บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับความเสียเปรียบด้านพลังงานเนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ เพื่อการขนส่งในปริมาณสูง และราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกเพิ่มสูงขึ้นตลอดเวลาส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจอีกด้วย การพิจารณาหาแหล่งพลังงานใหม่ๆเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ และได้รับการผลักดันจากหลายๆฝ่ายอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ สำหรับแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอันหนึ่งคือ พลังงานชีวมวล ซึ่งหมายถึงพลังงานที่ได้จากสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ รวมถึงผลพลอยได้และของเสียที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต จุดเด่นของพลังชีวมวลคือสามารถเกิดกลับมาใช้ใหม่ได้อีก และช่วยลดการเกิดมลภาวะของสิ่งแวดล้อม พลังงานชีวมวลที่สำคัญที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นเชื้อเพลิงเครื่องยนต์มีอยู่ 2 ประเภทหลักคือ เอทานอล และไบโอดีเซล

เอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์ใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงินที่ไม่มีควัน ซึ่งเราสามารถที่จะใช้ประโยชน์จากเอทานอลได้ในหลายรูปแบบ อย่างเช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (Desohol) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ได้แก่ Ethyl Tertiary Butyl Ether (ETBE) เป็นต้น

ในการผลิตเอทานอลเราสามารถที่จะใช้วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพได้ ซึ่งในปัจจุบันจะเป็นการผลิตโดยวิธีทางชีวภาพเป็นส่วนมาก สำหรับในการผลิตเอทานอลโดยใช้วิธีทางชีวภาพ หรือการผลิตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลนั้น จะมีวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิต เอทานอล 3 ชนิดด้วยกัน คือวัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

สำหรับวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จะเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่ในธรรมชาติโดยทั่วไป แต่ส่วนมากที่นำมาใช้จะเป็นผลพลอยได้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด และวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรม เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้

จะมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ เซลลูโลส ซึ่งสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นเอทานอลโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เส้นใยปาล์มจัดเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการทำอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ที่เป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญในภาคใต้ของไทย และมีปริมาณค่อนข้างมาก โดยในปัจจุบัน ได้มีโรงงานหลายแห่งเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณตามที่ผู้บริโภคต้องการ ดังนั้นเมื่อเพิ่มการผลิตน้ำมันปาล์มในปริมาณมากขึ้นก็จะทำให้มีวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปมากขึ้น โดยเฉพาะกากเส้นใยปาล์ม ซึ่งเมื่อนำไปทิ้งทำให้เกิดขยะและมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม หากมีการใช้กากเส้นใยปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งเริ่มต้นในการผลิตเอทานอล จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของกากเส้นใยปาล์ม และลดต้นทุนในการผลิตเอทานอล รวมถึงยังช่วยลดของเสียที่เกิดจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอีกด้วย

สำหรับในงานวิจัยฉบับนี้ จะมุ่งเน้นที่จะใช้เส้นใยปาล์มมาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิต เอทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้อย่างมากมาย

ตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 1) เป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ทั้งด้านการผลิต และการตลาด ส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลก มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็ว จาก 11.7 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงปี 2519-2543 เพิ่มเป็น 27.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงปี 2544-2548 และคาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 31.2 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงปี 2559-2563 โดยมีประเทศผู้ผลิตที่สำคัญคือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (พรรณนีย์ วิชชาญ, 2548)

ปาล์มน้ำมัน (African oil palm)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Elacis gluineensis jney*

วงศ์ Areacaceae หรือ Palmae (Oil palm)

ภาพที่ 1 ปาล์มน้ำมัน

Figure 1 Oil palm.

ที่มา : กองบรรณาธิการ, 2546; http://www.rspg.thaigov.net/plants_data/use/oil1.htm

1.1 กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

ในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 ประเภท คือการผลิตแบบไม่ใช้น้ำ และการผลิตแบบใช้น้ำ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

1.1.1 กระบวนการผลิตแบบไม่ใช้น้ำ

ใช้ความร้อนในการอบปาล์มจากฟืน ซึ่งจะต้องใช้เวลานานในการอบ เหมาะกับโรงงานเล็กๆ ได้น้ำมันดิบที่เรียกว่า น้ำมันดิบกระเทย คือน้ำมันที่มีส่วนผสมจากน้ำมันจากส่วนของเปลือก และน้ำมันจากส่วนของเมล็ดใน วัสดุเศษเหลือทิ้งจากโรงงานประเภทนี้ คือกากปาล์มเพียงอย่างเดียว

1.1.2 กระบวนการผลิตแบบใช้น้ำ

ใช้ไอน้ำในการอบทะลายปาล์ม หรือผลปาล์ม แบ่งย่อยตามลักษณะการสกัดออกเป็น 2 ลักษณะ คือแบบใช้เครื่อง Decanter และแบบใช้เครื่อง Separator ซึ่งขั้นตอนโดยทั่วไปของทั้ง 2 แบบ เริ่มจากการนำเอาทะลายปาล์มสดมาอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ความ

ดัน 45 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซีสที่จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์ม และทำให้ผลอ่อนนุ่ม ขั้วสามารถหลุดออกจากทะลายปาล์มได้ง่าย จากนั้นนำไปป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์มออกจากทะลาย ซึ่งเป็นเครื่องโรตารี่หมุนด้วยความเร็ว 23 รอบต่อนาที และแยกทะลายปาล์มออก ส่วนผลปาล์มที่ได้จะถูกส่งไปยังเครื่องย่อยผลปาล์ม ซึ่งจะมีใบพัดสำหรับกวนผลปาล์ม ให้เส้นใยฉีกขาดออกจากเมล็ด และเซลล์น้ำมันแตกออกง่ายต่อการบีบน้ำมัน จากนั้นจะป้อนเข้าสู่เครื่องบีบแบบเกลียวอัด น้ำมันที่สกัดได้จะถูกส่งต่อไปยังเครื่องแยกน้ำมันออกจากเส้นใย และสิ่งอื่นๆ โดยใช้เครื่อง Decanter หรือ Separator จากนั้นนำไปไล่ความชื้นให้ได้มาตรฐาน และเก็บไว้ในถังขนาดใหญ่เพื่อจำหน่ายต่อไป (ปรีชา มุณีศรี, 2537)

1.2 ผลผลิตจากโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม (จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา, 2548)

โรงงานหีบน้ำมันปาล์มจะให้ผลผลิต 2 ชนิด คือ

1.2.1 ผลผลิตโดยตรง คือ น้ำมันปาล์มจะได้จาก

1.เปลือกผลปาล์มเรียกว่า palm oil น้ำมันชนิดนี้มีสีเข้ม มีความเหนียวระดับปานกลางถึงเหนียวมาก

2. เนื้อในเมล็ดปาล์มเรียกว่า palm kernel oil มีสีอ่อนกว่าพวกแรก สีเหลืองถึงเหลืองน้ำตาล เหนียวระดับปานกลาง

1.2.2 ผลพลอยได้ ประกอบด้วยผลพลอยได้หลายชนิดได้แก่ (ภาพที่ 2)

1. ทะลายปาล์ม (Bunch trash) ถูกแยกออกมาหลังจากถูกอบนึ่งแล้วมีประมาณ 55-58 เปอร์เซ็นต์ ของปาล์มทั้งทะลาย

2. กากเยื่อใยปาล์ม (Palm press fiber, PPF) เป็นส่วนเปลือกของผลปาล์มที่หีบน้ำมันออกแล้วมีประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ของปาล์มทั้งทะลาย

3. กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (oil palm seed meal, PSM) ได้จากการสกัดน้ำมันของเมล็ดปาล์ม ซึ่งจะมีทั้งกะลาและเนื้อปาล์ม

4. เนื้อในเมล็ดปาล์ม (Palm kernel) เป็นส่วนที่แยกเอาเปลือกและกะลาออกแล้วมีประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีวิธีการสกัดน้ำมันออก 2 วิธี คือ

4.1 วิธีหีบน้ำมัน (Expeller pressed type) โดยการใช้สกรูเป็นเกลียวบีบให้น้ำมันออก วิธีนี้จะยังมีน้ำมันเหลืออยู่มากประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์

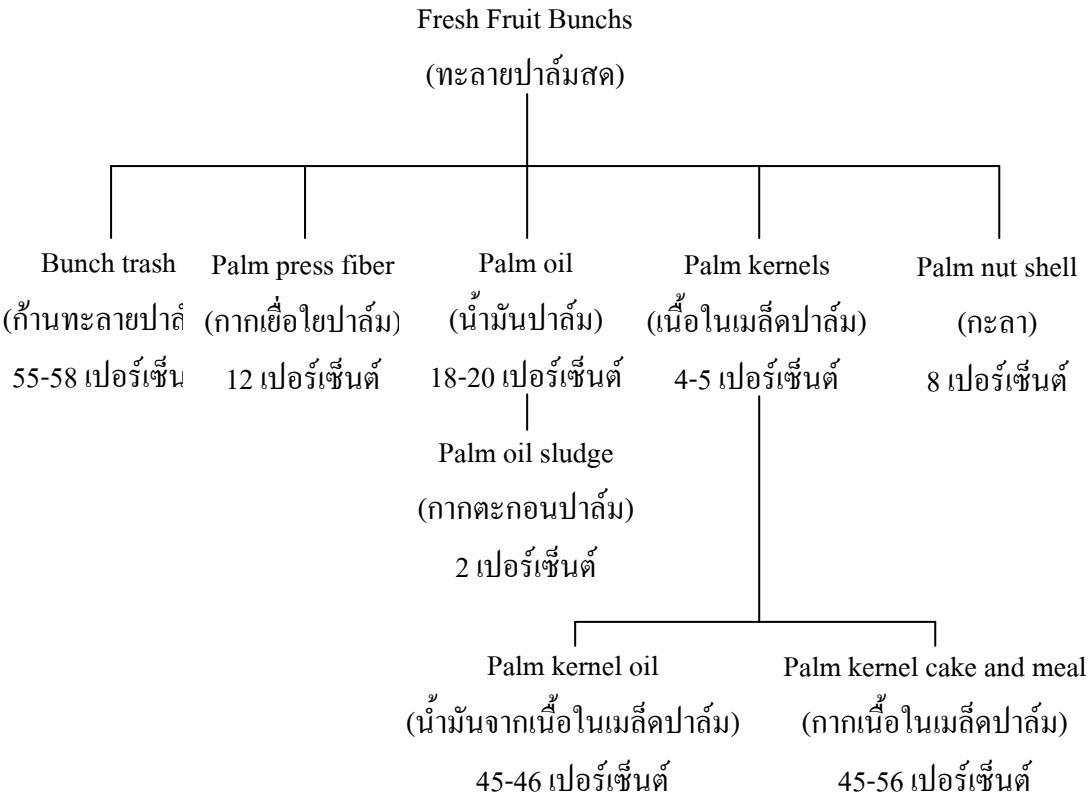
4.2 วิธีใช้สารเคมีสกัดน้ำมัน (Solvent extracted type) โดยการใช้สาร เฮกเซน (Hexane) วิธีนี้จะทำให้กากที่ได้มีน้ำมันเหลืออยู่น้อยประมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์ และจะมีคุณภาพ

ดีกว่าวิธีหีบน้ำมัน กากที่ได้จากการสกัดน้ำมันทั้ง 2 วิธี เรียกกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (Palm Kernel cake, PKC)

5. กากผลปาล์ม (Oil palm meal, PM) จะประกอบด้วยเปลือกนอก (Husk) กะลา (Nut shell) และเนื้อในของเมล็ด (Palm kernel)

6. กะลา มีประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ของผลปาล์มทั้งทะลาย

7. กากตะกอนปาล์ม (Palm oil sludge, POS) มีประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นของเหลือ ที่เป็นของเหลวจากโรงงานปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 2 สัดส่วนและผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Figure 2 Waste from palm oil mill production.

ที่มา : จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา, (2548)

1.3 การใช้ประโยชน์ของปาล์มน้ำมัน และวัสดุเศษเหลือ (พรรณนีย์ วิชชาญ, 2548)

นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำมันปาล์มในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ ด้วย โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติทางเคมี หรือ Oleochemical ซึ่งเป็นการสกัดสารเคมีจากไขมันพืชและสัตว์ คล้ายกับ Petrochemical ซึ่งเป็นการสกัดสารเคมีจากน้ำมันปิโตรเลียม โดยสารเคมีพื้นฐานที่สามารถสกัดได้ คือ Fatty acids, Fatty ester (Methyl ester), Fatty alcohol, Fatty nitrogen compound (Fatty amine) และ Glycerol มีการใช้คุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของน้ำมันปาล์มกับอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นจำนวนมาก เช่น

- รถยนต์ใช้แทนน้ำมันดีเซล โดยดัดแปลงเครื่องยนต์เล็กน้อย ควันที่เกิดขึ้นจะไม่มีซัลเฟอร์ และไนโตรเจนออกไซด์ ซึ่งเป็นสารพิษต่อสิ่งแวดล้อม

- อุตสาหกรรมขุดเจาะ ใช้เป็นตัวหล่อลื่น เนื่องจากมีจุดสันดาบสูงกว่าดีเซลและไม่เป็นพิษ

- อุตสาหกรรมสบู่ เนื่องจากองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม มีคุณสมบัติในการเกิดฟอง และชำระล้างใกล้เคียงกับไขมันสัตว์ และน้ำมันมะพร้าว

- อุตสาหกรรมเคลือบผิวมีคุณสมบัติในการป้องกันรังสีอุลตราไวโอเลต และให้ความเงางาม

- อุตสาหกรรมสีทาบ้าน ทำให้สีติดทนทาน ไม่หลุดลอกง่าย

- อุตสาหกรรมยาสระผม สามารถใช้เป็นส่วนผสมของยาสระผม

- อุตสาหกรรมเหล็ก มีสารป้องกันสนิมสูงกว่าไขมันที่สกัดจากไขมันสัตว์

- อุตสาหกรรมยา เป็นตัวทำลายช่วยให้เนื้อยาเข้ากัน รวมถึงเพิ่มปริมาณเนื้อยา เนื่องจากเป็นสารไม่มีโทษ และไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้ง่าย

- อุตสาหกรรมโพลีเอสเตอร์ ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัว และถ่ายเทความร้อยได้ดี และยังสามารถใช้เป็นสารหล่อลื่อในการผลิตโพลีเอสเตอร์

- เทียนไข มีระยะเวลาการติดไฟนาน มีควัน และน้ำตาลเทียนน้อยกว่าเทียนไขที่ทำจากไขปิโตรเลียม

- อุตสาหกรรมผลิตยาง ช่วยในกระบวนการผลิต นอกจากเป็นสารหล่อลื่นในกระบวนการแล้วยังทำให้สามารถขึ้นรูปได้ง่ายขึ้น

ในการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ ยังมีวัสดุเหลือใช้จากการสกัด นำมาใช้ประโยชน์ได้แทบจะทุกชนิด ดังนี้

ทะลายปาล์ม ใช้คลุมดินในสวนปาล์ม รักษาความชื้น และเพิ่มเนื้อดิน นำมาใช้เพาะเห็ด และข้อมูลจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มระบุว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นเชื้อเพลิงในหม้อไอน้ำ เนื่องจากมีความร้อนสูง

เส้นใยแห้ง ใช้เป็นเชื้อเพลิงในหม้อไอน้ำ

กะลา ใช้ผสมกับเส้นใย เป็นเชื้อเพลิงในหม้อไอน้ำ ซึ่งปัจจุบันโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ใช้เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตกระแสไฟฟ้าใช้ในโรงงาน นำมาผลิตถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ใช้ในการกรองน้ำ และของเสีย หรือจะนำมาใช้ปลูกต้นไม้ เช่น กล้วยไม้ หรือใช้ซ่อมหัวถนนก็ได้ เพราะแข็งมาก

น้ำเสีย ใช้รดน้ำในสวนปาล์ม เนื่องจากมีปริมาณอินทรียวัตถุสูง หรือใช้ผลิตก๊าซมีเทนใช้หุงต้น โดยผ่านกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพ (Bio gas)

กากของเสีย ใช้ทำปุ๋ยในโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มดิบ มีข้อมูลระบุว่า ถ้านำทะลายเปล่า เส้นใย และกะลา ที่เป็นวัสดุเหลือจากการสกัดน้ำมันมาเผารวมกัน จะมีค่าความร้อน (Heating value) สูงกว่าลิกไนต์ และมากพอที่จะใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า

1.4 แหล่งผลิตปาล์มน้ำมัน

ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตทั่วประเทศประมาณ 1.3 - 1.6 ล้านไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 4.09 ล้านตันต่อปี ส่วนใหญ่อยู่ใน 12 จังหวัดภาคใต้ คิดเป็นพื้นที่ประมาณ 1,596,000 ไร่ จากพื้นที่ภาคใต้ทั้งหมด 14 จังหวัด ในภาคตะวันออกมี 2 จังหวัดคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 41,972 ไร่ ได้เรียงลำดับพื้นที่ปลูกจากมากที่สุด ถึงน้อยที่สุดของจังหวัดในแต่ละภาค แสดงในตารางที่ 1

1.5 อนาคตของปาล์มน้ำมัน (พรรณนีย์ วิชชาญ, 2548)

เมื่อเดือนพฤษภาคม 2547 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรได้จัดทำยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันขึ้น โดยมีเป้าหมายที่จะขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายใน พ.ศ. 2572 เพื่อให้มีปริมาณผลผลิตปาล์มสด 25 ล้านตัน หรือผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบ 4.50 ล้านตัน โดยจะเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันต่อไร่ ให้ได้เฉลี่ยไร่ละ 2.8 ตัน และรักษาคุณภาพผลปาล์มสดให้มีอัตราน้ำมัน ไม่ต่ำกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันจะดำเนินการเพิ่มมูลค่าผลปาล์มจากการแปรรูปอย่างง่าย เป็นการแปรรูปผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง โดยจัดตั้งเมืองอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มครบวงจร ภายใต้วิสัยทัศน์ที่กำหนดไว้ว่า “มุ่งสู่การเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกน้ำมันปาล์มเคียงคู่ผู้นำในระดับโลก และเป็นแหล่งพลังงานของประเทศที่ยั่งยืน”

ตารางที่ 1 เนื้อที่ ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ของปาล์มน้ำมันเป็นรายจังหวัด

Table 1 Places and products of palm oil in Thailand.

จังหวัด	เนื้อที่ (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กก.)
พื้นที่ภาคใต้ 12 จังหวัด			
กระบี่	563,908	1,402,645	2,487
สุราษฎร์ธานี	460,567	1,129,889	2,453
ชุมพร	317,648	777,576	2,448
สตูล	73,508	164,060	2,232
ตรัง	55,828	128,908	2,309
ประจวบคีรีขันธ์	40,545	92,504	2,282
พังงา	31,241	75,201	2,407
นครศรีธรรมราช	24,593	54,784	2,228
สงขลา	13,389	30,357	2,267
ระนอง	13,002	29,874	2,298
นราธิวาส	1,671	4,008	2,399
ยะลา	100	113	1,130
พื้นที่ภาคตะวันออก 2 จังหวัด			
ชลบุรี	35,866	87,661	2,444
ระยอง	6,106	12,517	2,050

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรปีเพาะปลูก (2545/2546 อ้างโดย จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา, 2548)

2. องค์ประกอบของเซลล์พืช

พืชเป็นทรัพยากรธรรมชาติ ประเภทที่ใช้แล้วสามารถเกิดกลับมาใช้ได้ใหม่อีกในระยะเวลาอันสั้น ดั้งนั้นพืชจึงเป็นแหล่งสารประกอบอินทรีย์ แหล่งใหญ่ที่สำคัญในอนาคต ส่วนประกอบหลักของเซลล์พืชได้แก่ เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) หรือเรียกรวมกันว่าลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)(ภาพที่ 3a และ 3b) ซึ่งวัสดุชนิดนี้ส่วนมากจะเป็นผลพลอยได้จากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด ของเสียจากการทำน้ำมันปาล์ม เช่น เส้นใย ทะลายปาล์ม ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ และกระดาษ เป็นต้น โดยวัสดุเหล่านี้จะมีเซลลูโลสประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลสประมาณ 20-

30 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Tuomela และคณะ, 2000) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบแต่ละประเภทดังตารางที่ 2

2.1 เซลลูโลส (Cellulose)

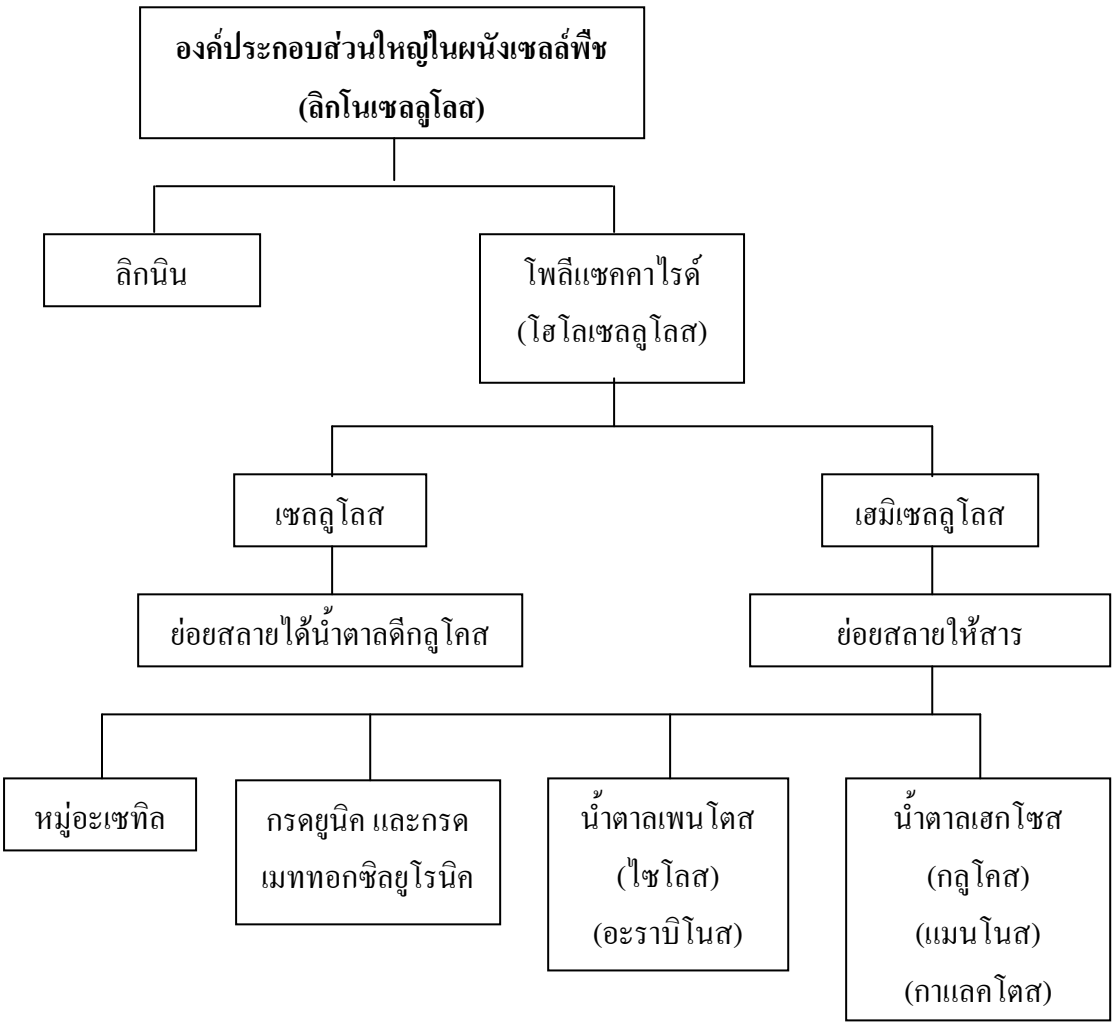
เป็นโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างต่อกันเป็นเส้นตรงของกลูโคส 8,000 - 12,000 ยูนิต ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-Glucosidic linkage (ภาพที่ 4) เนื่องจากเซลลูโลสมี β-configuration ที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 (C_1) สายโซ่จึงสามารถเชื่อมต่อกันและกัน ด้วยพันธะไฮโดรเจน มีลักษณะเป็น Crystalline figrillar micells ซึ่งละลายน้ำได้น้อย และมีความแข็งแรงมาก นอกจากนี้เซลลูโลสยังถูกล้อมด้วยเฮมิเซลลูโลส และห่อหุ้มภายนอกด้วยลิกนิน (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2542) โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชมีรูปแบบดังภาพที่ 5

ตารางที่ 2 ปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุทางการเกษตร

Table 2 Cellulose hemicellulose and lignin contents in agriculture materials.

ชนิดของวัสดุเศษเหลือ	ส่วนประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า
เศษไม้เหลือทิ้ง	45-56	10-25	18-30	-
ฟางข้าว	32.1	24	12.5	17.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18.0	2.4
ชานอ้อย	33.4	30.0	18.9	2.4
ซังข้าวโพด	45	35	15	-
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96	-

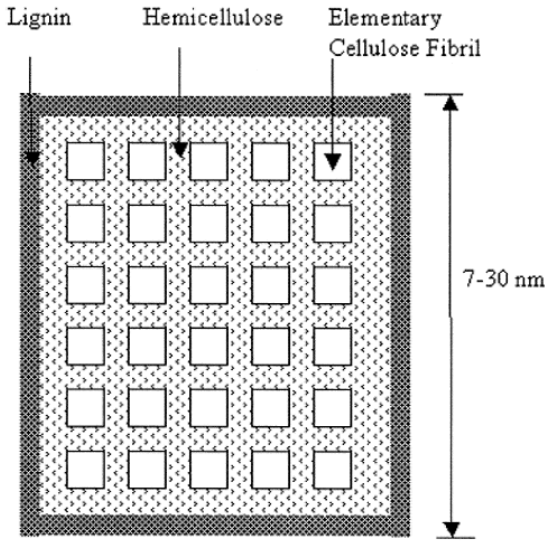
ที่มา : ปิยวรรณ สายมโนพันธ์ และพัชรินทร์ ฉัตรประเสริฐ, 2540; Martin, (1991 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)



ภาพที่ 3a การแยกองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช

Figure 3a Cell wall compositions.

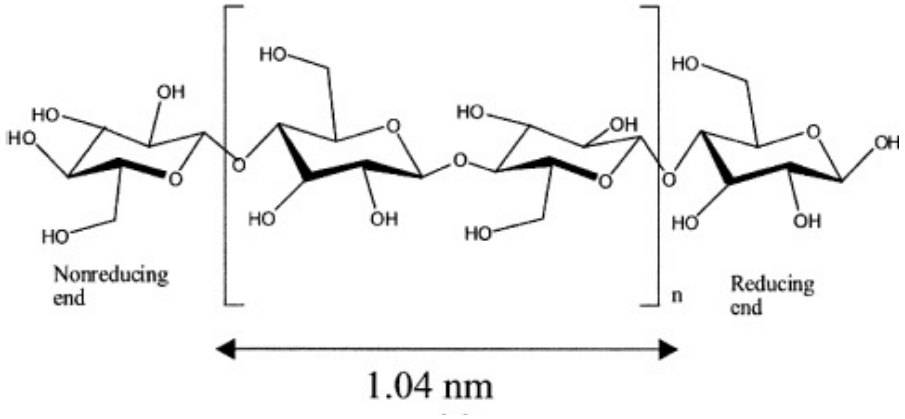
ที่มา : Greulch V.A., (1973 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)



ภาพที่ 3b ลิกโนเซลลูโลส

Figure 3b Lignocellulose.

ที่มา : Zhang และ Lynd (2004)



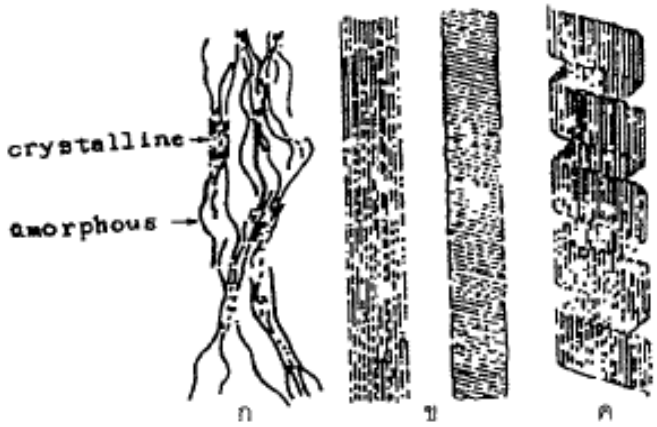
ภาพที่ 4 โครงสร้างของเซลลูโลส

Figure 4 Structure of cellulose

ที่มา : Zhang และ Lynd (2004)

โครงสร้างที่แตกต่างกัน 3 แบบ และมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลโดยตลอดนี้จึงทำให้เซลลูโลสที่เกิดขึ้นในธรรมชาติไม่อยู่ในรูปบริสุทธิ์ ส่วนมากมักจับกับแป้ง เพกติน ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีพวกพอลิแซคคาร์ไรด์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส โปรตีน และแร่ธาตุอื่นๆ บางชนิดในปริมาณน้อย (จุฑารัตน์ พงษ์โนรี, 2547)

โมเลกุลของเซลลูโลสเป็นสายยาวและอยู่รวมกันเป็นมัด โดยมีแรงยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกัน การจัดเรียงของตัวโมเลกุลค่อนข้างที่จะสม่ำเสมอดังภาพที่ 6



ภาพที่ 5 รูปร่างโครงสร้างของเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืชโดยทั่วไป

Figure 5 Structure of cellulose in cell wall.

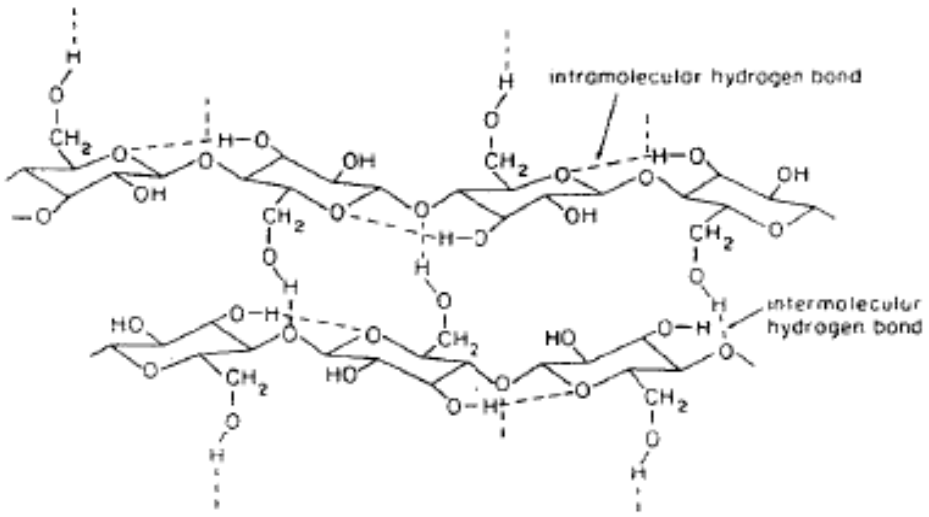
ก. Fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous)

ข. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส

ค. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้น และม้วนเป็นเกลียว

ที่มา : Norkrans (1967 อ้างโดย จุฑารัตน์ พงษ์โนรี, 2547)

จากการศึกษาโดย X-ray diffraction พบว่าเส้นใยของเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึกซึ่งเป็นระเบียบ และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ สำหรับส่วนที่เป็นผลึกในเส้นใยของเซลลูโลสนั้น โมเลกุลจะจัดตัวขนานกันและกัน และยึดติดกันอย่างมีระเบียบโดยพันธะไฮโดรเจน แต่สำหรับส่วนที่ไม่เป็นระเบียบนั้นจะมีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลอิสระมากกว่าส่วนที่เป็นระเบียบ ดังนั้นส่วนที่เป็นระเบียบจะเป็นส่วนที่ให้ความแข็งแรง ในขณะที่ส่วนที่ไม่เป็นระเบียบเป็นส่วนที่ให้ความยืดหยุ่น (จุฑารัตน์ พงษ์โนรี, 2547)



ภาพที่ 6 พันธะระหว่างไฮโดรเจนกับพันธะ β-1,4-glucan ในเส้นใยเซลลูโลส

Figure 6 H-bond and β-1,4-glucan linkage in cellulose.

ที่มา : Alberts (1983 อ้างโดย จุฑารัตน์ พงษ์โนรี, 2547)

เซลลลูโลสไม่ละลายในน้ำ หรือสารอินทรีย์ใดๆ และไม่ละลายในด่าง หรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในสารละลายด่างแก่ หรือกรดแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งเซลลูโลสตามลักษณะการละลายในกรด หรือด่างได้ 3 ชนิดคือ (TAPPI, 2000-2001 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)

1. แอลฟา-เซลลูโลส (α-Cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง

2. เบต้า-เซลลูโลส (β-Cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสภาพที่เป็นกรด

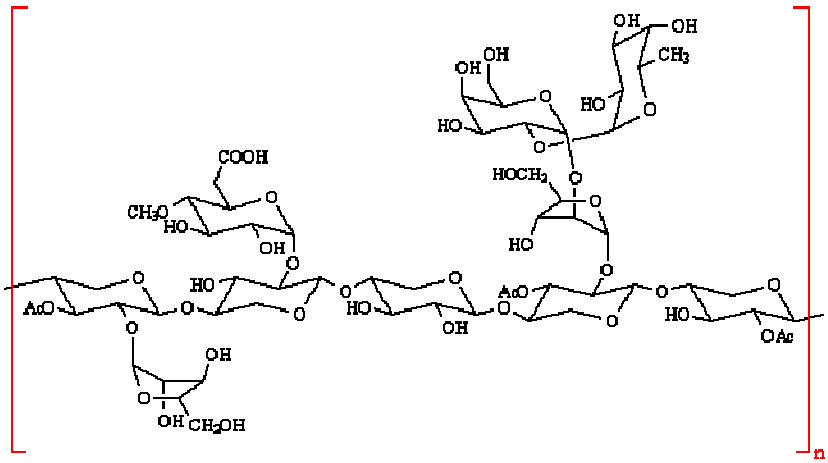
3. แกรมมา-เซลลูโลส (γ-Cellulose) เป็นเซลลูโลสที่สามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และสามารละลายได้ในสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ได้

2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เป็นโพลีแซคคาร์ไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ D-xylose, D-mannose, D-galactose และL-arabinose (ภาพที่ 7) ดังนั้นการแบ่งเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาลเช่น Xylan, Mannan, Glucan, Arabinan เป็นต้น (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

โดยส่วนใหญ่สายตรงของเฮมิเซลลูโลส จะเป็นไซโลสที่เชื่อต่อกันที่พันธะ β-1,4 ส่วนกิ่งก้านสาขาจะเป็นหน่วยของ อะราบิโนส แมนโนส กลูโคส กรดกลูคูโรนิค และน้ำตาลเพนโตสอื่นๆ ซึ่งเชื่อมต่อกันที่พันธะ β-1,4 ยกเว้น กาแลคโตสเท่านั้นที่มีลักษณะเฉพาะเชื่อมต่อกันที่พันธะตำแหน่ง β-1,3 (อรุณวรรณ นุชพ่วง, 2547)

ข้อแตกต่างระหว่างเฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสคือ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง สามารถละลายได้ดี ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สายโพลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า และมีความยาวของสายโซ่สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส (TAPPI, 2000-2001 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

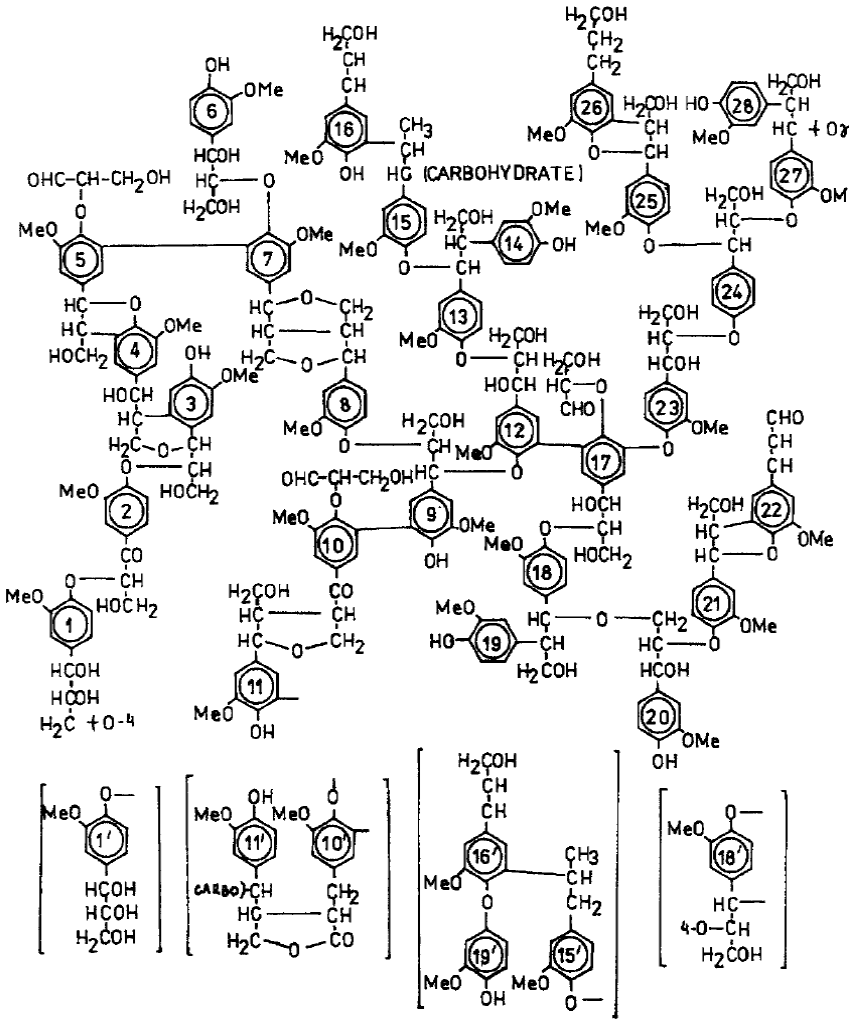
Figure 7 Structure of hemicellulose.

ที่มา : Mise à jour le (2001)

2.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินเป็นโพลิเมอร์ของหน่วย p-hydroxyphenylpropane เชื่อมต่อกันด้วย C-C และ C-O-C linkage (ภาพที่ 8) อาจกล่าวได้ว่าลิกนินเป็นโพลิเมอร์พวกฟีนอลิกที่เป็นสามมิติ (Three dimension phenolic compound) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2542)

ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่สามารถละลายน้ำ แต่สามารถที่จะละลายได้ในตัวทำลายอินทรีย์บางชนิดเช่น เอทานอล หรือเมทานอลที่ร้อน และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์



ภาพที่ 8 โครงสร้างของลิกนิน

Figure 8 Structure of lignin.

ที่มา : Sakakabara (1983 อ้างโดย Leonowicz และคณะ, 1999)

3. กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์

กระบวนการหมัก เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีอากาศ การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลเกิดขึ้นหลายวิธีทาง (pathway) ซึ่งขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการหมักมักจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ในสกุล *Saccharomyces* sp. ซึ่งเอทานอลจะถูกสร้างขึ้นโดยอาศัย Glycolysis หรือ Embden-Meyerhof-Panmas Pathway ดังภาพที่ 9

ในขั้นตอนของวิถี Glycolysis เพื่อให้ได้เป็นเอทานอลแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟท (triose phosphate)

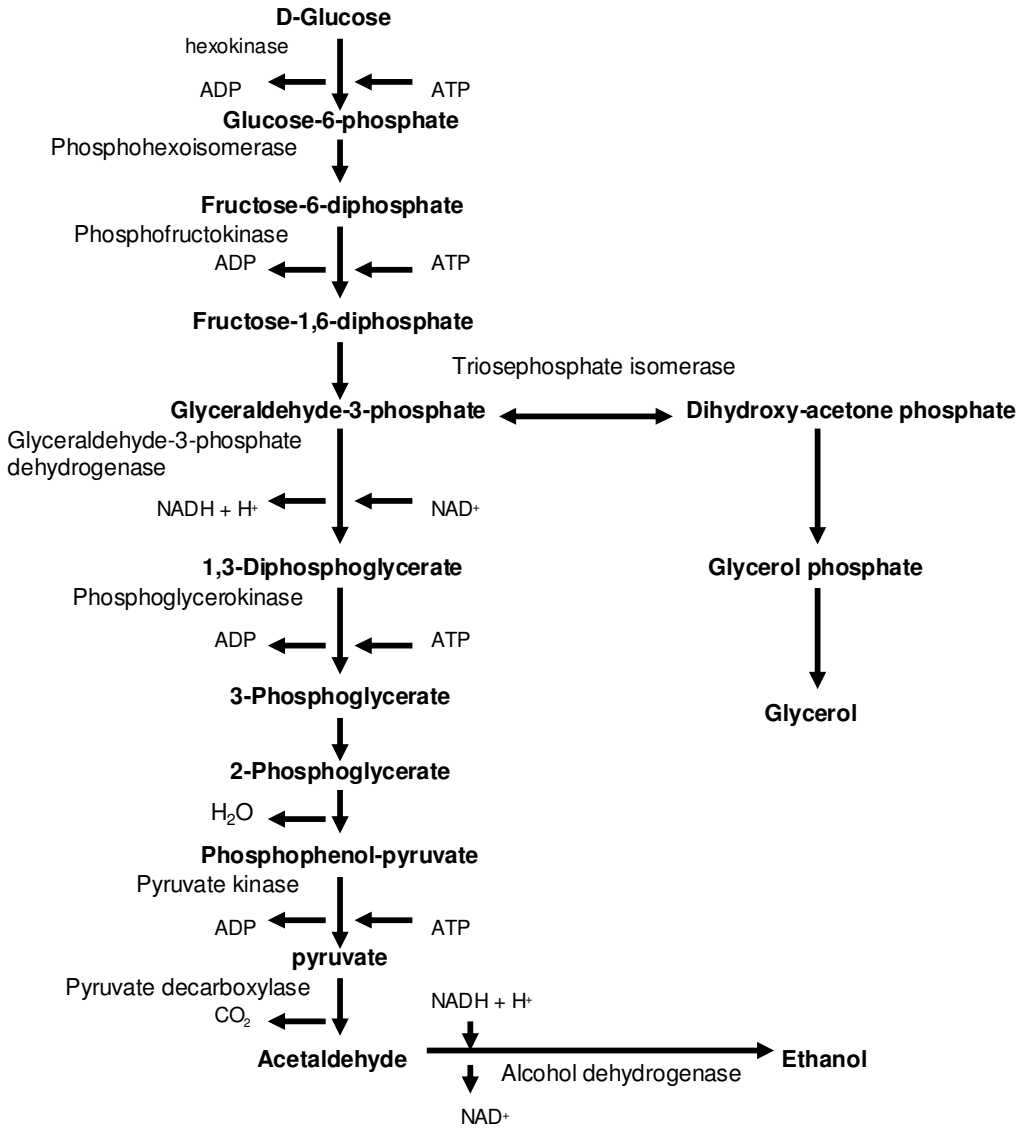
2. การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate)

3. การเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสาร 2 คาร์บอน เช่น เอทานอล หรือ 3 คาร์บอน

ตอนที่หนึ่งประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาของ hexokinase หรือ glucokinase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate (F6P) ด้วย phosphohexoisomerase จากนั้น phosphofructokinase จะเปลี่ยน F6P ให้เป็น fructose1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสารที่มีสามคาร์บอน 2 ชนิด คือ glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และ dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ aldolase จากนั้น DHAP จะเปลี่ยนเป็น glycerol phosphate และได้ glycerol ในที่สุด

ตอนที่สองมี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟทให้ได้ 1,3-diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD^+ ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-phosphoglycerate (3PG) และ ATP ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosephoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substrate level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี substrate level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย pyruvate kinase

ตอนที่สามจะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอน ทั้งนี้ขึ้นกับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาของ lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase complex ซึ่ง acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป เอนไซม์นี้อยู่ในไมโตคอน-เดรีย และเป็น enzyme complex ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น acetaldehyde โดยการเร่งของ pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น acetaldehyde จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD^+ กลายเป็นอะซิเตท (acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542 อ้างโดย อริสรา รอดมุ้ย, 2546)



ภาพที่ 9 การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Embden-Meyerhof-Panmas Pathway

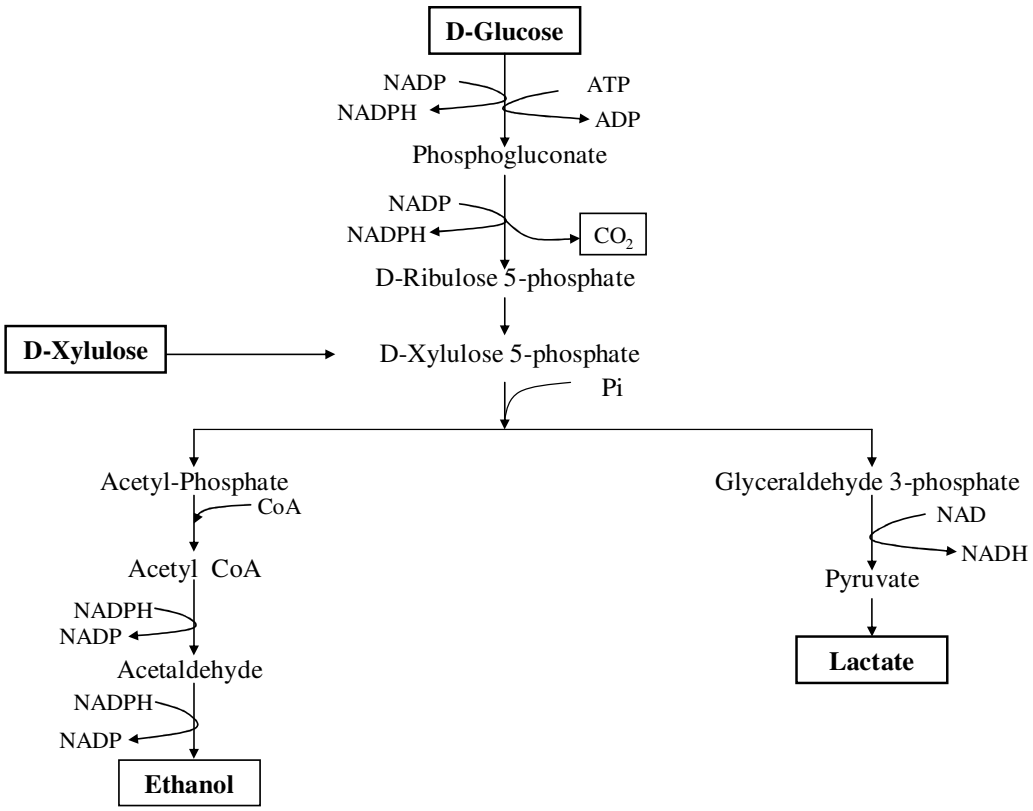
Figure 9 Ethanol productions by Embden-Meyerhof-Panmas Pathway.

ที่มา : อริสรา รอดมุ้ย (2546)

ตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 0.51 กรัม และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.49 กรัม แต่ในทางปฏิบัติพบว่า น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 0.46 กรัม และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.44 กรัม ที่เหลือยีสต์ใช้สำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ เมื่อกล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลส คือการสร้างเอทานอลจากน้ำตาลเพนโตส พบว่าเชื้อยีสต์สกุลอื่นๆที่ไม่ใช่ *Saccharomyces* sp. สามารถใช้น้ำตาล

ไซโลส (xylose) โดยผ่านวิถี Heterolactic Fermentat (Heterolactic Fermentation Pathway) ดังภาพที่ 10

ในการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของน้ำตาล D-xylose จะเกิดขึ้นภายในตัวยีสต์ โดยจะเปลี่ยนเป็น xylitol แล้วต่อมาเป็น D-xylulose โดยเอนไซม์ D-xylose reductase และเอนไซม์ Xylitol dehydrogenase ตามลำดับ จากนั้น D-xylulose ก็จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปโดยเอนไซม์ D-xylulose kinase ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสารตัวกลางของวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose Phosphate Pathway) (รัฐพงศ์ ปกแก้ว, 2545) สำหรับวิถี pentose phosphate เป็นกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลอีกวิธีหนึ่ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน



ภาพที่ 10 การผลิตเอทานอล และแลคแตท จากกลูโคส และไซโลสโดยวิถี Heterolactic Fermentation Pathway

Figure 10 Ethanol and lactate productions from glucose by Heterolactic Fermentation Pathway.

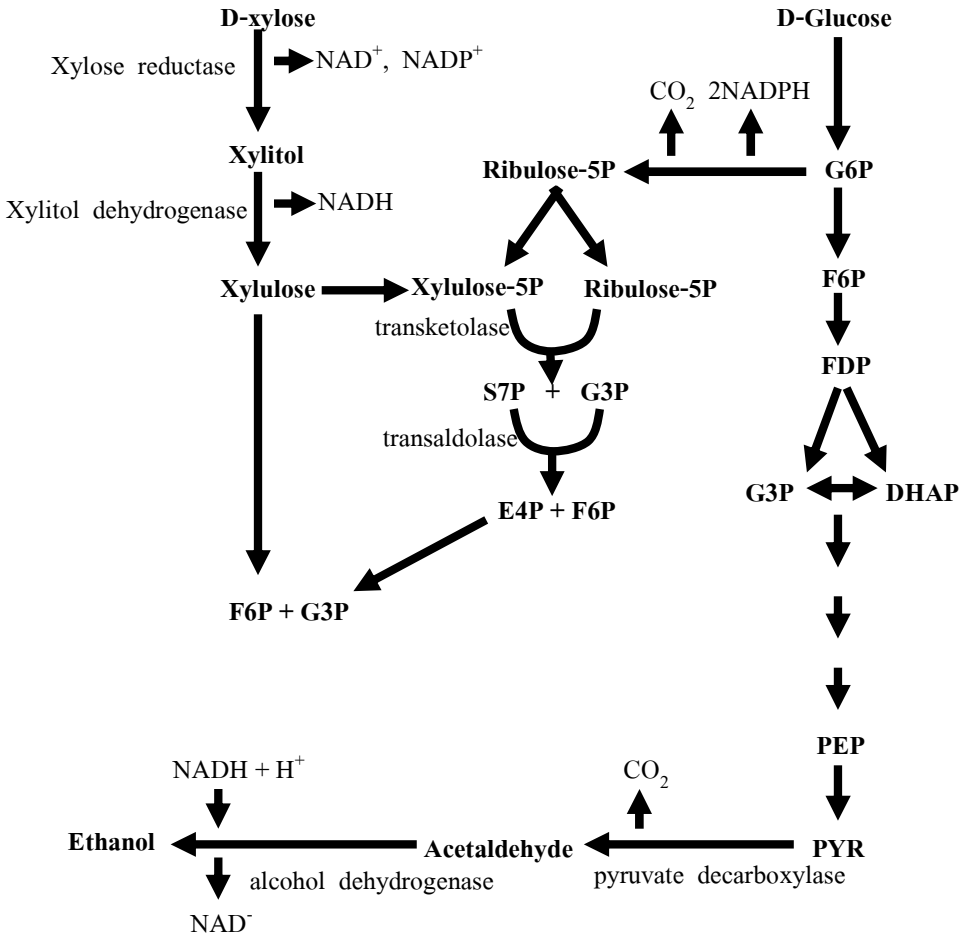
ที่มา : รัฐพงศ์ ปกแก้ว (2545)

ตอนที่หนึ่งเป็นการออกซิไดส์ G6P ให้เป็น 6-phosphogluconolactone โดยเอนไซม์ glucose-6- phosphate dehydrogenase ซึ่งจะให้ NADPH ต่อมา 6-phosphogluconolactone จะเปลี่ยนเป็น 6-phosphogluconate (6PG) โดย lactonase แล้ว 6PG ถูกออกซิไดส์เป็น ribulose-5-phosphate (RL5P) กับคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมกับให้ NADPH อีก ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย 6-phosphogluconate dehydrogenase ในตอนที่หนึ่งจึงเรียกว่า oxidative pentose phosphate pathway ซึ่งจะให้ 2 NADPH

ตอนที่สองเป็นการเปลี่ยน RL5P เป็นเพนโตสรูปอื่นๆ ได้แก่ ribose-5-phosphate (R5P) และ xylulose-5-phosphate (X5P) R5P จะเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง DNA RNA nucleotide และกรดอะมิโนบางชนิด นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเพนโตสให้เป็นน้ำตาลอื่นๆ และในที่สุดเป็น F6P กระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ transketolase ซึ่งใช้ thiamine pyrophosphate หรือ TPP เป็นโคเอนไซม์ในการโยกย้ายหมู่คีโต และ transaldolase เร่งปฏิกิริยาระหว่าง R5P กับ X5P ได้ sedoheptulo-7-phosphate (S7P) และ G3P และ transaldolase เร่งปฏิกิริยาระหว่าง S7P และ G3P ได้ F6P กับ erythrose-4-phosphate (E4P) ในปฏิกิริยาต่อไปซึ่งถูกเร่งโดย transketolase อีกเช่นกันจะรวม E4P กับ X5P ได้เป็น F6P กับ G3P (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542 อ้างโดย อริสรา รอดมุ้ย, 2546) จะนำเข้าไปใช้ในวิถี glycolysis จนในที่สุดจะผลิตเป็นเอทานอลออกมา ดังแสดงในภาพที่ 11

สำหรับแบคทีเรียเช่น *Zymomonase mobilis* จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลโดยอาศัย Entner-Doudoroff Pathway ดังภาพที่ 12

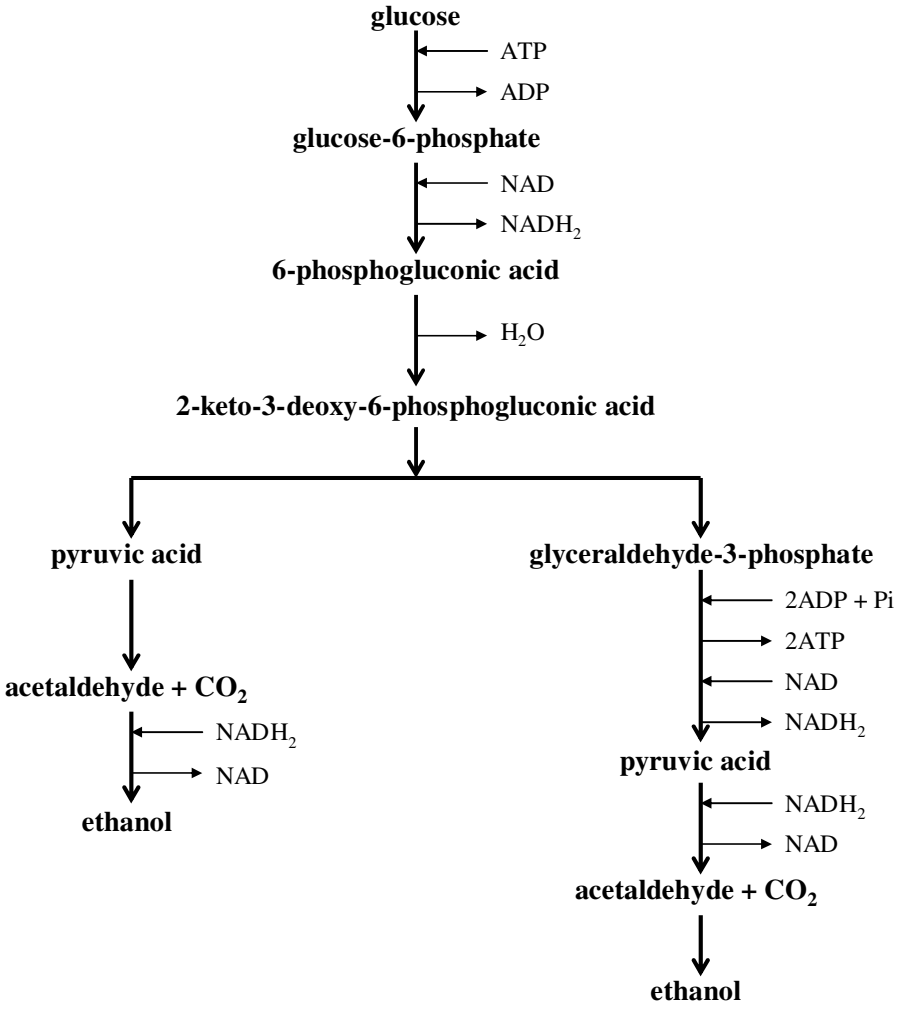
จากวิถีดังกล่าวนี้จะได้เอทานอลจำนวน 2 โมล จากกลูโคส 1 โมล แต่ได้ ATP เพียง 1 โมลต่อโมลของกลูโคส เมื่อเปรียบเทียบกับ Embden-Meyerhof-Parmas Pathway ซึ่งได้ ATP 2 โมลกลูโคส (รัฐพงศ์ ปกแก้ว, 2545)



ภาพที่ 11 การผลิตเอทานอลด้วยน้ำตาลเพนโตสโดยเชื้อยีสต์ผ่านวิถี Pentose phosphate และ Embden-Meyerhof-Parnas pathway

Figure 11 Ethanol proctions from pentose sugar by Pentose phosphate and Embden-Meyerhof-Parnas pathway.

ที่มา : Saddler (1993 อ้างโดย อริสรา รอดมุ้ย, 2546)



ภาพที่ 12 การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Entner-Doudoroff Pathway

Figure 12 Ethanol productions from glucose by Entner-Doudoroff Pathway.

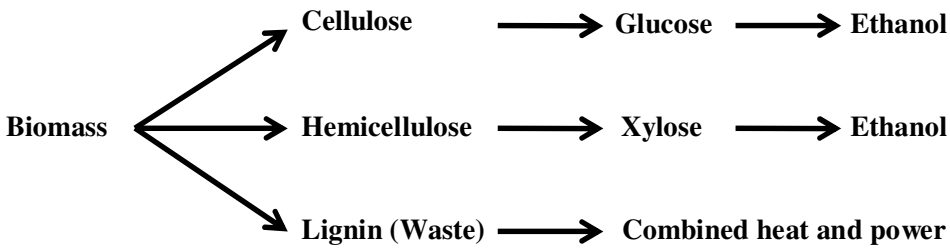
ที่มา : มาโนช โพธิ์สูง (2546)

4. การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงหรือการย่อยสลายจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดียว ซึ่งสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นเอทานอลได้ดังภาพที่ 13

สำหรับขั้นตอนในการผลิตเอทานอล จากวัตถุดิบในกลุ่มลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ คือ **การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment)** เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลสเพื่อให้เอนไซม์ กรด และจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายขึ้น

การย่อย (Hydrolysis) เป็นการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลส ให้ได้น้ำตาลเพนโตส และเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลเฮกโตส **ขั้นตอนการหมัก (Fermentation)** เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2548)



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนแปลงของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอล

Figure 13 Ethanol productions from lignocellulose or biomass.

ที่มา : Murphy และ McCarthy (2004)

4.1 การเตรียมลิกโนเซลลูโลส (Pretreatment)

การเตรียมลิกโนเซลลูโลสเป็นที่รู้จักกันนานแล้ว จุดประสงค์ของการเตรียม เพื่อแยกลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ สำหรับสิ่งที่ต้องการในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสคือ

1) เพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล

2) ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต

3) หลีกเลี่ยงการเกิดตัวยับยั้ง ในขั้นตอนการไฮโดรไลซีส และ การหมัก

4) ลดต้นทุนในการผลิต

สำหรับการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากสารพวกลิกโนเซลลูโลสเป็นสารที่มีความแข็งแรงต่อการย่อยสลาย จึงต้องมีการเตรียมเพื่อทำให้อ่อนนุ่ม ให้เอนไซม์เข้าถึง และทำปฏิกิริยาได้ดี (Sun และ Cheng, 2002) จากการศึกษาของ Krishna และคณะ (1998) ในการไฮโดรไลซีสใบอ้อยด้วยเอนไซม์ปรากฏว่าใบอ้อยที่ทำการเตรียม จะให้การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ใบอ้อยที่ไม่ได้ทำการเตรียมจะให้การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไม่ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ และในการผลิตเอทานอลจาก alfalfa fiber ที่ไม่ทำการเตรียม จะให้ปริมาณเอทานอลเพียง 6.4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้ alfalfa fiber ที่เตรียมจะสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 18.0 กรัมต่อลิตร (Sreenath และคณะ, 2001)

ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสอาจจะทำโดยใช้วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ

4.1.1 วิธีการเตรียมทางกายภาพ (Physical pretreatment)

1) Mechanical comminution

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบโดยวิธีการตัด การบดวัตถุดิบ เพื่อลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส ขนาดที่เกิดจากการตัดประมาณ 10-30 มิลลิเมตร ขนาดที่เกิดจากการบดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร การบดสามารถที่จะทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการย่อยสลายได้ (Sun และ Cheng, 2002)

Zhu และคณะ (2005a, 2005b) ได้ใช้ฟางข้าวในการผลิตเอทานอล ซึ่งก่อนที่จะทำการเตรียม ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้ทำการตัดให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร และหลังจากเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้ว ทำการตัดให้เป็นชิ้นเล็กขนาด 10-20 เมช อีกครั้งจะทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

2) Pyrolysis

กระบวนการไพโรไลซีสเป็นกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูงประมาณ 200-600 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันบรรยากาศ ซึ่งเป็นกระบวนการทางเคมีที่ผันกลับไม่ได้แบบหนึ่ง (Irrevessible reaction) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไพโรไลซิสขึ้นกับ ธรรมชาติของวัสดุ ความชื้น เวลา อุณหภูมิ ขนาดอนุภาค โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่ได้แบ่งได้เป็น ถ่าน 30-50 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซ 20 เปอร์เซ็นต์ ของเหลวที่เป็นอินทรีย์สาร 18-20 เปอร์เซ็นต์ เช่น กรดอะซีติก (Acetic acid) เมธานอล (Methanol) ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้

ในการทำไพโรไลซีสนั้นเคยมีการใช้ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส ทำให้เซลลูโลสจะสลายตัวอย่างรวดเร็วได้แก๊ส และถ่าน เมื่อนำถ่านที่ได้ไปไฮโดรไลซีสด้วยกรด (1N H_2SO_4, 97^0C, 2.5 hr) จะทำให้ลิกโนเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวส์ 80-85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีกลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Sun และ Cheng, 2002)

4.1.2 วิธีการเตรียมทางเคมีกายภาพ (Physio-Chemical pretreatment)

1) Steam explosion (autohydrolysis)

การระเบิดด้วยไอน้ำเป็นวิธีทั่วไปที่ใช้กันมากในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส วิธีนี้วัตถุดิบจะถูกเตรียมที่ความดันไอน้ำสูง แล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้วัตถุดิบระเบิดแล้ว

เกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำจะเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 MPa เป็นเวลาหลายวินาทีถึงสองหรือสามนาที หลังจากนั้นเอาออกมาที่อุณหภูมิปกติ (Sun และ Cheng, 2002)

Mosier และคณะ (2005) ได้เตรียมฟางข้าวโพดที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาล 90 เปอร์เซ็นต์

Ballesteros และคณะ (2004) ได้เตรียม poplar และ eucalyptus ที่ 210 องศาเซียส เป็นเวลา 4 นาที wheat straw ที่ 190 องศาเซียส เป็นเวลา 8 นาที sweet sorghum bagasse ที่ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ *Brassica carinata* residue ที่ 210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำไปผลิตเอทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ 15 FPU/g substrate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-82 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล 16-19 กรัมต่อลิตร

ข้อดีของการเตรียมด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำคือ ใช้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การตัดการบด วิธีทางกายภาพใช้พลังงานมากกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ 70 เปอร์เซ็นต์ การระเบิดด้วยไอน้ำจะมีประสิทธิภาพสูงกับไม้เนื้อแข็ง และสิ่งที่เหลือจากการเกษตร แต่จะมีประสิทธิภาพน้อย กับไม้เนื้ออ่อน ข้อจำกัดของการระเบิดด้วยไอน้ำ จะทำให้ไซเลนแตกออกด้วย และลิกนินกับคาร์โบไฮไดรตแตกออกไม่สมบูรณ์ สร้างสารที่เป็นตัวยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Sun และ Cheng, 2002)

2) Ammonia fiber explosion (AFEX)

AFEX คือการนำวัตถุดิบใส่ลงไปในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิและความดันสูง แล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะคล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยปริมาณการใช้แอมโมเนียคือ 1-2 กิโลกรัมของแอมโมเนีย ต่อน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ 1กิโลกรัม ใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การเตรียมด้วยวิธี AFEX จะเพิ่มอัตราการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล สามารถที่จะใช้เตรียมลิกโนเซลลูโลสที่มาจากหลายแห่งได้ เช่น พืชตระกูลถั่ว ฟางข้าวต่างๆ ซังข้าวโพด ของเสียจากเทศบาล กระดาษต่างๆ หญ้า เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

3) CO_2 explosion

กระทำในลักษณะเช่นเดียวกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการระเบิดด้วยแอมโมเนีย โดย CO_2 จะเหมือนกับกรดคาร์บอนิก Dale และ Moreira (1982 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) ได้ใช้

วิธีนี้ในการเตรียมพืชตระกูลถั่ว (4kg CO_2/kg fiber ที่ความดัน 5.62 MPa) และต่อจากนั้นไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ได้น้ำตาลกลูโคส 75 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

Zheng และคณะ (1998 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) ได้เปรียบเทียบการเตรียม recycled paper, sugarcane bagasse และ repulping waste ด้วยวิธี CO_2 explosion, ammonia explosion และ steam explosion ปรากฏว่า CO_2 explosion มีประสิทธิภาพมากกว่า และไม้สร้างตัวยับยั้งเหมือนในกรณีของ steam explosion

4.1.3 วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)

1) Ozonolysis

โอโซนสามารถที่จะสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ในวัตถุดิบหลายชนิดเช่น ฟางข้าว ชานอ้อย หญ้า ถั่วลิสง ฝ้าย ขี้เลื่อย เป็นต้น การสลายจะจำเพาะกับลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ส่วนเซลลูโลสจะมีความแข็งแรง การเตรียมด้วยโอโซนจะมีข้อได้เปรียบคือ สามารถสลายลิกนิน ไม่ผลิตตัวที่เป็นพิษ หรือเกิดตัวยับยั้ง ปฏิกิริยาสามารถเกิดที่อุณหภูมิ และความดันปกติ แต่การใช้โอโซนในปริมาณมากจะทำให้ต้นทุนสูงเพราะราคาแพง (Sun และ Cheng, 2002)

2) Acid pretreatment

ได้มีการใช้กรดเช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส ถึงแม้ว่ากรดเป็นสารเคมีที่ไฮโดรไลซีสเซลลูโลสได้ดี แต่ความเข้มข้นของกรดเป็นพิษ กัดกร่อน และเป็นอันตราย จึงต้องการถังปฏิกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยใช้การเจือจางกรดในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสจนสามารถเพิ่มการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสได้ แต่การใช้กรดจะทำให้ต้นทุนสูง และพีเอชจะมีผลในขั้นตอนการหมักด้วย (Sun และ Cheng, 2002)

Umikalsom และคณะ (1997) ได้ทำการเตรียมทะลายปาล์มเปล่าโดยวิธีการแช่ทะลายปาล์มเปล่าในสารละลายกรดไนตริก (HNO_3) ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 5 นาที ปรากฏว่าทะลายปาล์มเปล่าหลังจากการเตรียมมีปริมาณเซลลูโลส 62.9 ± 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 4.6 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณลิกนิน 4.5 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากทะลายปาล์มเปล่าที่มีปริมาณเซลลูโลส 50.4 ± 1.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณเฮมิเซลลูโลส 12.9 ± 1.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และปริมาณลิกนิน 10.0 ± 1.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

Saha และคณะ (2005) ได้ทำการเตรียมฟางข้าวด้วยการต้มฟางข้าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้ฟางข้าวที่เตรียมแล้ว เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดยใช้ระบบ SSF ทำให้ผลิตเอทานอลได้ 19 ± 1 กรัมต่อลิตร และ Yield 0.24 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

3) Alkaline pretreatment

เบสบางตัวสามารถที่จะใช้ในการเตรียมวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส และปัจจัยของการเตรียมขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนิน การเตรียมลิกโนเซลลูโลสด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เจือจางจะทำให้เกิดการพองตัว ทำให้เพิ่มพื้นที่ผิว สลายการเป็นโพลิเมอร์ ลดความเป็นผลึก และทำลายโครงสร้างของลิกนิน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถที่จะลดปริมาณลิกนินของไม้เนื้อแข็งจาก 24-55 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่กรดเจือจางจะเหลือลิกนินมากกว่าประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์ (Millet และคณะ, 1976 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) สารละลายด่างบางตัวสามารถทำลายพันธะระหว่างลิกนินกับลิกนิน และทำลายพันธะระหว่างลิกนินกับโพลีเซคคาร์ไรด์ (Sun และคณะ, 1995) ในการเตรียม Corn stalk, Cassava bark และ Peanut husk โดยใช้วิธีการฉายรังสีร่วมกับการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ปรากฏว่า Corn stalk ให้ Yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 20 เปอร์เซ็นต์ เป็น 43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของ Cassava bark และ Peanut husk จะได้ Yield ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Chosdu และคณะ 1993 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) Iyer และคณะ (1996 อ้างโดย Sun และ Cheng. 2002) ใช้แอมโมเนียความเข้มข้น 2.5-20 เปอร์เซ็นต์ ในการเตรียม Corn cobs/stover และ switchgass ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ปรากฏว่าสามารถสลายลิกนินใน Corn cobs/stover ได้ 60-80 เปอร์เซ็นต์ และ สามารถสลายลิกนินใน switchgass ได้ 65-85 เปอร์เซ็นต์ Sun และคณะ (1995) เปรียบเทียบการเตรียม Wheat straw ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ดรอกไซด์ (H_2O_2) และเบสหลายชนิดคือ $Ca(OH)_2$, $NH_3.H_2O$, KOH, NaOH และ LiOH ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปรากฏว่า การเตรียมด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไม่สามารถที่จะกำจัดลิกนินได้ แต่กำจัดเฮมิเซลลูโลสได้ 10.8 และ 14.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในการเตรียมด้วยไฮโดรเจนเปอร์ดรอกไซด์สามารถสลายลิกนินได้ 7 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถสลายเฮมิเซลลูโลสได้ สำหรับการเตรียมด้วยสารละลายโพแทสเซียสไฮดรอกไซด์, โซเดียมไฮดรอกไซด์ และลิเที่ยมไฮดรอกไซด์ สามารถสลายลเฮมิเซลลูโลสได้ 42.1, 49.8 และ 58.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสามารถสลายลิกนินได้ 14.9, 20.6 และ 36.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Sun และคณะ (1995) กล่าวว่าการเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และลิเที่ยมไฮดรอกไซด์ มีประสิทธิภาพในการสลายลิกนิน และเฮมิ

เซลลูโลสมากกว่าการเตรียมด้วยโพแทสเซียสไฮดรอกไซด์ ในการเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเตรียมถึง 144 ชั่วโมง สามารถสลายเฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ถึง 82.6 เปอร์เซ็นต์ และ 59.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Sun และคณะ, 1995) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส สามารถสลายลิกนินได้ 34.2, 53.8 และ 63.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถสลายเฮมิเซลลูโลสได้ 65.2, 74.7 และ 75.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลาเพียง 6 ชั่วโมงเท่านั้น จะเห็นได้ว่าเฮมิเซลลูโลสสามารถสลายได้จำกัดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ส่วนปริมาณลิกนินสามารถสลายได้เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์) จะทำให้ปริมาณเฮมิเซลลูโลสสลายได้เพิ่มขึ้น (Sun และคณะ, 1995) แต่สำหรับในการเตรียมทะลายปาล์มเปล่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยสารเคมีต่างๆ (0.5% NaOH, 0.5% HNO3, 0.5% HCl, 0.5% EDA และ 0.5% EDTA) ปริมาณเซลลูโลสที่เพิ่มขึ้นจะไม่แตกต่างจากที่ไม่ได้ทำการเตรียม แสดงให้เห็นว่าการเตรียมด้วยสารเคมีเหล่านี้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดส่วนอื่นๆในทะลายปาล์มเปล่าได้น้อย แต่เมื่อนำไปไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปรากฏว่าการเตรียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะให้อัตราเร็วในการไฮโดรไลซีส และปริมาณการไฮโดรไลซีสมากที่สุดด้วย รองลงมาคือ กรดไนตริก (Umikalsom และคณะ, 1998) จากนั้นเมื่อนำทะลายปาล์มที่แช่ในสารเคมีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ไปให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 5 นาที (Chemical/Autoclave 121^{0}C, 15 psi, 5 min) มาทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ผลปรากฏว่า การเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5%NaOH/ Soaking 30 ^{0}C/ Autoclave 121^{0}C, 15 psi, 5 min) จะทำให้การเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลเพิ่มขึ้น มากกว่าการแช่ทะลายปาล์มในสารเคมีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอย่างเดียวประมาณ 3.5 เท่า ส่วนสารเคมีอื่นๆได้ปริมาณน้ำตาลน้อยกว่า 2 เท่า และการไฮโดรไลซีสด้วยของทะลายปาล์มเปล่าที่เตรียมด้วย 0.5%NaOH/Soaking 30 ^{0}C/ Autoclave 121^{0}C, 15 psi, 5 min จะให้ปริมาณการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสูงสุด ทั้งๆที่ปริมาณเซลลูโลสหลังการเตรียมด้วย 0.5%HNO_3/Soaking 30^{0}C/Autoclaving มีปริมาณสูงสุด (62.9 เปอร์เซ็นต์) และสูงกว่าการเตรียมด้วย 0.5%NaOH/Soaking 30^{0}C/Autoclaving (52.9 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า การเตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ทะลายปาล์มเปล่ามีความเหมาะสมที่เอนไซม์จะไฮโดรไลซีสเป็นน้ำตาลมากกว่าการเตรียมด้วยกรด (Umikalsom และคณะ, 1998) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มการไฮโดรไลซีสสูงขึ้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการเตรียมด้วย 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถสลายลิกนินได้มากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์

ส่งผลให้การไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการไฮโดรไลซีสทะลายปาล์มที่เตรียมด้วย 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะใกล้เคียงกับ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (Umikalsom และคณะ, 1998) ในการเตรียมวัตถุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จะทำให้การย่อยด้วยเอนไซม์ ให้ผลผลิตน้ำตาลสูงขึ้น 24-53 เปอร์ฌซ็นต์ (Okeke และคณะ Obi 1995 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) Farooq Latif และ Mohammad lbrahim Rajoka (2001 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) ทำการเตรียมซังข้าวโพด โดยการนำซังข้าวโพดมาบดให้มีขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร ก่อนนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 5 จากนั้นให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อ (autoclave) เป็นเวลา 15 นาที พบว่ามีเซลลูโลสเพิ่มขึ้นเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเซลลูโลสก่อนเตรียม 41 เปอร์เซ็นต์ และส่วนประกอบอื่นๆลดลง ปราณี สถิรพิพัฒน์กุล (2532 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) ทำการเตรียมผักตบชวา โดยใช้สารละลายกรด ด่าง และการใช้ไอน้ำความดันสูง พบว่าการเตรียมผักตบชวาด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะช่วยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด ระวีวรรณ แกล้วกล้า (2538 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) ได้ทำการเตรียมฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที จะทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลสเกิดได้ดีขึ้น พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ทำการเตรียมมันสำปะหลังด้วยการแช่มันสำปะหลังในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้เหง้ามันสำปะหลังที่มีปริมาณเซลลูโลส 96.46 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 1.85 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 1.69 เปอร์เซ็นต์ จากเหง้ามันสำปะหลังที่ก่อนการเตรียมจะมีเซลลูโลส 82.14 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 11.41 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 6.54 เปอร์เซ็นต์

Zhu และคณะ (2005c) ได้เปรียบเทียบการไฮโดรไลซีสฟางข้าวที่เตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว, การเตรียมด้วย Alkali แล้วต่อด้วย Microwave/water และการใช้ Microwave ร่วมกับ Alkali (Microwave/alkali) ผลปรากฏว่าการเตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว กับ การเตรียมด้วย Alkali แล้วต่อด้วย Microwave/water จะมีอัตราการไฮโดรไลซีส และ Yield ที่ได้ใกล้เคียงกัน ส่วนในการเตรียมฟางข้าวด้วย Microwave/alkali มีอัตราการไฮโดรไลซีสเริ่มต้นสูงกว่า แต่Yield ที่ได้ เท่ากัน และเมื่อนำฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/Alkali และ Alkali อย่างเดียว ไปผลิตเอทานอลด้วยวิธีรวมการย่อยด้วยเอนไซม์กับการหมักด้วยยีสต์(SSF) ปรากฏว่าการเตรียมฟางข้าวด้วย Microwave/Alkali จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการเตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว โดยการเตรียมด้วย

Microwave/Alkali จะผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากว่า และมี Yield มากกว่า (Zhu และคณะ, 2005b) จากนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบการเตรียมฟางข้าวด้วยวิธี Alkali อย่างเดียว, Microwave 300W/alkali, Microwave 500W/alkali, Microwave 700W/alkali ผลปรากฏว่าการเตรียมด้วย Microwave 700W/alkali จะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด โดยมีปริมาณเซลลูโลส 69.2±0.3 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 30 นาที ส่วนการเตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว และ Microwave 300W/alkali จะให้ปริมาณเซลลูโลส 65.4 ± 0.7 เปอร์เซ็นต์ และ 69.3 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 70 นาที ตามลำดับ ในการเตรียมด้วย Microwave 500W/alkali จะให้ปริมาณเซลลูโลส 68.8 ± 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 42 นาที (Zhu และคณะ, 2005a) และเมื่อนำฟางข้าวที่เตรียมด้วย Alkali เป็นระยะเวลา 70 นาที กับ Microwave 700W/alkali 30 นาที ไปทำการไฮโดรไลซีส ปรากฏว่าการเตรียมด้วย Microwave 700W/alkali 30 นาที จะมีอัตราการไฮโดรไลซีสเร็วกว่า และได้น้ำตาลมากกว่าการเตรียมด้วย Alkali เป็นระยะเวลา 70 นาที โดยในการไฮโดรไลซีสฟางข้าวที่เตรียมด้วย Alkali เป็นระยะเวลา 70 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 34.5 ± 0.6 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนในการเตรียมด้วย Microwave 700W/alkali 30 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 34.9 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในเวลาเพียง 72 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสารตั้งต้น พีเอช 4.8 ความเข้มข้นของฟางข้าว 50 กรัมต่อลิตร Zhu และคณะ (2006b) ได้เปรียบเทียบการเตรียมฟางข้าวด้วยวิธี Microwave/alkali, Microwave/acid/alkali และMicrowave/acid/alkali/H_2O_2 ผลปรากฏว่า ในการเตรียมฟางข้าวด้วยวิธี Microwave/acid/alkali/H_2O_2 จะให้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด โดยมีปริมาณเซลลูโลสสูงถึง 80.6 ± 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการเตรียมด้วย Microwave/alkali และ Microwave/acid/alkali จะให้ปริมาณเซลลูโลส 69.3 ± 1.3 และ 76.3 ± 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/alkali, Microwave/acid/alkali และMicrowave/acid/alkali/H_2O_2 ไปทำการไฮโดรไลซีสผลปรากฏว่า ฟางข้าวที่เตรียมด้วยวิธี Microwave/acid/alkali/H_2O_2 มีอัตราการไฮโดรไลซีส และให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มากที่สุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 30.6 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง โดยในการไฮโดรไลซีสใช้ความเข้มข้นของฟางข้าว 50 กรัมต่อลิตร ใช้พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสารตั้งต้น ส่วนในการไฮโดรไลซีสฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/alkali และ Microwave/acid/alkali จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 34.9 ± 0.5 และ 35.2 ± 0.4 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ Zhu และคณะ (2006c) ได้เปรียบเทียบการเตรียม wheat straw ด้วย 1%NaOH/Boiling, กับ 1%NaOH/Microwave300W, 500W, และ 700W ผลปรากฏว่าการเตรียมด้วย 1%NaOH/Microwave 700W จะเหลือ wheat straw 48.4 เปอร์เซ็นต์ และมีเซลลูโลส 79.6 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 5.7

เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 7.8 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเตรียม 25 นาที ส่วนการเตรียมด้วย 1%NaOH/Boiling จะเหลือ wheat straw 44.7 เปอร์เซ็นต์ และมีองค์ประ กอบของเซลลูโลส 73.5 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 7.2 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 11.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเตรียม 60 นาที Zhu และคณะ (2006c) ได้รายงานว่าการเตรียมด้วย 1%NaOH/Boiling จะทำให้ปริมาณ wheat straw และองค์ประกอบทั้ง เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน หายไปเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาเพิ่มและจะคงที่เมื่อเวลา 60 นาที โดยน้ำหนักที่หายไปของ wheat straw เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็น 44.7 ± 0.7 เปอร์เซ็นต์, 1.3 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์, 76 ± 1.1 เปอร์เซ็นต์ และ 81.3 ± 0.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อเปลี่ยนจากการให้พลังงานโดยการต้ม เป็นการให้พลังงานโดยเครื่องไมโครเวป (1%NaOH/Microwave) 300W, 500W และ 700W จะทำให้น้ำหนักที่หายไปไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลา 60, 35 และ 25 นาที ตามลำดับ และมีปริมาณ wheat straw เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่หายไปเป็น 48.4 ± 1.0 เปอร์เซ็นต์, 1.1 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์, 84.4 ± 1.3 เปอร์เซ็นต์ และ 86.2 ± 0.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Zhu และคณะ (2006c) ได้ทำการเปรียบเทียบการไฮโดรไลซีส wheat straw ที่เตรียมด้วย 1%NaOH/Boiling 60 min กับ 1%NaOH/Microwave700W 25 min ผลปรากฏว่าการเตรียมด้วย 1%NaOH/Microwave700W 25 จะให้อัตราการไฮโดรไลซีส และปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงกว่า โดยการเตรียมด้วย 1%NaOH/Boiling 60 min จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 40.2 ± 1.1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการเตรียมด้วย 1%NaOH/Microwave700W 25 min จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ถึง 42.9 ± 0.9 กรัมต่อลิตร ในเวลาเพียง 72 ชั่วโมง ซึ่งในการไฮโดรไลซีสจะเห็นได้ว่า การเตรียมที่สามารถสลายปริมาณลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสไปได้มาก จะทำให้เอนไซม์ไฮโดรไลซีสเซลลูโลสได้มาก Zhu และคณะ (2006c) รายงานว่าการเตรียมด้วย 1%NaOH/Microwave จะสามารถสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสได้ในเวลาสั้นกว่าการเตรียมด้วย 1%NaOH/Boiling Silverstein และคณะ (2006) ได้ทำการเตรียม Cotton stalks ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณไซเลนละลายจาก 13.90 เปอร์เซ็นต์ (0.5% NaOH/90 ^{0}C, 90min) เป็น 40.02 เปอร์เซ็นต์ (2.0%NaOH/90 ^{0}C, 90min) ทำให้กลูแคนเพิ่มขึ้นจาก 35.54 เปอร์เซ็นต์ (0.5% NaOH/90^{0}C, 30 min) เป็น 50.33 เปอร์เซ็นต์ (2.0%NaOH/121^{0}C, 15 psi, 60min) และในการเตรียมด้วย 2.0%NaOH/121^{0}C, 15 psi, 90min จะลดปริมาณได้สูงสุด 65.53 เปอร์เซ็นต์ Silverstein และคณะ (2006) ได้ทำการเปรียบเทียบการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ของ Cotton stalks ที่เตรียมด้วย 2.0% H_2SO_4/121^{0}C, 15psi, 60min, 2.0%NaOH/121^{0}C,15psi, 60min และ 2.0%H_2O_2/121^{0}C,15psi, 60min ผลปรากฏว่า การเตรียมด้วย 2.0%NaOH/121^{0}C, 15 psi, 60 min จะให้ปริมาณการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสมากที่สุด (60.8 เปอร์เซ็นต์) ตามด้วย 2.0%H_2O_2/121^{0}C, 15 psi, 60 min มี

ปริมาณการเปลี่ยนแปลง 49.8 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0% H_2SO_4/121^{0}C, 15 psi, 60 min มีการเปลี่ยนแปลง 23.8 เปอร์เซ็นต์

4) Oxidative delignification

การสลายของลิกนินโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถที่จะเกิดขึ้นโดยการเร่งด้วยเอนไซม์ peroxidase การเตรียมชานอ้อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถที่จะเพิ่มการไฮโดรไลซีส ลิกนิน ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลสจำนวนมากสามารถสลายตัวโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อนำลิกโนเซลลูโลสที่เตรียมด้วยวิธีนี้มาไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Azzam, 1989 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002)

5) Organosolv process

ขั้นตอน Organosolv (สารอินทรีย์ หรือสารอินทรีย์ผสมกับกรดอนินทรีย์เช่น HCl หรือ H_2SO_4) ใช้ในการสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลีนไกลคอล เป็นต้น กรดอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวเร่งเช่น oxalic acid, acetylsalicylic acid และ salicylic acid ส่วนที่อุณหภูมิสูง (185^{0}C) ไม่จำเป็นต้องเติมตัวเร่ง ตัวทำละลายจำเป็นต้องระบายออกจากถังปฏิกรณ์ ระเหยเพื่อทำให้เข้มข้นขึ้น และสามารถที่จะนำกลับมาใช้ใหม่ได้เพื่อลดต้นทุน การนำตัวทำละลายออกจากระบบเป็นสิ่งสำคัญเพราะว่า ตัวทำละลายเป็นตัวยับยั้งในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการไฮโดรไลซีสและการหมัก (Sun และ Cheng, 2002)

4.1.4 วิธีการเตรียมทางชีวภาพ (Biodegradation Pretreatment)

ในขั้นตอนการเตรียมลิกโนเซลลูโลสทางชีวภาพ มีการใช้จุลินทรีย์เช่น Brown-, white-, and soft-rot fungi ในการสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบ Brown-rot fungi ใช้เฉพาะเซลลูโลสในขณะที่ White-rot fungi และ Soft-rot fungi สามารถใช้ได้ทั้งเซลลูโลสและลิกนิน White-rot fungiเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมากในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส

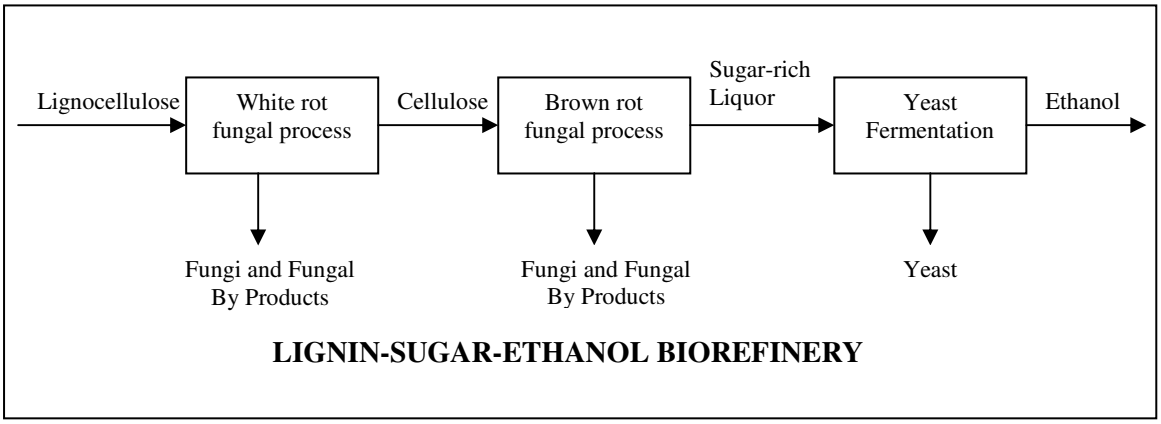
White-rot fungi สามารถที่จะย่อยสลายลิกนิน และปลดปล่อยเซลลูโลสออกมาได้ Brown rot fungi สามารถที่จะทำการสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลสำหรับการหมักได้ ส่วน Yeasts สามารถที่หมัก แล้วเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้ (ภาพที่ 14)

Hatakka (1983 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) ได้ศึกษาการเตรียมฟางข้าวโดยใช้ white rot fungi 19 ชนิด พบว่า ฟางข้าวเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวส์ได้ 35 เปอร์เซ็นต์ โดย *Pleurotus*

ostreatus ใน 5 สัปดาห์ เหมือนกับการเตรียมโดยใช้ *Phanerochaete sordida* 37 และ *Pycnoporus cinnabarinus* 115 ใน 4 สัปดาห์

Akin และคณะ (1995 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) ได้รายงานการสลายตัวของหญ้าโดยใช้ *Ceriporiopsis subvermispora* เพิ่มขึ้น 29-32 เปอร์เซ็นต์ และ 63-67 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ *Cyathus stercoreus* ภายใน 6 สัปดาห์

ข้อได้เปรียบของการเตรียมด้วยวิธีทางชีวภาพคือใช้พลังงานต่ำและใช้สภาวะแวดล้อมธรรมดา แต่การไฮโดรไลซีสด้วยจุลินทรีย์ หรือวิธีทางชีวภาพนั้นจะให้ผลผลิตต่ำมาก



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของลิกโนเซลลูโลสโดยวิธีทางชีวภาพ

Figure 14 Biodegradation of lignocellulose.

ที่มา : Office of Biorenewable Programs (2548)

4.2 การย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากวัสดุชนิดลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อทำการย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมา ถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลหลายชนิดปะปนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส สำหรับการย่อยมีอยู่ด้วยกัน 2 วิธีคือ วิธีการย่อยทางเคมี และวิธีการย่อยทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์

4.2.1 วิธีการย่อยทางเคมี

สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้น โดยน้ำตาลจะทำ

ปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆเช่น Furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟุริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป กรดซัลฟุริกเจือจาง 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรง และไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อน จึงมีราคาแพง นอกจากนี้ น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมีกรดเจือปน (อรุณวรรณ นุชพ่วง, 2547)

4.2.2 การใช้เอนไซม์ในการย่อย

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แต่องค์ประกอบที่สำคัญที่จะนำมาใช้ คือเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งทั้งสององค์ประกอบนี้มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน เซลลูโลสจะมีโครงสร้างที่เป็น กลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ β-1, 4-Glucosidic linkage เพราะฉะนั้นในการย่อยสลายเซลลูโลส จึงต้องใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ซึ่งจะประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วนดังนี้

Endoglucanase (1, 4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย β-1, 4-glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ Cello-oligosaccharide, Glucose, Cellobilose

Exoglucanase (1, 4-β-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ Cellobiose

β–Glucosidase (β-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย Cellobiose และ Cello-oligosaccharide ได้เป็นกลูโคส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดตรต่อ โปรตีนเท่ากับ 1 : 1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคเฟคเตอร์ หรือโลหะอื่น ในการเร่ง โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำ หรือ สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาผลิต (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) โดยเอนไซม์มีความคงทนต่อสารเคมีได้ดี มีเพียงอินออนของปรอทที่สามารถยับยั้งการทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนโลหะอื่นๆอย่างเช่น เงิน ทองแดง สังกะสี มีผลยับยั้งเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล, 2546)

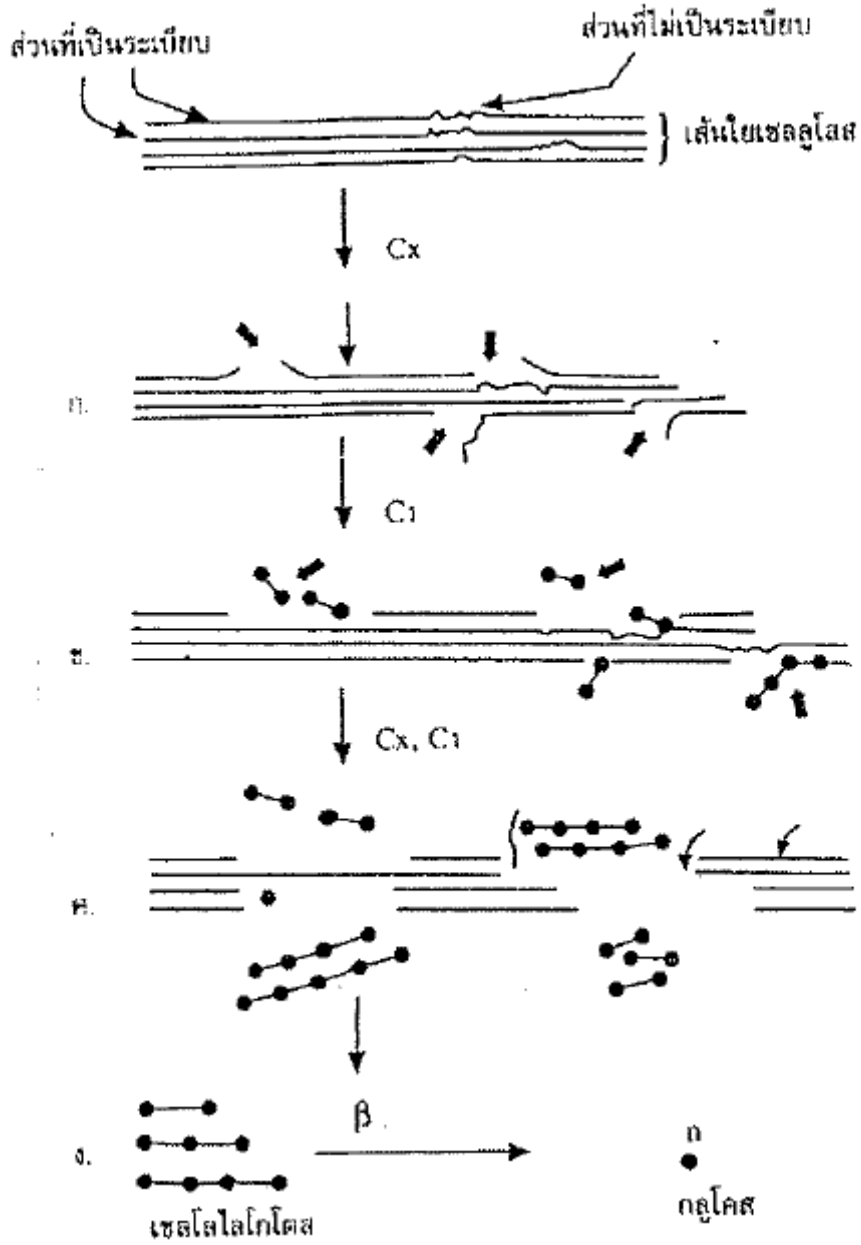
สำหรับขั้นตอนในการไฮโดรไลซีสจะมีอยู่ 3 ขั้นตอน 1) เกิดการแพร่ของเอนไซม์ในของเหลว 2) เกิดการเคลื่อนย้ายของเอนไซม์จากของเหลวไปที่ผิวหน้าของสารตั้งต้น และ 3) เกิดการดูดซับของเซลลูโลสเข้าไปหาเอนไซม์เกิดเป็น Enzyme-cellulose complex (Cao และ Tan, 2002) จากนั้นจะเกิดการย่อยสลายเซลลูโลส จะแสดงดังภาพที่ 15 โดย Petterson อ้างโดย วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล (2546) อธิบายว่า เส้นใยเซลลูโลสจะประกอบด้วย ส่วนที่เป็นระเบียบ และส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ เอนไซม์ Cx (Endoglucanase) เข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบตามภาพ ก. ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วงๆ เอนไซม์ C1 (Exoglucanase) เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมาตามภาพ ข. จากนั้นสายโซโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ Cx และ C1 ดังภาพ ค. และสายโซโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เบ้ตา-กลูโคซิเดส ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส ดังภาพ ง.

ในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา และประกอบด้วยโพลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิดด้วยกัน เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อที่จะสลาย แต่จากองค์ประกอบหลักของเซลลูโลสคือ ไซเลน ดังนั้นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

Endo-1,4-β-D-xylanase (1, 4-β-D-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) ทำหน้าที่ย่อยพันธะ 1, 4-glycosidic ของ β-D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซเลน ให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของ Xylo-oligosaccharide และ Xylobiose

Exo-1,4-β-D-xylosidase (1,4-β-D-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) ทำหน้าที่ย่อย Xylo-oligosaccharide และ Xylobiose ให้ผลิตภัณฑ์เป็น Xylose

นอกจากเอนไซม์ 2 กลุ่มใหญ่ๆแล้ว เพื่อให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิดได้แก่ เอนไซม์ L-arabinanase ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ (1->3) และ (1->5)-2-L-arabino-furanosyl ให้ผลิตผลเป็น L-arabinose เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นทั้ง Endo- และ Exo-arabinanase จะจำเพาะกับสารตั้งต้นที่อยู่ในรูป furanoside แต่ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นที่อยู่ในรูป pyranoside เอนไซม์ D-galactanase จะทำหน้าที่ย่อยสลายกลุ่ม D-galactan และ L-arabino-D-galactan เอนไซม์ D-mananase จะมีความสามารถในการย่อยสลาย (1->4)-β-D-mananopyranosyl linkage ของ D-mannan, D-gluco-D-mannan และ D-galacto-D-mannan เอนไซม์ Acetyl esterase จะทำหน้าที่ย่อยสลาย acetyl ที่เกาะอยู่ตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 และตัวที่ 3 ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลส (อารี กังแฮ, 2536)



ภาพที่ 15 กลไกลการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส

Figure 15 Machanism of cellulose hydrolysis by cellulase enzyme.

ที่มา : วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล (2546)

การใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซีสจะมีราคาต้นทุนต่ำกว่าการใช้กรด หรือเบสในการไฮโดรไลซีส เพราะสามารถที่จะทำในสภาวะกลางๆได้ (พีเอช 4.8 และ อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส) และไม่มีปัญหาเรื่องการกัดกร่อนเครื่องมือหรือถังปฏิกรณ์ (Duff และ Murray, 1996 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002)

สำหรับการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายนั้นจะต้องทราบปริมาณของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพราะในวัตถุดิบบางชนิดอาจจะมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อย จึงไม่จำเป็นที่จะต้องเติมเอนไซม์ที่ไปย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เพื่อเป็นการลดต้นทุน แต่สำหรับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่ต้องการ และมีอยู่มากจึงจำเป็นที่จะต้องเติมเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยเฉพาะเซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ส่วนประสิธิภาพในการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิดอย่างเช่น

1. ปริมาณเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และแหล่งที่มาของเอนไซม์

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเซลลูไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส ถ้าในเอนไซม์เซลลูเลสมีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่มาก จะทำให้ในระบบลดตัวยับยั้งเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucanase ส่งผลให้การไฮโดรไลซีสเกิดขึ้นได้ดี ซึ่งจากการเปรียบเทียบ การใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Chaetomium globosum* กับเอนไซม์ทางการค้าของ Umikalsom และคณะ (1998) ในการไฮโดรไลซีสทะลายปาล์มเปล่าที่เตรียมด้วยวิธี 2.0%NaOH/Soaking 30^{0}C/Autoclaving 121^{0}C, 15psi, 5min ผลปรากฏว่า การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์จากเชื้อ *Chaetomium globosum* จะให้น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลกลูโคส สูงกว่า การใช้เอนไซม์ทางการค้า เพราะว่าในเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Chaetomium globosum* มีปริมาณเบต้า-กลูโคซิเดส สูงกว่า และจากกการศึกษาของ Chen และคณะ (2006) ในการไฮโดรไลซีส corn cob ที่เตรียมด้วยวิธี 1%H_2SO_4/Boiling 108^{0}C, 3 hr ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ZU-02 โดยไม่เติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสผลปรากฏว่า ได้ Yield เพียง 67.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการไฮโดรไลซีสครั้งนี้พบว่า เกิดการสะสมของน้ำตาลเซลลูไบโอส จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ β-1,4-endoglucanase และ β-1,4-exoglucanase แต่เมื่อเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *Aspergillu niger* ZU-07 ลงไป สามารถที่จะเพิ่ม Yield ได้ถึง 83.9 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการเพิ่มเบต้า-กลูโคซิเดสเพียง 6.5 CBU/ g substrate

Hang และ Woodams (2001) ได้ทำการศึกษาการไฮโดรไลซีส corn cobs ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 3 ชนิด (Rapidase Pomalig, Celluclast 1.5L และ Clarex ML) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 ในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ชนิด Rapidase Pomalig ไฮโดรไลซีสได้น้ำตาลรีดิวส์มากกว่า Celluclast 1.5L และClarex ML โดย Rapidase Pomalig สามารถที่จะเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จาก 106 ± 8 กรัมต่อกิโลกรัม เป็น 550 ± 10 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จะเป็น ไซโลส กลูโคส อะราบิโนส และเซลลูไบโอส ปริมาณ 35, 45, 3 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากปริมาณเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ที่ทำให้การไฮโดรไลซีสสามารถเกิดขึ้นได้ดีแล้ว ชนิดของเอนไซม์เซลลูเลสจะมีผลต่อการไฮโดรไลซีสด้วย อย่างเช่นเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกันจะสามารถไฮโดรไลซีสวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แตกต่างกันซึ่งจากการรายงานของ Juhasz และคณะ (2005) เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma reesei* RUT C30 โดยใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (Solka floc, Spruce, Willow และ Corn strover) ไปทำการไฮโดรไลซีส พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันจะสามารถไฮโดรไลซีสได้ปริมาณที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากการใช้ Corn strover จะสามารถไฮโดรไลซีสได้ดีที่สุด และจากการศึกษาของ Liming และ Xueliang (2004) ได้ทำการไฮโดรไลซีส Corn cob residue ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ZU-02 โดยใช้ Corn cob residue เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถไฮโดรไลซีส Corn cob residue ได้ Yield ของการไฮโดรไลซีสถึง 90.4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เพียง 20 IU/g substrate และจากการเปรียบเทียบการไฮโดรไลซีส Diary manure ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากทางการค้า เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* และเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ผสมกับ *Aspergillus phoenicis* โดยใช้ Diary manure แหล่งคาร์บอน ปรากฏว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบผสม (*Trichoderma reesei* ผสมกับ *Aspergillus phoenicis*) มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ทางการค้า และเอนไซม์ที่ผลิตด้วยเชื้อ *Trichoderma reesei* เพียงชนิดเดียว (Wen และคณะ, 2005)

2. สภาวะในการทำงานของเอนไซม์

สภาวะต่างๆอย่างเช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณสารตั้งต้น จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ถ้าเอนไซม์อยู่ในที่เหมาะสมการไฮโดรไลซีสจะเกิดอย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาอุณหภูมิในการไฮโดรไลซีสใบอ้อยช่วง 35-65 องศาเซลเซียส ของ Krishna และคณะ (1998) พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องสาเซลเซียส การไฮโดรไลซีสเกิดขึ้นได้เร็ว และได้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 65 องศาเซลเซียส การไฮโดรไลซีสลดลง ส่วนอุณหภูมิต่ำว่า 50 องศาเซลเซียส (35-50 องศาเซลเซียส) การไฮโดรไลซีสจะเพิ่มขึ้นตามอุณภูมิที่เพิ่มขึ้น และจากการรายงานของของพรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ในการศึกษาอุณหภูมิในการไฮโดรไลซีสเหง้ามันสำปะหลังช่วง 35-60 องศาเซลเซียส ปรากฏว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีส เนื่องจาก ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ทั้งเอนไซม์ และสารตั้งต้นมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ทำให้การชนกันต่อหน่วยเวลาเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลง เนื่องจาก อุณภูมิ

สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสใบอ้อยช่วง 3.5-6.0 ของ Krishna และคณะ (1998) พบว่า ที่พีเอช 4.5 จะเป็นพีเอชที่ทำให้ เกิดการไฮโดรไลซีสได้มากที่สุด แต่จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสเหง้ามันสำปะหลังช่วง 4.0-6.0 ของ พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) พบว่า ที่พีเอช 4.8 จะเป็นพีเอชที่ให้ค่าการเปลี่ยนเหง้ามันสำปะหลังเป็นน้ำตาลรีดิวส์มากที่สุด เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างมีผลทำให้กรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น

ในการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสใบอ้อยช่วง 10-100 FPU/g substrate ของ Krishna และคณะ (1998) พบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 100 FPU/g substrate จะให้ปริมาณการไฮโดรไลซีสมากที่สุด แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์ตั้งแต่ 40-100 FPU/g substrate มีการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นเพียง 13 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งการใช้เอนไซม์ที่สูงจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการไฮโดรไลซีส ดั้งนั้นจึงเลือกให้ที่ 40 FPU/g subdtrate เป็นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีส และจากการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในช่วง 0.8-140 FPU/g substrate ของ พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) พบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 4.079 FPU/g substrate เป็นปริมาณที่เหมาะสม ในการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของเหง้ามันสำปะหลัง เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของเหง้ามันสำปะหลังมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากเกินจะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วในช่วงแรก จนกระทั้งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ปฏิกิริยาจึงหยุดจึงไม่มีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นอีก

ในการศึกษาปริมาณใบอ้อยที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสช่วง 2.5-25 เปอร์เซ็นต์ ของ Krishna และคณะ (1998) พบว่า ปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่จะทำให้การไฮโดรไลซีสมากที่สุด แต่ถ้าเพิ่มปริมาณส่ารตั้งต้นจาก 5 เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ การไฮโดรไลซีสจะจำกัด เพราะเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

Krishna และคณะ (1998) ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Trichoderma reesei* QM 9414 ประมาณ 40 FPU/g substrate ในการไฮโดรไลซีสใบอ้อยที่ทำการเตรียม Alkaline hydrogen peroxide (ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์) เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 92 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 ภายในเวลา 48 ชั่งโมง

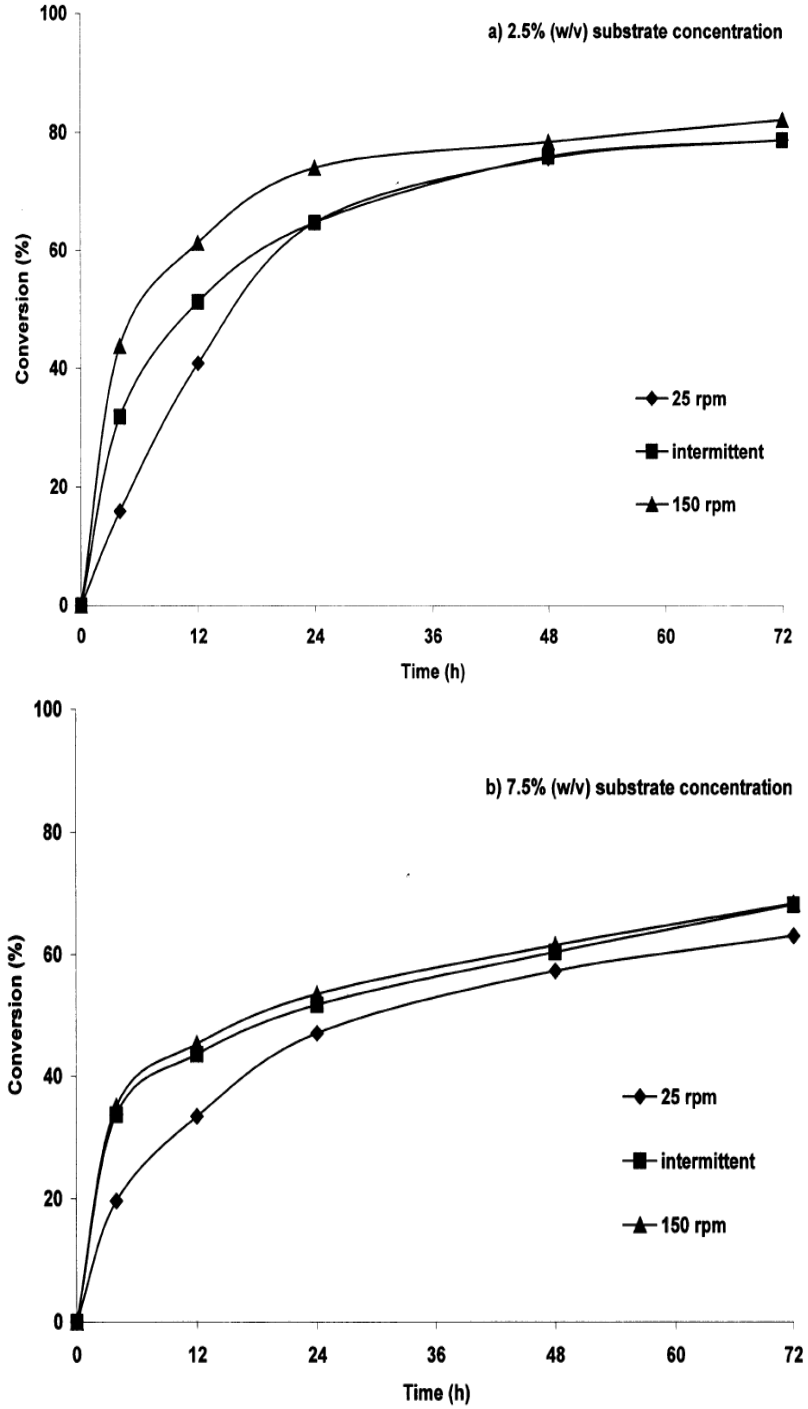
พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ทำการไฮโดรไลซีสเหง้ามันสำปะหลังที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 4.079 FPU/g substrate โดยใช้สภาวะที่

เหมาะสมที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 8.3 กรัมต่อลิตร และ Yield 21.62 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง

Srinorakutara และคณะ (2004) ไฮโดรไลซีสของเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่มี 11 เปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรต ด้วยเอนไซม์ผสม Cellulase และ Pectinase ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อด้วย α-amylase ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และสุดท้ายใช้ Glucoamylase ที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้เป็นน้ำตาล 122.4 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 7 ชั่วโมง Zhu และคณะ (2005c) ได้ศึกษาอัตราการไฮโดรไลซีสฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/water ด้วยเอนไซม์ โดยจะเปรียบเทียบการไฮโดรไลซีสแบบปกติ กับการไฮโดรไลซีสพร้อมกับให้ความร้อนด้วยไมโครเวปเป็นช่วงๆ ผลปรากฏว่า อัตราการไฮโดรไลซีสเริ่มต้น ด้วยวิธีการไฮโดรไลซีสพร้อมกับให้ความร้อนด้วยไมโครเวปเป็นช่วงๆเร็วกว่าเล็กน้อย เพราะวิธีนี้จะทำให้กิจกรรมของ CMCase กับ FPase เพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ Cellobiase ลดลง

Ingesson และคณะ (2001) กล่าวว่าในการไฮโดรไลซีสโดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (25, 100, 150 รอบต่อนาที) จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสุดท้ายเล็กน้อย (72 ชั่วโมง) แต่จะมีผลต่ออัตราการไฮโดรไลซีสเริ่มต้นมาก ดังภาพที่ 16a สำหรับอัตราการเขย่าสูงสุด (150 รอบต่อนาที) จะมีอัตราการไฮโดรไลซีสเริ่มต้นสูงสุด และมีการเปลี่ยนแปลงสุดท้ายมากสุด (82 เปอร์เซ็นต์) ตามด้วยอัตราการเขย่าปานกลาง และอัตราการเขย่าต่ำสุด (100 และ 25 รอบต่อนาที ตามลำดับ) และทั้งสองมีอัตราการไฮโดรไลซีสสุดท้ายเป็น 79 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16b) อัตราการไฮโดรไลซีสเริ่มต้น และการเปลี่ยนแปลงหลัง 72 ชั่วโมง ลดลงในทั้ง 3 อัตราการเขย่า สำหรับอัตราการเขย่าสูงสุด (150 รอบต่อนาที) และอัตราการเขย่าปานกลาง (100 รอบต่อนาที) จะมีการเปลี่ยนแปลงเท่ากันคือ 68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการเขย่าต่ำสุด 25 รอบต่อนาที จะมีการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่าเล็กน้อย (63 เปอร์เซ็นต์) จากข้อมูลข้างต้นจะอธิบายได้ว่า ปัจจัยของการเขย่าจะมีผลต่อการ Adsorption และ Desorption ทุกอัตราการเขย่าจะมีอัตราการ Adsorption เริ่มต้นอย่างรวดเร็ว ตามด้วยการ Desorption ของเอนไซม์ ซึ่งจะดำเนินอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดเวลา ปัจจัยนี้จะมีผลเป็นอย่ามาก ด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 150 รอบต่อนาที ซึ่ง 35 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์ที่เติมลงไปจะ adsorp ภายในเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนที่อัตราการเขย่า 25 รอบต่อนาที จะมีการดูดซับที่ต่ำกว่า



ภาพที่ 16 การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ของเซลลูโลสด้วยอัตราการเขย่าที่แตกต่างกัน (a) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (b) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Figure 16 Cellulose hydrolysis by cellulase at differences agitation (a) substrate concentration 2.5% (w/v) (b) substrate concentration 7.5% (w/v).

ที่มา : Ingesson และคณะ (2001)

3. ลักษณะของลิกโนเซลลูโลส หรือสารตั้งต้น (Moller, 2006)

3.1 ขนาดของอนุภาค หรือพื้นที่ผิวสำผัส

เอนไซม์จะสามารถเกิดการย่อยได้ก็ต่อเมื่อเอนไซม์สัมผัสกับสารตั้งต้น ถ้าทำให้สารตั้งต้นมีขนาดเล็กลง หรือมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อน้ำหนักสูงขึ้น จะทำให้เอนไซม์สามารถดูดซับ หรือสัมผัสกับสารตั้งต้นได้มากขึ้น นำไปสู่ การเกิดไฮโดรไลซีสเร็วขึ้น และเพิ่มขึ้น อย่างเช่น ในการการเตรียมสารตั้งต้นที่เป็นไม้ พบว่า อัตราการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นด้วยการลดขนาดของอนุภาค และการเตรียมยังเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสารตั้งต้นซึ่งจะนำไปสู่การไฮโดรไลซีสได้ดี Wen และคณะ, (2004) รายงานว่าในการลดขนาดของ animal manure จาก 840-590 ไมโครเมตร เป็น 590-350 ไมโครเมตร จะเพิ่ม glucose yield 29 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตาม การลดขนาดต่ำกว่า 590 ไมโครเมตร จะทำให้ Glucose yield ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (Wen และคณะ, 2004)

3.2 ความเป็นผลึกของเซลลูโลส

เซลลูโลสในส่วนที่เป็นผลึกจะมีความแข็งแรง และต้านทานต่อการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ โดยในการไฮโดรไลซีสนั้น ส่วนที่ไม่เป็นผลึกจะไฮโดรไลซีสก่อน ตามด้วยส่วนที่เป็นผลึก ซึ่งจะไฮโดรไลซีสได้ช้า และเพียงเล็กน้อย (Mansfield และคณะ 1999 อ้างโดย Moller, 2006) มีการรายว่า ถ้าระดับความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น จะทำให้ อัตราการไฮโดรไลซีสลดลง (Sangseethong และคณะ 1998 อ้างโดย Moller, 2006) จากการศึกษา การทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucanase ด้วยการนำไปไฮโดรไลซีสเซลลูโลสของ alfalfa ผลปรากฏว่า เอนไซม์ Endoglucanase สามารถที่จะละลายเซลลูโลสของ alfalfa ได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงหรือลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส ส่วนเอนไซม์ Exoglucanase สามารถที่ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสใน alfalfa ได้ 34 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดรวมกันสามารถที่จะลดความเป็นผลึกได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Bae และคณะ, 2004) บ่งบอกได้ว่าเอนไซม์ Endoglucanase จะทำปฏิกิริยาการไฮโดรไลซีสในส่วนของเซลลูโลสที่ไม่เป็นผลึกเป็นหลัก ส่วนเอนไซม์ Exoglucanase หรือ Cellobiohydrolase จะย่อยที่ปลายสายของเซลลูโลส และจำเพาะกับส่วนที่เป็นผลึก (Carrard และคณะ, 2000)

3.3 ความเป็นพอลิเมอร์

ระดับของการเป็นพอลิเมอร์จะมาก หรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของ glucosyl ที่มีอยู่ในสายเซลลูโลส (Mansfield และคณะ 1999 อ้างโดย Moller, 2006) ดังนั้นวัตถุดิบที่มีระดับความเป็น

พอลิเมอร์ต่ำจะมีปลายสายเซลลูโลสมาก ซึ่งระดับความเป็นพอลิเมอร์จะขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นแต่ละชนิด และผลจากการเตรียมด้วยวิธีต่างๆ Cao และ Tan (2002) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Cellulase, Endoglucanase และ Cellobiohydrolase ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นโพลิเมอร์ของเซลลูโลส ผลปรากฏว่า Cellulase และ Endoglucanase สามารถที่จะลดความเป็นโพลิเมอร์ของเซลลูโลสได้ดี และได้มากกว่า Cellobiohydrolase ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าเอนไซม์ Cellobiohydrolase จะสลายเซลลูโลสที่ปลายสายของโพลิเมอร์ ทำให้สามารถลดระดับการเป็นโพลิเมอร์ของเซลลูโลสได้น้อย ส่วน Endoglucanase จะตัดสายอย่างอิสระภายในสาย

3.4 Cellulose reactivity

จากการรายงานของ Yang และคณะ (2006 อ้างโดย Moller, 2006) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการไฮโดรไลซีส Avicel cellulose ด้วยเอนไซม์ พบว่าอัตราการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสจะเกิดขึ้นช้าลงเมื่อใช้ระยะเวลานานขึ้น เขาสันนิฐานว่า สารตั้งต้นมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการไฮโดรไลซีส ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสไม่สามารถทำงานได้ หรืออาจจะเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น หรือเกิดจากเอนไซม์เป็นตัวที่ปิดกั้นที่ผิวหน้าของสารตั้งต้น จากนั้นเขาจึงได้ทำความสะอาดที่ผิวหน้าของเซลลูโลสหลังจากไฮโดรไลซีสเป็นระยะเวลาต่างๆด้วยเอนไซม์โปรติเอส แล้วเริ่มไฮโดรไลซีส ด้วยการเติมเอนไซม์เซลลูเลสใหม่ ทำให้การไฮโดรไลซีสเกิดขึ้นได้สูงอีกครั้ง จึงสรุปได้ว่า substrate reactivity ไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการไฮโดรไลซีส แต่ผิวหน้าของสารตั้งต้นจะถูกปิดกั้นด้วยเอนไซม์

3.5 ปริมาณลิกนิน

ปริมาณลิกนินในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นสิ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสลดลง โดยลิกนินจะป้องกันไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับพอลิเมอร์ของน้ำตาล การแยกลิกนินออกจากเซลลูโลสระหว่างการเตรียมเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้น แต่ลิกนินจะไม่แยกออกทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ สภาวะการเตรียมที่มีความรุนแรงปานกลางจะเหลือลิกนินปริมาณสูง จะทำให้การสัมผัสระหว่างเอนไซม์เซลลูเลส กับเซลลูโลสได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเตรียมที่มีความรุนแรง ซึ่งมีการสัมผัสได้มากกว่า แต่จะเหลือปริมาณเฮมิเซลลูโลสน้อย (Lu และคณะ, 2002)

Lu และคณะ (2002) ได้ศึกษาการไฮโดรไลซีสของ DF ด้วยเอนไซม์ในช่วง 10-120 FPU/g cellulose ผลปรากฏว่าปริมาณเอนไซม์ 60 FPU/g cellulose จะไฮโดรไลซีสได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 72 ชั่วโมง และที่ 120 FPU/g cellulose ไม่สามารถจะไฮโดรไลซีสได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนที่ปริมาณเอนไซม์ 10-20 FPU/g cellulose การเปลี่ยนแปลง

น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าสารตั้งต้นมีความต้านทานจากลิกนิน ซึ่งในสารตั้งต้นเหลือปริมาณลิกนินมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

3.6 Degree of O-acetylation

ระดับ O-acetylation ได้มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับผลของการไฮโดรไลซีส ซึ่งหมู่ของ acetyl จะกีดขว้างการไฮโดรไลซีสของเอนไซม์

Pan และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของ acetyl ต่อการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสของเอนไซม์เซลลูเลส ผลปรากฏว่า acetyl group จะยับยั้งเอนไซม์โดยการขัดขวางการเกิดพันธะระหว่างเซลลูโลส กับ Catalytic domain of cellulase

Pan และคณะ (2006) รายงานว่าถ้าในเซลลูโลสมีปริมาณ acetyl อยู่ 40.4 เปอร์เซ็นต์ การไฮโดรไลซีสจะหยุดอย่างสมบูรณ์เมื่อไฮโดรไลซีสได้เพียงแค่ 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่การไฮโดรไลซีสจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปริมาณ acetyl ลดลงเหลือ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อในเซลลูโลสไม่มีหมู่ acetyl การไฮโดรไลซีสจะสมบูรณ์ (100 เปอร์เซ็นต์) ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น แสดงให้เห็นว่า acetyl group เป็นตัวยับยั้งที่สำคัญมากในการไฮโดรไลซีสเซลลูโลส แต่หมู่ acetyl group สามารถที่จะสลายออกไปโดยการ saponification ด้วยสภาวะการใช้เบสเจือจางที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

4.2.3 การผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จะมีทั้งพวกที่ใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน พวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และชอบอุณหภูมิสูง ตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างเช่น *Clostridium, Cellulomonase, Bacillus, Thermomonospora, Ruminococcus, Bacteriodes, Erwinia, Acetovibrio, Microbispora* และ *Streptomyces* (Bisaria, 1991 อ้างโดย Sun and Cheng, 2002) เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนอย่างเช่น *Clostridium thermocellum* และ *Bacteroide cellulosolvens* จะมีความจำเพาะสูง แต่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อยเพราะมีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่ต่ำมาก (Duff และ Murray, 1996 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002)

สำหรับเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเช่น *Sclerotium rolfsii, Pichia chrysosporium*, *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Schizophyllum* sp. และ *Penicillium* sp. โดยเฉพาะในสายพันธุ์ของ *Trichoderma reesei* มีการศึกษาในการนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอย่างกว้างขวาง และในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนมากจะใช้เชื้อชนิดนี้ในการผลิต

เอนไซม์ เชื้อ *Trichoderma reesei* สามารถที่จะใช้สารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ได้มากมาย อย่างเช่น ต้นสน ต้นหลิว กากต้นข้าวโพด และสามารถที่จะผลิตเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสได้ดี (Sternberg, 1976 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนั้นยังสามารถที่ผลิตเอนไซม์อื่นๆได้ อย่างเช่น กลุ่ม Hemicellulase (Xylanase, Mannase, Arabinosidase) เป็นต้น

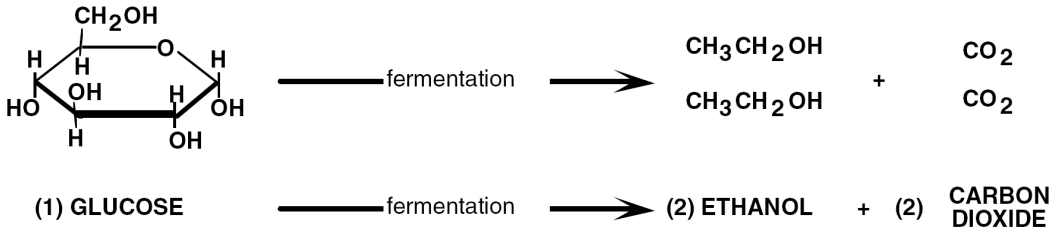
Umikalsom และคณะ (1997) ได้เปรียบเทียบการผลิตเซลลูเลสจากทะลายปาล์มที่ไม่ได้ทำการเตรียมด้วยวิธีทางเคมีขนาด 2 มิลลิเมตร กับทะลายปาล์มขนาด 10 มิลลิเมตร ด้วยเชื้อ *Chaetomium globosum* Kunze ผลปรากฏว่าทะลายปาล์มขนาด 2 มิลลิเมตร สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้มากกว่าทะลายปาล์มขนาด 10 มิลลิเมตร ปริมาณสองเท่า และเมื่อนำทะลายปาล์มขนาด 2 มิลิเมตรไปทำการเตรียมด้วยวิธีแช่ในสารละลายกรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วนำไปหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อชนิดเดิม พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ FPase ได้ 0.95 ± 0.3 U/ml และ β-glucosidase 7.60 ± 0.12 U/ml ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนปริมาณเอนไซม์ β-glucosidase กับ FPase จะมีค่าเท่ากับ 8

4.3 กระบวนการหมักเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส

ในกระบวนการผลิตเอทานอล กระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังสมการ

น้ำตาล + ยีสต์ ⟶ เอทานอล + คาร์บอนไดออกไซด์ + พลังงาน

Murphy และ McCarthy (2005) ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเอทานอล จากน้ำตาลแต่ละประเภทว่า น้ำตาลแต่ละประเภทเมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอลจะได้ปริมาณเอทานอลและผลผลิตอื่นๆที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอล จะได้เอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ดังภาพที่ 17

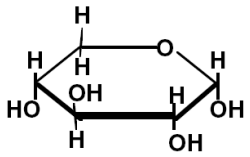


ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

Figure 17 Conversion of glucose to ethanol.

ที่มา : Murphy และ McCarthy (2005)

ส่วนน้ำตาล Xylose เมื่อนำมาหมักจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำออกมาด้วย ส่วนเอทานอลจะได้ในปริมาณที่ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสภาวะ และสายพันธ์เชื้อที่ใช้ ดังภาพที่ 18



$$CH_3CH_2OH + CO_2 + H_2O$$

XYLOSE — fermentation → ETHANOL + CARBON DIOXIDE + WATER

3 Xylose — fermentation → 5 Ethanol + 5 Carbon Dioxide

3 Xylose — fermentation → 4 Ethanol + 7 Carbon Dioxide

3 Xylose — fermentation → 2 Ethanol + 1 Carbon Dioxide + 1 Water

ภาพที่ 18 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล

Figure 18 Conversion of xylose to ethanol.

ที่มา : Murphy และ McCarthy (2005)

นอกจากน้ำตาล Glucose และ Xylose แล้วยังมีน้ำตาล Fructose ที่สามารถจะหมักเป็นเอทานอล ซึ่งน้ำตาล Fructose เกิดจากการไฮโดรไลซีสน้ำตาล Sucrose (ภาพที่ 19) น้ำตาล Fructose จะมีสูตรโมเลกุลเหมือนกับ Glucose แต่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการหมักน้ำตาล Fructose 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนได้เอทานอลเหมือนกับน้ำตาล Glucose

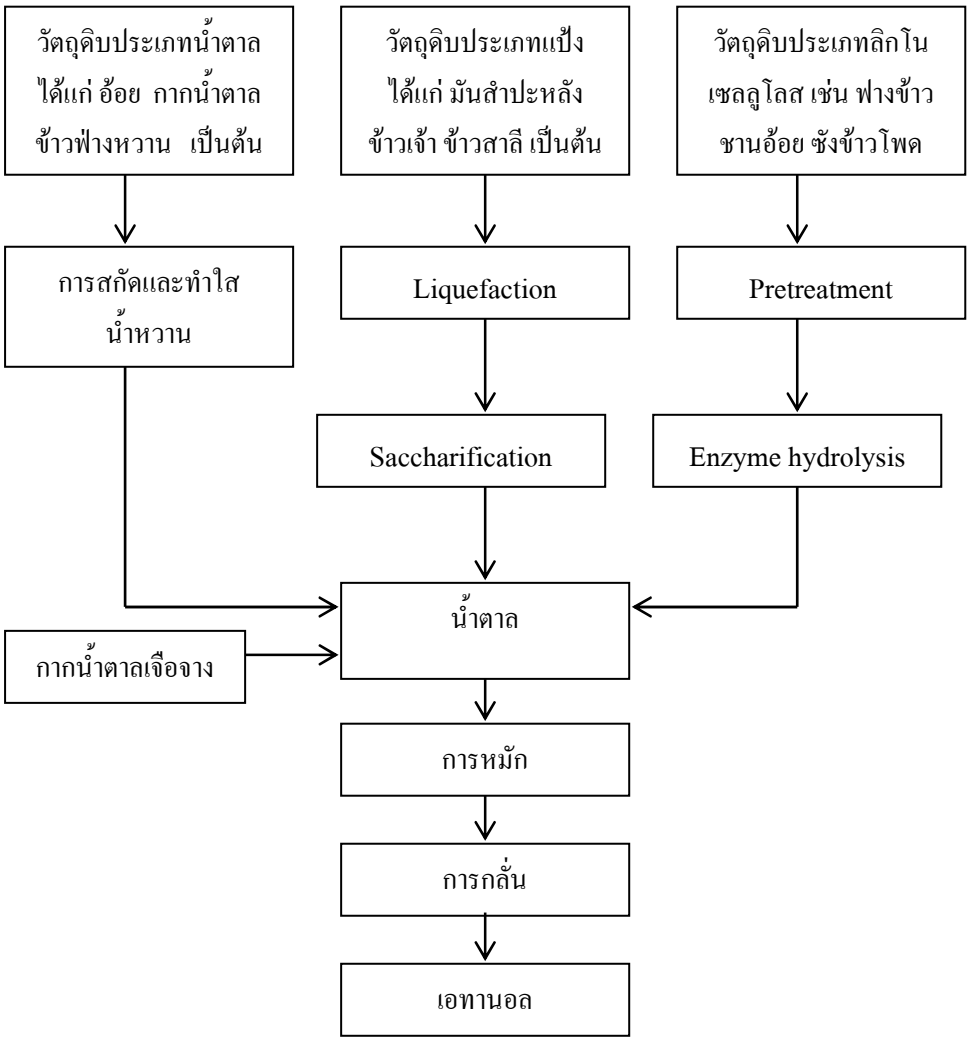
เอทานอลผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิดแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส วัตถุดิบประเภทแป้ง วัตถุดิบประเภทน้ำตาล โดยที่วัตถุดิบประเภทน้ำตาลสามารถที่จะหมักเป็นเอทานอลได้เลย ส่วนวัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลส จะต้องย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนแล้วจึงหมักเป็นเอทานอลได้ ดังภาพที่ 20

Sucrose	+Water	→	Glucose	+	Fructose
$C_{12}H_{22}O_{11}$	$+H_2O$	→	$C_6H_{12}O_6$	+	$C_6H_{12}O_6$
Molecular weights: 342	+18	→	180	+	180

ภาพที่ 19 การไฮโดรไลซีสน้ำตาลซูโคส

Figure 19 Sucrose hydrolysis.

ที่มา : Murphy และ McCarthy (2005)



ภาพที่ 20 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบต่างๆ

Figure 20 Ethanol productions from difference materials.

ที่มา : เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ (2548)

สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลนั้นมีหลายชนิด อย่างเช่น *Saccaromyces cerevisiae, Zymomonas mobis, Kluyveromyces marxianus* เป็นต้น ระบบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจะมีทั้งระบบต่อเนื่อง และระบบครั้งคราว แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้แบบครั้งคราว อุณหภูมิที่ใช้หมักโดยทั่วไปประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าการหมักเครื่องดื่ม การหมักที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ใช้ระยะเวลาการหมักน้อยลง จึงช่วยลดต้นทุนการผลิต (สมใจ ศิริโภค, 2544)

ระวีวรรณ แกล้วกล้า (2538 อ้างโดย พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5013 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาล

รีดิวส์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จะได้เอทานอลเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการไฮโดรไลซีสเหง้ามันสำปะหลัง ด้วยเชื้อ *Zymomonas mobilis* strain TISTR 405 โดยใช้น้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 ภายในเวลา 60 ชั่วโมง จะได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร และYield 69.84 เปอร์เซ็นต์

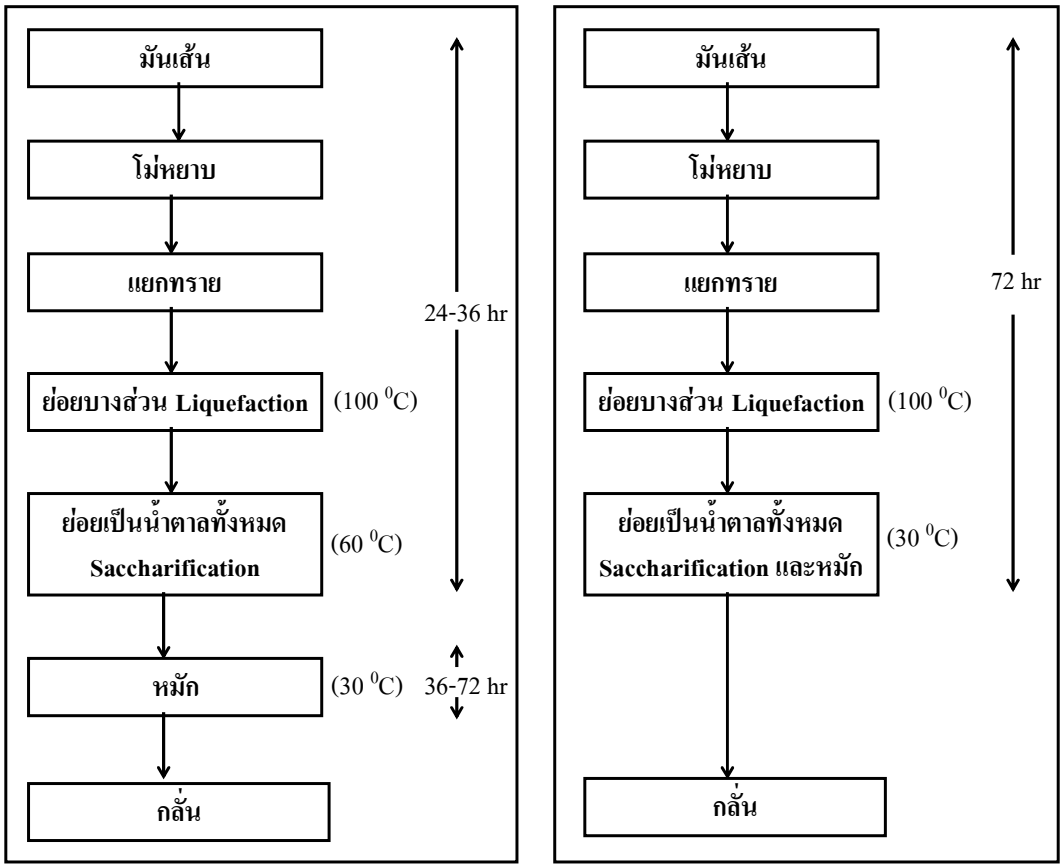
Srinorakutara และคณะ (2004) ได้ผลิตเอทานอลจากของเสียของโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งในขั้นตอนแรกทำการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ได้ปริมาณน้ำตาล 122.4 กรัมต่อลิตร ต่อจากนั้นหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 10 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นเชื้อ 1x 10^7 CFU/mL ใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 3.84 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 36 ชั่วโมง แต่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ได้เอทานอล 3.62 เปอร์เซ็นต์

Chen และคณะ (2007) ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ของ corn cob ที่เตรียมด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเชื้อ *Saccharomyces ceresiae* 316 โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 95.3 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 45.7 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลาเพียง 18 ชั่วโมง

5. การผลิตเอทานอลแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพ โดยการรวมการย่อย หรือการไฮโดรไลซีสไว้ในขั้นตอนเดียวกับการหมัก หรือที่เรียกว่า Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ (2548) ได้เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากมันเส้นระหว่างวิธีปกติ และวิธีการใช้ SSF ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 การผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวนการผลิต (a) แบบปกติ และ (b) แบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

Figure 21 Ethanol productions from cassava strarch by (a) Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and (b) Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

ที่มา : เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ (2548)

สำหรับข้อได้เปรียบของการหมักแบบ SSF คือสามารถเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซีสได้ เพราะสามารถเปลี่ยนแปลงน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอทานอลได้เลย ซึ่งจะเป็นการลดตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ใช้เอนไซม์ในปริมาณที่น้อยลง ใช้อุปกรณ์ หรือถังในการผลิตเอทานอลน้อยลง เพราะรวมถังในขั้นตอนการไฮโดรไลซีส กับถังในกระบวนการหมักเป็นถังเดียวกัน ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง และได้ Yield ในปริมาณที่สูงขึ้น แต่มีข้อเสียคืออุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ กับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักด้วยเชื้อแตกต่างกัน จุลินทรีย์ทนปริมาณเอทานอลได้ต่ำ และเอทานอลจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Sun และ Cheng, 2002)

Sreenath และคณะ (2001) ได้เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลแบบ SHF กับ SSF โดยใช้เชื้อ *Candida shehatae* FPL-702 ปรากฏว่าในระบบ SHF สามารถผลิตเอทานอลได้ 5.0 กรัมต่อลิตร ส่วนระบบ SSF ผลิตได้ 6.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ alfalfa fiber ที่ไม่ได้ทำการเตรียม และเมื่อใช้ alfafa fiber ที่เตรียมด้วยวิธี liquid hot water (LHW) จะได้ผลเช่นเดียวกันโดยระบบ SSF สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าในระบบ SHF แต่สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น 18.0 กรัมต่อลิตร ด้วยระบบ SSF ส่วนระบบ SHF ผลิตเอทานอลได้ 9.6 กรัมต่อลิตร

Ohgren และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจาก corn strover ที่ได้ทำการเตรียมด้วยวิธี stream pretreatment ด้วยระบบ SSF โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ผลปรากฏว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ 25 กรัมต่อลิตร ด้วยความเข้มข้นของ water-insoluble solid (WIS) 10 เปอร์เซ็นต์ และในปีเดียวกัน Ohgren และคณะ (2007) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยที่มีการไฮโดรไลซีสก่อนเข้าระบบ SSF และ การผลิตเอทานอลโดยเข้าระบบ SSF อย่างเดียว ผลปรากฏว่าการผลิตเอทานอลโดยใช้ระบบ SSF อย่างเดียวให้ผลดีกว่า

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ระบบ SSF

6.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักมีผลต่อสรีระวิทยาของเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อการใช้น้ำตาล โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการใช้น้ำตาลจะลดลงเนื่องจากการดูดซึมไนโตรเจนลดลง (Reiser, 1954 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) Nagodawithana และคณะ (1974 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) พบว่ายีสต์จะมีการรอดชีวิตต่ำลงเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้น เป็นเพราะยิ่งอุณหภูมิสูงขึ้นจะเกิดการสะสมเอทานอลในเซลล์มากขึ้นซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ และอุณหภูมิสูงทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไปด้วยส่งผลให้การทำงานเสียไป (Lucero และคณะ, 2000 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

Piper (1993 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) พบว่าสภาวะเครียดที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง และสภาวะที่อุณหภูมิการหมักเพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อเซลล์เหมือนกันโดยมีผลต่อระดับโปรตีน Hsp30 (heat shock protein 30) ในเยื่อหุ้มเซลล์ และTorija และคณะ (2003 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) พบว่าเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นจะมีการสร้างสารเมแทบอไลต์อื่น ๆ เช่น กลีเซอรอล, ซัคซิเนท, กรดอะซีติก และอะซิตัลดีไฮด์ เพิ่มขึ้นเป็นต้นทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง

สำหรับการเจริญและการหมักเอทานอลมีความแตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เช่น ยีสต์สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic strain) จะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิช่วง 28-35 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) จะมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) สำหรับการเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส

ในการหมักเอทานอลพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่าสำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส และการเมแทบอลิซึมของยีสต์ในที่ที่มีออกซิเจนจะเบนไปในทางการหมักเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 38 องศาเซลเซียส เนื่องจากเกิดการยับยั้งเอนไซม์ที่สำคัญในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวทและเอทานอล (สาวิตรี, 2540 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส อัตราการหมักจะค่อยๆลดลง จนเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 43 องศาเซลเซียส การหมักเกือบไม่เกิดขึ้นเลย (Paul, 1980 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

เพราะฉะนั้นในระบบ SSF อุณหภูมิ เป็นตัวหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญ เพราะอุณหภูมิในการไฮโดรไลซีส สารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาล กับอุณหภูมิการหมักเพื่อให้เปลี่ยนแปลงเป็นเอทานอลนั้นจะมีที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการรายงานของ Castellanos และคณะ (1995) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ 50-55 องศาเซลเซียส ส่วน Duff และ Murray (1996 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) ได้รายงานช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45-50 องศาเซลเซียส

Krishna และคณะ (1998) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลสคือ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 65 องศาเซลเซียส จะเป็นสภาวะที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ส่วนอุณหภูมิในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส อัตราการเปลี่ยนเป็นน้ำตาล หรือการไฮโดรไลซีสลดลงเล็กน้อย

Kadar และคณะ (2004) ได้รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส และเชื้อ *Saccharomyces cerivisiae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 35 องศาเซลเซียส

ดังนั้นในระบบ SSF ซึ่งเป็นการรวมขั้นตอนการไฮโดรไลซีสไว้ในขั้นตอนเดียวกับการหมัก การคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการผลิตเอทานอล

Krishna และคณะ (1998) พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลในระบบ SSF ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้เพิ่มการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแต่การหมักเป็นเอทานอลจะลดลง

Zhu และคณะ (2005a) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการหมักแบบ SSF ภายในช่วงอุณหภูมิ 35–45 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

6.2 พีเอช

จากการรายงานของ Castellanos และคณะ (1995) ช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสคือ 4.5-5.0 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์ หรือการหมักเอทานอลจากการรายงานของ Krishna และคณะ (1998) จะอยู่ในช่วง 5.0-5.5

จากการรายงานช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ และพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต หรือการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลนั้น จะมีช่วงพีเอชที่ใกล้เคียงกัน แต่การหาพีเอชที่เหมาะสมในหมักเอทานอลแบบ SSF ก็เป็นส่วนที่สำคัญที่จะทำให้การผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือได้ Yield ในการผลิตเพิ่มขึ้น

Zhu และคณะ (2005a) ได้ตรวจสอบหาพีเอชที่เหมาะสมของการหมักแบบ SSF ภายในช่วง พีเอชระหว่าง 4.8–5.8 ปรากฏว่าที่พีเอช 5.3 เป็นพีเอชที่เหมาะสม

6.3 สายพันธุ์จุลินทรีย์

ระบบ SSF มีข้อได้เปรียบในทางเศรษฐศาสตร์ และเป็นการลดตัวยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการไฮโดรไลซีสด้วยโดยเฉพาะน้ำตาลรีดิวส์ แต่จะมีปัญหาเรื่องอุณหภูมิที่เหมาะสม เพราะว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่างการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ กับการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักจะอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้การเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลจะลดลง หรือบางสายพันธุ์จะหยุการเจริญเติบโตและตายได้ ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮโดรไลซีสจะอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำอัตราการไฮโดรไลซีสก็ต่ำด้วย ดังนั้นในการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระบบ SSF จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งจุลินทรีย์ที่จะใช้จะต้องสามารถที่จะเจริญ และผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง

สำหรับเชื้อ *Saccharomyces cerivisiae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 30 องศาเซลเซียส แต่สามารถที่จะเจริญ และผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Kadar และคณะ , 2004)

Ballesteros และคณะ (1991 อ้างโดย Kadar และคณะ., 2004) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์ *Saccharomyces*, *Candida* และ *Kluyveromyces* ในการหมักกลูโคสที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองสอดคล้องกับงานของ Szczodrak และ Targonski (1988 อ้างโดย Kadar และคณะ, 2004) ซึ่งพบว่า *Saccharomyces* และ *Candida* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้น้อยกว่า *Kluyveromyces* และเมื่อ *K.marxianus* L.G. ถูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น จะได้รับปริมาณเอทานอล 37.6 กรัมต่อลิตร ด้วยการเปลี่ยนแปลงเอทานอล 0.4 g ethanol/g glucose และเมื่อทำการทดลองผลิตเอทานอลโดยใช้ Solka Floc Cellulose 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตั้งต้น และใช้เชื้อ *K marxianus* L.G. และ *F.fargilis* L.G. ที่อุณหภูมิสูงกว่า 42 องศาเซลเซียส เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล พบว่า ได้ปริมาณเอทานอล 0.5 และ 0.46 g ethanol/g cellulose ตามลำดับ การผลิตเอทานอลจะลดลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพราะเซลล์ตาย

Kadar และคณะ (2004) ได้ทำการผลิตเอทานอลโดยใช้ระบบ SSF ซึ่งใช้ของเสียจากการอุตสาหกรรมเป็นสารตั้งต้นได้แก่ Old Corrugated carboard (OOC) และ Paper sludge และใช้ยีสต์สองสายพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบกัน คือ *S.cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมขนมปังโดยทั่วไป และ *K.marxianus* ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิสูง สรุปได้ว่า *S. cerevisiae* มีประสิทธิภาพดีเหมือนกับ *K. marxianus* ในการหมักแบบ SSF ที่ 40 องศาเซลเซียส และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลลูโลสจะอยู่ในช่วง 55-60 เปอร์เซ็นต์ ได้ Yield 0.30-0.34 g ethanol/g glucose

นอกจากนี้ การเลือกใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลยังขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ เนื่องจาก จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดได้แตกต่างกันเช่น *S.cerevisiae* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ดี แต่ไม่สามารถที่จะใช้ Xylose ได้ ส่วนเชื้อ *Zymomonas mobilis* จะมีความสามารถในการใช้น้ำตาล Xylose ได้

Zhu และคณะ (2005a) ได้ทำการหมักโดยใช้เชื้อ *S.cerevisiae* YC-097 เพียงชนิดเดียว ทำให้การเปลี่ยนแปลงในการหมักมีการใช้แต่น้ำตาลกลูโคสเท่านั้น ส่วนน้ำตาล Xylose จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นไม่ลดลงแสดงให้เห็นว่าเชื้อไม่มีความสามารถที่จะใช้น้ำตาล Xylose

Krishna และคณะ (2001) ได้ทำการผลิตเอทานอลโดยใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมคือ Sugar cane leaves และ *Antigonum leptopus* leaves โดยใช้ *Trichoderma reesei* cellulase และ

เปรียบเทียบยีสต์สองสายพันธุ์คือ *S.cerevisiae* NRRl-Y-132 และ *K.fragilis* NCM 3358 ปรากฏว่า *K fragilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ 2.5-3.5 เปอร์เซ็นต์ และ *S.cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ 2.0-2.5 เปอร์เซ็นต์

Delgenes และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารผสมระหว่าง Glucose และ Xylose ด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบผสมระหว่าง *S.cerivisiae* CBS 1200 กับ *Pichia stipitis* NRRL พบว่าเอทานอลถูกผลิตด้วยอัตราเร็ว 2.9 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น 94 เปอร์เซ็นต์

Ingram และ Doran (1995) ได้ตัดต่อพันธุกรรมโดยการรวมสายพันธุ์ของแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* or *Klebsiella oxytoca* or *Erwinia* sp.) กับยีนในการผลิตเอทานอลจาก *Z.mobilis* (pdc และ adh) ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลทั้งของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้ และเมื่อใช้สายพันธุ์นี้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ผลึกของเซลลูโลส (Sigmacell 50, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) เป็นสารตั้งต้นจะสามารถผลิตเอทานอลได้ 47 กรัมต่อลิตร และYield 0.48 g ethanol/g cellulose ในเวลา 144 ชั่วโมง

Latif และ Rajoka (2001) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจาก corn cob โดยใช้ยีสต์สองชนิดคือ *S.cerevisiae* และ *Candida tropicalis* และการหมักแบบรวมเชื้อทั้งสองชนิดด้วยวิธีแบบ SSF (ปริมาณสารตั้งต้น 5-20 เปอร์เซ็นต์) ผลปรากฏว่าจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 27, 23 และ 21 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *S.cerevisiae* และ *C.tropicalis* และการหมักแบบรวมเชื้อทั้งสองชนิดตามลำดับ หลังจากเวลา 96 ชั่วโมง ด้วยการใช้ปริมาณ corn cob 200 กรัมต่อลิตร

6.4 สารตั้งต้น

ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อ Yield และอัตราการไฮโดรไลซีส ถ้าความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นจะทำให้ Yield และอัตราการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากๆ อาจเป็นตัวยับยั้งได้ (Cheung และ Anderson, 1997 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002)

Huang และ Penner (1991 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) พบว่าการยับยั้งจากสารตั้งต้นเกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วนของสารตั้งต้น (microcrystalline substrate Avicel) กับเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase from *Trichoderma reesei*) มากกว่า 5 g cellulose/FPU enzyme

Penner และ Liaw (1994 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002) พบว่าอัตราส่วนความเหมาะสมของสารตั้งต้นกับเอนไซม์เป็น 1.25 g microcrystalline substrate Avicel ต่อ FPU cellulase จาก *Trichoderma reesei*

Ballesteros และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เป็นลิกโนเซลลูโลสหลากหลายชนิด ได้แก่ poplar, eucalyptus, wheat straw sweet sorghum bagasse และ herbaceous residue ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์เซลลูเลส 15 FPU/g substrate และใช้เชื้อ *K.marxianus* CECT 10875 ในการหมักที่ 42 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 16-19 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 72-82 ชั่วโมง โดยที่ poplar จะให้ ethanol yield มากที่สุด (71.2 เปอร์เซ็นต์)

Zhu และคณะ (2005b) ได้ศึกษาความเข้มข้นของฟางข้าวที่เหมาะสมในช่วง 60–100 กรัมต่อลิตร ปรากฏว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 25.8 กรัมต่อลิตร จากนั้น Ohgren และคณะ (2007) สามารถผลิตเอทานอลโดยใช้ความเข้มข้นของ corn strover เริ่มต้นถึง 115 กรัมต่อลิตร ด้วยยีสต์ขนมปัง 1.8 กรัมต่อลิตร จะผลิตเอทานอลได้ถึง 33.8 กรัมต่อลิตร

นอกจากนั้นความอ่อนนุ่ม ความแข็งแรง โครงสร้างซึ่งรวมถึงความเป็นผลึก ระดับการต่อเป็นโพลีเมอร์ พื้นที่ผิว และองค์ประกอบของสารตั้งต้น จะเป็นตัวหนึ่งที่จะกำหนด Yield และอัตราการไฮโดรไลซีส อย่างเช่นลิกนินจะขัดขวางทางเข้าของเอนไซม์เซลลูเลสสู่เซลลูโลส และสร้างพันธะกับเอนไซม์ที่ไม่สามารถผันกลับได้อีก ดังนั้นถ้าเอาลิกนินออกจะสามารถเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซีสได้ (McMillan, 1994 อ้างโดย Sun และ Cheng, 2002)

6.5 เอนไซม์

ปริมาณ และชนิดของเอนไซม์ที่เติมเข้าไปเพื่อทำการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวเป็นส่วนสำคัญในการใช้ระบบ SSF เพื่อผลิตเอทานอล การเติมเอนไซม์ปริมาณมากจะทำให้อัตราการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้น แต่เป็นการเพิ่มต้นทุนของการผลิต ถ้าใช้เอนไซม์น้อยเกินไปก็จะทำให้การผลิตเอทานอลเกิดขึ้นช้าและน้อย ในส่วนของชนิดเอนไซม์ที่เติมเข้าไปก็ต้องมีความจำเพาะเจาะจง และมีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซีส อย่างเช่นการเติม β-Glucosidase เข้าไปผสมกับเอนไซม์เซลลูเลส จะทำให้เกิดการไฮโดรไลซีสเป็นน้ำตาลได้ดีกว่าระบบที่มีแต่เซลลูเลสอย่างเดียว เพราะว่าเอนไซม์ β-Glucosidase จะไฮโดรไลซีส Cellobilose ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลส (Sun และ Cheng, 2002)

Srinorakutara และคณะ (2004) ได้ใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซีสของเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวก่อน โดยใช้เอนไซม์ผสมดังนี้ α-amylase + Glucoamylase, Cellulase + α-amylase + Glucoamylase, Cellulase, Pectinase + α-amylase + Glucoamylase, Pectinase, Cellulase + Pectinase + α-amylase + Glucoamylase, Cellulase + Pectinase ผลปรากฏว่าเอนไซม์ผสมทั้ง 4 ชนิด(Cellulase + Pectinase + α-amylase + Glucoamylase) จะให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวส์มากที่สุดที่ 49.8 กรัมต่อลิตร

Saha และคณะ (2005) ได้ทำผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้เอนไซม์ Cellulase, β–Glucosidase, Xylanase และ Esterase 565 ± 10 mg/g substrate และใช้เชื้อ E.*coli* สายพันธุ์ FBR5 หมักที่ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 ได้ปริมาณเอทานอล 19 ± 1 กรัมต่อลิตร และ Yield 0.24 g ethanol/g dry solids ในเวลา 72 ชั่วโมง

6.6 Pretreatment

เนื่องจากวัสดุธรรมชาติ หรือลิกโนเซลลูโลสนั้น จะมีส่วนประกอบของ ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ในส่วนของลิกนินนั้นจะเป็นองค์ประกอบที่แข็งแรง สามารถป้องกันการสลายด้วยจุลินทรีย์ และเอ็นไซม์ ดังนั้นถ้าจะใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลส จะต้องทำการเอาลิกนินออกก่อน และทำให้องค์ประกอบอ่อนนุ่ม เพื่อให้เอนไซม์และจุลินทรีย์เข้าถึง และทำการย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว เพื่อทำการหมักเป็นน้ำตาลต่อไป

Nilsson และคณะ (1995 อ้างโดย Kadar และคณะ, 2004) ได้รายงานว่าปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้น โดยการเตรียม milled paper ด้วย phosphoric acid ซึ่งจะทำให้สารตั้งต้นอ่อนนุ่ม ทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 0.21 g ethanol/g cellulose Umikalsom และคณะ (1998) รายงานว่าการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเกือบเป็นเส้นตรงเมื่อปริมาณลิกนินลดลงจาก 12 เป็น 6.5 เปอร์เซ็นต์ และการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อปริมาณลิกนินลดลงจาก 6.5 เป็น 4.5 เปอร์เซ็นต์ การไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น แต่ไม่เป็นเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าการไฮโดรไลซีสไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลลูโลส และปริมาณลิกนินเพียงเท่านั้น แต่ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ขนาดของรูพรุน พื้นที่ผิวสัมผัส ระดับความเป็นผลึกของเซลลูโลส

Zhu และคณะ (2005b) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลแบบ SSF จากฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/alkali และใช้ Alkali อย่างเดียว ปรากฏว่าฟางข้าวที่เตรียมด้วย Microwave/alkali จะมีสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 5.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 15 mg/g substrate และสารตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะผลิตเอทานอลได้ 25.8 กรัมต่อลิตร และYield 57.5 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนฟางข้าวที่เตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว

จะมีสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 5.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ 20 mg/g substrate และสารตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะผลิตเอทานอลได้ 23.7 กรัมต่อลิตร และYield 52.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เชื้อ *S.cerevisiae* YC-097 ในการหมัก

จะเห็นได้ว่าจากการเตรียมฟางข้าวด้วย Microwave/alkali จะใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซีสน้อยกว่าการเตรียมด้วย Alkali อย่างเดียว ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ลง

Zhu และคณะ (2006a) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ SSF ในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโพดที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วต้มให้เดือดเป็นระยะเวลา 60 นาที และฟางข้าวที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วให้ความร้อนด้วย Microwave ที่ 700W เป็นระยะเวลา 25 นาที ปรากฏว่าการเตรียมด้วยสารลลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วต้มให้เดือด 60 นาที มีสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ฟางข้าวโพด 100 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอทานอล 31.1 กรัมต่อลิตร และให้ Yield 64.8 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ส่วนในกานผลิตเอทานอลจากฟางข้าวโพดที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วให้ความร้อนด้วย Microwave 700W เป็นระยะเวลา 25 นาที จะมีสภาวะที่เหมาะสมคือใช้ฟางข้าว 100 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้ปริมาณเอทานอล 34.3 กรัมต่อลิตร และ Yield 69.3 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 72 ชั่วโมง

Zhu และคณะ (2006a) เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในระบบ SSF จากฟางข้าวโพดที่เตรียมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์อย่างเดียว กับฟางข้าวโพดที่เตรียมด้วย Microwave-assisted alkali จะเห็นได้ว่าการเตรียมด้วย Microwave-assisted alkali จะสามารถผลิตอทานอลได้ถึง 34.3 กรัมต่อลิตรในเวลา 72 ชั่วโมง และใช้เอนไซม์เพียง 15 mg/g substrate ส่วนการใช้ Alkali อย่างเดียวจะต้องใช้เวลาถึง 96 ชั่วโมง จึงจะได้ปริมาณเอทานอล 31.1 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณอนไซม์ 20 mg/g substrate

6.7 Surfactant

กลไกของสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อการไฮโดรไลซีสมีการอธิบายที่แตกต่างกันใน 3 รูปแบบคือ 1) สารลดแรงตึงผิวจะเปลี่ยนโครงสร้างของสารตังต้นทำให้เอนไซม์สามารถที่จะเข้าถึงสารตั้งต้นได้ง่ายขึ้น และสารลดแรงตึงผิวจะเหนียงนำให้เกิดพันธะระหว่างเอนไซม์ กับเซลลูโลส ส่งผลให้เกิดการไฮโดรไลซีสเพิ่มขึ้น 2) สารลดแรงตึงผิวจะเพิ่มความเสถียร และป้องกันการเสียสภาพให้แก่เอนไซม์ระหว่างการไฮโดรไลซีส เช่น จะลดอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพหรือลด

การเสียสภาพโดยแรงเฉือน 3) สารลดแรงตึงผิวจะลดการดูดซับที่ไม่สามารถผันกลับได้ (Sun และ Cheng, 2002; Alkasrawi และคณะ, 2003; Eriksson และคณะ, 2002) สารลดแรงตึงผิวประเภท Non-ionic จะทำให้เพิ่มการไฮโดรไลซีสของเซลลูโลส แต่สารลดแรงตึงผิวประเภท anionic และ cationic จะลดการไฮโดรไลซีสของเซลลูโลส (Ooshima และคณะ, 1986 อ้างโดย Alkasrawi และคณะ, 2003; Kurakake และคณะ, 1994 อ้างโดย Alkasrawi และคณะ, 2003)

Castanon และคณะ (1981 อ้างโดย Alkasrawi และคณะ, 2003) รายงานว่าการเติม Tween-80 สามารถเพิ่มการไฮโดรไลซีสกระดาษหนังสือพิมพ์ 14 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง Alkasrawi และคณะ (2003) ได้ทำการทดสอบผลของ Tween-20 ต่อระบบ SSF โดยการเติม Tween-20 ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร จะทำให้มีผลในทางบวกคือ ปริมาณ Yield ของเอทานอลเพิ่มขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์ที่เติมเข้าไปลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยการป้องกันการทำพันธะกับลิกนิน ทำให้ง่ายต่อการแยกเอนไซม์มาใช้ใหม่ เวลาที่จะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลมากที่สุด ลดลง Eriksson และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาสารลดแรงตึงผิวที่มีผลต่อการไฮโดรไลซีส ปรากฏว่า เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดที่เป็น non-ionic จะสามารถไฮโดรไลซีสถึง 43-48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการไฮโดรไลซีสที่ไม่เติมสารลดแรงตึงผิวจะสามารถไฮโดรไลซีสได้เพียง 33 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น Tween และ Triton เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้สามารถเพิ่มการไฮโดรไลซีสเกิดขึ้นได้มากที่สุด แต่สำหรับในการผลิตขนาดใหญ่ Triton ไม่เหมาะสมเพราะว่าสารชนิดนี้มี Aromatic ring อยู่ในโครงสร้าง ซึ่งจะมีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ส่วน Tween จะไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีความเหมาะสมที่จะใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ จึงเลือก Tween-20 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่จะใช้ในงานต่อไป และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Tween-20) การไฮโดรไลซีสจะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tween-20 เป็น 5 กรัมต่อลิตร การไฮโดรไลซีสจะเพิ่มขึ้นจาก 40 เป็น 65 เปอร์เซ็นต์

6.8 สารยับยั้ง

ในขั้นตอนการเตรียมลิกโนเซลลูโลสอาจจะก่อให้เกิดสารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส เช่น ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดจะทำให้เกิดสารประกอบ Furaldehyde, Acetate, Hydroxymethylfuraldehyde, Vanillin, Hydroxybenzaldehyde, Suringaldehyde เป็นต้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนกระบวนการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอล Delgenes และคณะ (1996) ศึกษาการยับยั้งของสารประกอบ Furaldehyde, Acetate, Hydroxymethylfuraldehyde, Vanillin, Hydroxybenzaldehyde, Suringaldehyde ในการหมักน้ำตาล Xylose ด้วยเชื้อ *Candida shehatae* และเชื้อ *Pichia stipitis* และการหมักน้ำตาล Glucose โดย *Saccharomyces cerivisiae* และ *Zymomonas mobilis* ปรากฏว่าสารประกอบทุกตัวจะยับยั้งการ

เจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลของเชื้อทั้ง 4 ชนิด Palmqvist และ Hahn-Hagerdal (2000b อ้างโดย Mussatto และ Roberto, 2004) ได้รายงานผลผลิตที่ได้จากการไฮโดรไลซีสเซลลูโลสคือ กลูโคส ส่วนเฮมิเซลลูโลสคือ Xylose, Mannose, Acetic acid, Galactose และGlucose แต่การไฮโดรไลซีสที่อุณหภูมิ และความดันสูงจะทำให้ Glucose สลายต่อไปเป็น Furfural ส่วน Xylose จะสลายต่อไปเป็น Hydroxymethyl furfural และลิกนินจะสลายตัวไปเป็นสารพวก Phenolic compounds ซึ่งสารพวกนี้จะเป็นสารยับยั้งในการบวนการหมักเป็นเอทานอล Palmqvist และคณะ (1997 อ้างโดย Palmqvist และ Hahn-Hagerdal, 2000) ได้ทดสอบการสลาย ตัวยับยั้งโดยใช้เชื้อ *Trichoderma reesei* ปรากกฏว่าเชื้อชนิดนี้สามารถที่จะสลาย ตัวยับยั้งที่เกิดจากการเตรียม willow ด้วยไอน้ำ โดยดูจากอัตราการผลิตเอทานอลซึ่งเพิ่มขึ้น 3 เท่า และ Yield เพิ่มขึ้น 4 เท่า Palmqvist และ Hghn-Hagerdal, (2000) ได้รายงายตัวยับยั้งที่สามารถบำบัดด้วยเชื้อ *T. reesei* ได้แก่ Acetic acid, furfural และอนุพันธ์ของ Benzoic acid

Brandberg และคณะ (2004) ได้รายงานว่าการไฮโดรไลซีสลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดสารยับยั้งในกระบวนการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยกัน 3 กลุ่มคือ Furfuraldehyde, Organic acid และ Phenolic compound ซึ่งสารกลุ่ม Furfural จะเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Glycolytic enzyme, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase และ Alcohol dehydrogenase

Brandberg และคณะ (2004) ได้รายงานว่าในการที่ลดความเป็นพิษของสารที่เกิดจากการไฮโดรไลซีสลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูงนั้นด้วยวิธีทางเคมี จะเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต แต่การลดความเป็นพิษด้วยการเปลี่ยนกระบวนการหมักจากระบบแบบกะ เป็นระบบแบบกึ่งกะ หรือระบบต่อเนื่อง จะทำให้ลดต้นทุนลงได้

Brandberg และคณะ (2004) ได้ทำการทดสอบยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 9 สายพันธ์ในการหมักสารตั้งต้นที่ไฮโดรไลซีสด้วยกรดเจือจางที่มีสารยับยั้ง (Furfural, 5-Hydroxymethyl furfural, Acetate) ทั้งในระบบแบบกะ และแบบกึ่งกะ ปรากฏว่ายีสต์ *S. cerevisia* ATCC 96581 สามารถทนต่อตัวยับยั้งได้ดีที่สุด โดยจะสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และแมนโนส ได้ทั้งหมด ในระบบแบบกึ่งกะ

6.9 ความเข้มข้นของเอทานอล

โดยทั่วไปการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดย Holzberg และคณะ (1967 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำองุ่น พบว่าปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้น 2.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อการเจริญของ

ยีสต์ แต่ที่ความเข้มข้น 6.85 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีผลต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งบทบาทของเอทานอลที่มีต่อการเจริญของยีสต์ คือ เอทานอลจะไปยับยั้งการสังเคราะห์กรดไรโบนิวคลีอิก และโปรตีน ส่งผลทำให้อัตราการเจริญลดลง และ การที่เซลล์ยีสต์ตายเกิดจากปฏิกิริยาที่เอทานอลทำให้โปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ (denature) ส่วนการยับยั้งการหมักโดยเอทานอลนั้น มีการตั้งสมมุติฐานว่าเอทานอลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เช่น คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนต่างๆในเซลล์ (Petrov และ Okorokov, 1990; Lucero และคณะ, 2000 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ส่วนในระดับเอนไซม์การยับยั้งอาจจะมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) นอกจากนี้ระดับการยับยั้งยังสัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมอื่นๆ อีกด้วย โดยเฉพาะเมื่อมีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูงทำให้การยับยั้งรุนแรงขึ้น *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อเอทานอลได้ดี โดยพบว่าสามารถทนต่อปริมาณเอทานอลได้ถึง 21 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Walker, 1998 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) เชื่อกันว่าความทนต่อเอทานอลของยีสต์ นั้นเนื่องจากองค์ประกอบส่วนที่เป็นไขมันพวกสเตอรอล และฟอสโฟลิปิด รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยป้องกันการผ่านเข้าออกและส่งเสริมการขับ (excretion) เอทานอลออกจากเซลล์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่เป็นพิษภายในเซลล์ลดลง (Thomas และคณะ, 1978 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) โดย Thomas และ Rose (1979 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ก็พบว่า การเติมกรดไขมันและสเตอรอล ช่วยเสริมให้ยีสต์ทนต่อเอทานอลมากขึ้น และมีการทดลองพบว่า เมื่อเติมกรดไขมันที่ได้จากน้ำมันเมล็ดฝ้ายลงในอาหารกากน้ำตาลจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอล (Saigal และ Viswanathan, 1984 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่พบว่าการเพิ่มปริมาณแมกนีเซียม ในการหมักจะช่วยลดอัตราการตายและปกป้องการทำลายผิวเซลล์ยีสต์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงอีกด้วย (Birch และ Walker, 2000 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) อีกทั้ง Lopes และ Sola-Penna (2001อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ศึกษาพบว่ายูเรียสามารถช่วยเพิ่มความทนทานของยีสต์ต่อเอทานอล ในระหว่างการหมักได้โดยจะไปช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ภายในเซลล์

Chen และ Jin (2006) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของเอทานอล และยีสต์ต่อการไฮโดรไลซีสเซลลูโลส ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ผลปรากฏว่าปริมาณเอทานอลในช่วง 1-7 เปอร์เซ็นต์ มีการยับยั้งการทำการของเซลลูเลส ในการไฮโดรไลซีสเซลลูโลส แต่การยับยั้งไม่สมบูรณ์ และเป็นแบบสามารถผันกลับได้ ส่วนผลต่อเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส ปริมาณเอทานอลในช่วง 1-9 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอล ในส่วนของยีสต์จะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

6.10 ออกซิเจน

หน้าที่หลักของออกซิเจน คือ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ (Respiratory chain) นอกจากนั้นออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์อีกด้วย โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่ ซึ่งนอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนแล้ว ยังเพิ่มความทนต่อเอทานอลของยีสต์ด้วย (สาวิตรี, 2540 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

สำหรับอิทธิพลของออกซิเจนที่มีต่อการหมักนั้น เมื่อมีการเติมอากาศมากจะทำให้เกิด Pasteur effect คือ ทำให้มีการออกซิเดชันของกลูโคสอย่างสมบูรณ์ ส่งผลให้ชีวมวลเพิ่มขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเติมอากาศมากๆ ก็ไม่ได้ก่อให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้นเสมอไป ทั้งนี้เพราะการหายใจของยีสต์ยังถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลซูโครสสูงกว่า 0.02-0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ถึงแม้จะมีการเติมอากาศอย่างเต็มที่ การหายใจก็ยังคงเกิดได้น้อย เมแทบอลิซึมที่เกิดจะเบนไปทางการหมักเอทานอล มากกว่าการหายใจ เรียกว่า Crabtree effect (สาวิตรี, 2540 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

ออกซิเจนมีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ในขั้นตอนของการเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Starter) โดยทั่วไปเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ จะเป็นเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจน ซึ่งจะได้ยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์สูงและมีอัตราการหมักสูงด้วยเช่นกัน ในส่วนของการหมักปริมาณ ออกซิเจนซึ่งยีสต์ต้องนำเข้าไปภายในเซลล์เพื่อให้มีการหมักเอทานอลสูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ และสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ (สาวิตรี, 2540 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

จากที่กล่าวมาถึงแม้ว่าขบวนการหมักเอทานอลเกิดขึ้นในสภาพไม่มีออกซิเจน แต่ก็มีรายงานที่พบว่าออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยจะกระตุ้นอัตราการหมักเอทานอล โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนเล็กน้อย เพื่อใช้ในขบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์มากกว่าที่จะนำไปใช้เพื่อการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์สามารถสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ สอดคล้องกับมีงานวิจัยพบว่า การเติมไขมันไม่อิ่มตัว เช่น เออร์กอสเตอรอล (ergosterol) ลงในอาหารหมักสามารถทดแทนความต้องการออกซิเจนได้ แต่ไม่เหมาะกับการผลิตในอุตสาหกรรม เพราะกรดไขมันชนิดนี้มีราคาแพง และพบว่าการให้อากาศ แก่การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง ในปริมาณความดัน 0.07 มิลลิเมตรปรอท เป็นปริมาณที่เหมาะสม (Cysewski และ Wilke, 1978 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) นอกจากนี้ *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์ก็ต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในระหว่างการหมัก แต่ในสภาพที่มีออกซิเจนมากๆ คือสูงกว่า 300 มิลลิเมตรปรอท ก็จะ

ยับยั้งทั้งการเจริญและการหมักเอทานอลได้ (Cysewski และ Wilke, 1976 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

6.11 สารอาหาร

เชื้อยีสต์ จะสามารถเจริญเติบโตได้ดี ต้องมีแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งในการผลิตเอทานอลแบบ SSF จะต้องมีการเติมสารอาหารลงไปด้วยเช่นกัน อย่างเช่น การผลิตเอทานอลจาก corn stover โดย Ohgren และคณะ (2007) ได้เติมสารอาหาร $(NH_4)_2HPO_4$ 0.05 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.025 กรัมต่อลิตร และ Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ 18.2-21.4 กรัมต่อลิตร ในระบบ SSF

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเตรียมเส้นใยปาล์มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) ที่ให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ปริมาณลิกนินลดลง และเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยใช้เอนไซม์ในการย่อย ในระบบแบบกะ

3. เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยแบบกะ และกึ่งกะ