ศักดิ์ชาย เพ็ชรตรา. 2552. *การแยกสลายมวลชีวภาพของอ้อยเพื่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ. ดร. อลิศรา เรืองแสง,
ผศ. ดร. ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้อ้อยเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (ไฮโดรเจน มีเทน และเอทานอล) โดยใช้เชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032และกลุ่มจุลินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศ การทดลองแรกได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำอ้อยโดยเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *C. butyricum* TISTR 1032 บนชานอ้อยในกระบวนการหมักแบบกะ และกะซ้ำ ผลการทดลอง พบว่า ที่สภาวะเหมาะสม ได้แก่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นของสับสเตรทเท่ากับ 25 กรัมซีโอดี/ลิตร และใช้เซลล์ตรึงเป็นหัวเชื้อ ให้ค่าผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน และองค์ประกอบไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 2.66 โมลไฮโดรเจน/โมลซูโครสที่ใช้ไป 3.11 ลิตรไฮโดรเจน/ลิตรสับสเตรท/วัน และ 45% ตามลำดับ โดยใช้เซลล์ตรึง จากนั้นได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนในกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดยใช้เซลล์ตรึงของ *C. butyricum* TISTR 1032 บนชานอ้อย ที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะ แปรผันค่าปริมาตรน้ำหมักเติมเข้า/ดึงออกจากถังหมักเป็น 25 50 และ 75% โดยปริมาตร ผลการทดลองพบว่า ค่าผลได้ไฮโดรเจน อัตราการผลิตไฮโดรเจน และองค์ประกอบไฮโดรเจนสูงสุดมีค่าเท่ากับ 3.04 โมลไฮโดรเจน/โมลซูโครสที่ใช้ไป 2.29 ลิตรไฮโดรเจน/ลิตร/วัน และ 45% ตามลำดับ ที่ปริมาตรน้ำหมักเติมเข้า/ดึงออกจากถังหมักที่เหมาะสม คือ 50% โดยปริมาตร จากนั้น ได้ทดลองเชื่อมต่อไฮโดรเจนที่ผลิตได้ระหว่างกระบวนการผลิตแบบกะซ้ำกับเซลล์เชื้อเพลิงเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกระแสไฟฟ้า พบว่า สามารถผลิตกระแสไฟฟ้าได้คงที่และต่อเนื่องที่ 49 มิลลิวัตต์ ในช่วงเวลา 8-20 ชม ของกระบวนการหมัก จากนั้นได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องในถังหมักแบบกวนต่อเนื่อง (Continuous Stir Tank Reactor, CSTR) โดยใช้น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นสับสเตรทและเติมเชื้อ *C. butyricum* ทำการหมักในสภาวะไม่ฆ่าเชื้อ และแปรผันระยะเวลากักเก็บ (Hydraulic Retention Time, HRT) (36-4 ชม.) ผลการทดลอง พบว่า HRT ที่เหมาะสม คือ 4 ชั่วโมง ให้ผลได้ไฮโดรเจนและอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด คือ 1.00 โมลไฮโดรเจน/โมลเฮกโซสที่ใช้ไป และ 1.82 ลิตรไฮโดรเจน/ลิตร/วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนจากน้ำอ้อยโดย *C. butyricum* TISTR 1032 ในสภาวะไม่ฆ่าเชื้อได้ อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าค่อนข้างต่ำ คือ น้อยกว่า 25% ผลจากการ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำอ้อย และจุลินทรีย์ที่เติมลงไปเพื่อเป็นหัวเชื้อ (*C. butyricum* TISTR 1032) ในการผลิตไฮโดรเจนในแต่ละ HRT โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) พบว่า *C. butyricum* เป็นจุลินทรีย์ที่เด่นและรับผิดชอบต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยทำงานร่วมกับ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำอ้อยเพื่อช่วยในการผลิตไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus harbinensis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำอ้อยอีกชนิดหนึ่งสามารถเจริญในระบบได้ แต่มีผลด้านลบในการยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนจึงส่งผลให้องค์ประกอบไฮโดรเจนในก๊าซชีวภาพที่ผลิตได้มีค่าค่อนข้างต่ำ

เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากอ้อยสูงสุด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตไฮโดรเจนจากชานอ้อยโดย *C. butyricum* TISTR 1032 เตรียมตัวอย่างชานอ้อยโดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก แปรผันความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกและระยะเวลาทำปฏิกิริยาเป็น 0.25-7.0% โดยปริมาตร และ 15-240 นาที ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ และความดัน 15 กก./ตร.ซม. ในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง ผลการทดลอง พบว่า สภาวะการย่อยชานอ้อยเหมาะสม คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกเท่ากับ 0.5% โดยปริมาตร และระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 60 นาที โดยได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในไฮโดรไลเสตเท่ากับ 24.5 กรัม/ลิตร และจากการผลิตไฮโดรเจนโดยใช้ไฮโดรไลเสตของชานอ้อยที่ได้จากสภาวะการย่อยที่เหมาะสมนี้เป็นสับสเตรท พบว่า ได้ค่าผลได้ไฮโดรเจน และอัตราการผลิตไฮโดรเจนสูงสุด เท่ากับ 1.73 โมลไฮโดรเจน/โมลน้ำตาลที่ถูกใช้ และ 1,611 มิลลิลิตรไฮโดรเจน/ลิตร/วัน ตามลำดับ ที่สภาวะเหมาะสม ได้แก่ ความเป็นกรดด่างและความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นของสับสเทรตเท่ากับ 5.5 และ 20 กรัมซีโอดี/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตไฮโดรเจนจากน้ำอ้อยและชานอ้อยจะได้น้ำหมักที่เหลือจากกระบวนการผลิตซึ่งจัดว่าเป็นน้ำเสีย และมีปริมาณมาก โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดบิวทิริก กรดอะซิติก และน้ำตาลที่เหลืออยู่ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นสับเสตรทในการผลิตมีเทนและเอทานอลได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตมีเทนโดยใช้กลุ่มจุลินทรีย์แบบไม่ใช้อากาศเป็นหัวเชื้อ และศึกษาการผลิตเอทานอลโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหมักเหลือจากการผลิตไฮโดรเจน ซึ่งในการผลิตมีเทนได้ใช้เทคนิคทางสถิติ ได้แก่ Response Surface Methodology (RSM) เพื่อเป็นเครื่องมือในการหาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น อัตราส่วน $NaHCO_3$/ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเป็นกรดด่างเริ่มต้น มีผลต่อผลได้มีเทนอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยที่สภาวะเหมาะสมมีค่าเท่ากับ 10.09 กรัมซีโอดี/ลิตร 5.53 และ 7.46 ตามลำดับ ให้ค่าผลได้มีเทนเท่ากับ 1,994.44 มิลลิลิตรมีเทน/กรัมของแข็งระเหยได้ที่เติมลงไป นอกจากนี้ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำหมักของกระบวนการผลิตไฮโดรเจนใน CSTR โดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในน้ำหมักที่เหลือจากการผลิตไฮโดรเจนภายใต้สภาวะไม่ฆ่าเชื้อ และไม่มีการเติมจุลินทรีย์ชนิดอื่น ผลการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลคือ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของ

น้ำหมักเท่ากับ 7 และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครสในน้ำหมักเท่ากับ 25 กรัมซีโอดี/ลิตร ให้ค่าผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.31 โมลเอทานอล/โมลเฮกโซสที่ใช้ไป และอัตราการผลิตเทานอลจำเพาะเท่ากับ 0.22 มิลลิกรัมเอทานอล/มิลลิกรัมของแข็งระเหยได้/วันและพบว่า *C. butyricum* สามารถเจริญและทำหน้าที่ผลิตเอทานอลได้ในทุกช่วงความเป็นกรดด่าง (5.0-8.0) และความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (25-300 กรัมซีโอดี/ลิตร) ที่ใช้ในการทดลองนี้ จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอ้อยสามารถนำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Sakchai Pattra. 2009. ***Bio-Refinery of Sugarcane for Bio-Fuels Production.***
Doctor of Philosophy Thesis in Biotechnology, Graduate School,
Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Alissara Reungsang,
Asst. Prof. Dr. Paiboon Danvirutai

ABSTRACT

The research aims to explore the possibility of using sugarcane to produce multibiofuels (hydrogen, methane and ethanol) by *Clostridium butyricum* TISTR 1032 and anaerobic-mixed cultures. Sugarcane juice was investigated for its capacity in hydrogen production by free and the immobilized *C. butyricum* TISTR 1032 on sugarcane bagasse (SCB) using batch and repeated-batch fermentations. A maximum hydrogen yield, hydrogen production rate and hydrogen content of 2.66 mol H_2/mol sucrose consumed, 3.11 L H_2/L.day and 45%, respectively, could be obtained at the initial pH of 6.5 and the initial sucrose concentration of 25 g-COD/L by using the immobilized cells. Repeated batch fermentations using immobilized *C. butyricum* TISTR 1032 were carried out at 3 different end-of-the-batch harvested volumes of 25, 50 and 75%, under the optimal conditions obtained from batch experiments. The highest hydrogen yield, hydrogen production rate and hydrogen content of 3.04 mol H_2/mol sucrose consumed, 2.29 L H_2/L.day and 45%, respectively, were obtained at the suitable end-of-the-batch harvested volume for hydrogen production of 50%. The repeated-batch hydrogen producing system was further connected to a fuel cell unit after the constant hydrogen production between batches was achieved and showed the ability to generate the maximum and a constant electrical power of 49 mW during 8–20 hours of the fermentation. Bio-augmentation of *C. butyricum* in free cell form for continuous hydrogen production from sugarcane juice in the Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR) under non sterile condition was examined at different HRT (36-4 h). Results indicated that the maximum hydrogen yield and production rate of 1.00 mol H_2/mol hexose consumed and 1.82 L H_2/L.day, respectively, could be achieved at HRT of 4 h which suggested that hydrogen production under non-sterile condition by *C. butyrcum* could be conducted. However, the hydrogen content

obtained was rather low (less than 25%). The relationship of the augmented microorganism i.e. *C. butyricum* and normal flora in the fermentation system under non-sterile condition were analyzed by the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) method at every HRT. The DGGE results revealed that augmented microorganism,*C. butyricum*, was dominant and played an important role on hydrogen production with the support of normal flora, *Klebsiella pneumonia*e, under non-sterile condition. *Lactobacillus harbinensis*, one of a dominant normal flora, was able to grow in the hydrogen fermentation system but played a negative role in reducing hydrogen production efficiency resulting in a low hydrogen content obtained.

In order to implement the total use of sugarcane, SCB was used to produce hydrogen by *C. butyricum.* SCB was hydrolyze by H_2SO_4 at various concentrations (0.25-7.0% volume) and reaction time (15-240 min) at 121 °C, 15 kg/cm^2 pressure in autoclave. Optimal conditions obtained were 0.5% H_2SO_4 and 60 min which yielded 24.5 g/L of total sugar. The maximum hydrogen yield of 1.73 mol H_2/mol sugar consumed and the hydrogen production rate of 1,611 mL H_2 /L.day were obtained at the initial pH 5.5 and the initial sugar concentration of 20 g-COD/L.

Throughout the successful process of hydrogen production from sugarcane juice and SCB, large amount of organic wastewater were generated. Wastewater contained residual organic matter such as butyric and acetic acids and residual sugar, which were valuable as substrates for methane and ethanol productions. Therefore, the possibility of using hydrogenogenic effluent to produce methane by anaerobic sludge and ethanol by carried over microorganism consortium from previous hydrogen fermentation was explored in this study. Response Surface Methodology (RSM) was used as a tool to optimize the factors affecting methane production from hydrogenogenic effluent. Results indicated that substrate concentration, ratio of $NaHCO_3$ to substrate concentration and initial pH significantly ($p < 0.05$) affected methane yield. A maximum methane yield of 1,994.44 mL CH_4/g-VS_{added} was obtained under the optimum conditions i.e., substrate concentration of 10.09 g-COD/L, $NaHCO_3$ to substrate concentration ratio of 5.53 and initial pH of 7.46. The ethanol production from hydrogenogenic effluent of non-sterile hydrogen fermentation using the CSTR by carried over microorganism consortia from previous

hydrogen fermentation was conducted. The highest ethanol yield of 0.31 mol EtOH/mol sugar consumed and specific ethanol production rate of 0.22 mg EtOH/mg VS.day were achieved at the optimum initial sucrose concentration and pH of 25 g-COD/L and 7, respectively. *C. butyricum*, the augmented microorganism which was carried over from the hydrogen production process was the dominant specie during ethanol fermentation of hydrogenogenic effluent at every pH values (5.0-8.0) and sugar concentration (25-300 g-COD/L). Results from this study demonstrated that sugarcane can be used to produce multibiofuels successfully.