) and NaOH 10% with autoclave at 121°C (NaOH/autoclave) for 15 minute. It was found that pretreatment gave higher cellulose and lower hemicellulose and lignin contents. All three pretreatment methods gave similar cellulose and hemicelluloses contents. Cellulose of 56.5-60.4%, hemicellulose of 11.0-12.2% and lignin 18.6-20.4% was obtained. After being pretreated, the palm fiber was hydrolyzed with cellulase and xylanase. It was found that pretreatment by using NaOH 10% with boiling at 100°C (NaOH/boil) was suitable. The optimum condition for hydrolysis was cellulase of 8 FPU/g substrate and xylanase 6 U/g substrate at 40°C. The maximum sugar content was 12.845 g/l within 3 days. Furthermore, the palm fiber hydrolysate liquid from hydrolysis process was used for ethanol production by *Rhizopus oryzae* STR 3099, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และ *Candida shehate* TISTR 5834 under shaking speed of 150 rpm and no shaking. The result showed that *C. shehate* TISTR 5834 gave the highest ethanol production of 3.24 g/l under no shaking condition. Moreover, the prehydrolysate liquid obtained after pretreatment have no potential for ethanol production in industrial scale due to low ethanol yield. This might be from microbial inhibitors in prehydrolysate liquid. Finally, pretreated palm fiber was used by hydrolysis and ethanol fermentation simultaneously with *Mucor indicus* STR 3237, *M. hiemalis* STR 3047 และ *R. oryzae* STR 3099. It was found that *R. oryzae* STR 3099 gave the highest ethanol production of 0.24 and 1.27g/l without and with hydrolysis of cellulose and xylanase, respectively under no shaking condition within 1 day. More works are needed to make the production economically viable.

Sugarcane shoots and leaves have high potential for ethanol production. They consist of cellulose and hemicellulose at 38 and 30.6% dry solid (DS) basis, respectively. The low level of lignin content at 12.8%DS, which make the biomass easily broken, are benefit for size reduction. The process of reducing sugar production includes size reduction chemical and heat pretreatment and enzymatic hydrolysis. The optimum conditions after reduced size of biomass

by chopper and blender, were accomplished by using sugarcane shoots and leaves particle size 0-10 mm., 14%w/v (DS), pretreated with dilute sulfuric acid (1.5%w/v) by autoclaved at 121 °C , 15 lb/in² for 15 min. After adjusted pH to 5, the Accellerase 1000 (40 FPU/g substrate) was added to the pretreated biomass for enzymatic hydrolysis which conducted at 50 °C, 160 rpm. After only 12 hours, the reducing sugars of 59 g/L or 386.38 mg/g substrate with holocellulose conversion 50.69% were obtained.

The ethanol from cellulose research program provides useful information on potential of agricultural residues in Thailand. They are, from high to low, sugarcane shoot and leaves, rice straw, cassava stalk and residues, empty palm fruits, corn stalks and cobs, and coconut wastes, respectively. The results indicated that agriculture residues need proper equipment for gathering from farms. However, knowledge of efficient pre-treatment, and hydrolysis of cellulosic materials are still not currently available. Therefore, more research works required for efficient and economically viable production of ethanol are efficient pre-treatment methods, acid hydrolysis and recovery, cost reduction of cellulose enzymes, efficiency of enzymatic treatment, and efficient fermentation and separation processes. However, research on gasification technology in Thailand is also in need to provide alternatives for ethanol production from a wide range of cellulosic residues.

Keywords : Cellulose, lignocellulose, agricultural residues, straw, sugarcane shoots and leaves, water hyacinth, cassava waste, pre treatment, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, ethanol, gasification