

บทที่ 2

ทฤษฎีและวารสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การหมักแข็งได้รับการพัฒนาทั้งกระบวนการทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์และสับสเตรตต่างๆ ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ได้ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การผลิตเซลลูเลสจากการหมักแข็งรำข้าวสาลีด้วยไตรโคเดอร์มา รีสีอี [25] ซึ่งเป็นเอนไซม์เปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาล

เซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลีแซคคาไรด์เส้นตรงและเฮมิเซลลูโลสเป็น heteropolysaccharides เป็นเส้นตรงและกิ่งซึ่งที่พบในธรรมชาติประกอบด้วย monosaccharide 5 ชนิด คือ D-xylose, D-galactose, D-mannose, D-glucose และ L-arabinose ส่วนใหญ่ในสายโซ่โมเลกุลคือ xylans, galactans และ mannans กากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมเป็นประเภทไม้อ่อน (soft wood) ประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสอยู่ในรูปของ mannans ซึ่งทำให้เปลือกแข็งนั่นเอง เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย mannans ได้คือ β -mannanase ซึ่งผลิตได้จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสีอี ขึ้นกับสับสเตรตที่นำมาใช้ เช่น กากเหลือทิ้งหลังจากบีบน้ำมันออกแล้ว (oil cake) การใช้เอนไซม์นี้สามารถเพิ่มผลได้น้ำตาลมากขึ้นหลายเท่าเมื่อเทียบกับใช้เซลลูเลสอย่างเดียว เชื้อราที่สามารถให้เอนไซม์ที่ย่อยสลาย mannan จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ (bio-ethanol) [26]

งานวิจัยที่ผ่านมาผลิตเอทานอลจากวัสดุเซลลูโลสคือฟางข้าวสาลีโดยใช้กรดเอนไซม์เซลลูเลสจากการหมักแข็ง จุลินทรีย์ที่ใช้คือไตรโคเดอร์มา รีสีอี และใช้ยีสต์ แซคคาโรมายซิส ซีรีวีสีอี เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล [27]

บทวิจารณ์เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้กากเหลือทิ้งที่บีบน้ำมันออกแล้ว เช่น กากมะพร้าว กากงา กากปาล์ม กากเมล็ดฝ้าย กากคาโนลา กากมะกอก กากเมล็ดเรพ พบว่า การผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสจากกากคาโนลาด้วยไตรโคเดอร์มา รีสีอี ระบบเอนไซม์ที่ผลิตได้มีสัดส่วนของ acetyl xylan esterase, cellulase และ xylosidase activity

การใช้กากเหลือทิ้งที่บีบน้ำมันออกแล้วจึงเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงสีเขียวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนต่ำ บทวิจารณ์งานวิจัยกากของพืชน้ำมันที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (oil cake) และการนำไปใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ได้หาค่าประกอบทางเคมีของ oil cake ต่างๆ และการนำไปใช้ผลิตเอนไซม์โดยการหมักแข็ง ในบทความได้รวบรวมจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปใช้ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ จาก oil cake ที่ใช้เป็นสับสเตรต และได้รายงานการใช้กากคาโนลาผลิตไฮโดรไลสโดยใช้ไตรโคเดอร์มา รีสีอีได้ดีกว่ากากอื่นๆ [28]

งานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม (*Trichoderma harzianum* strain T4) ผลิตเอนไซม์ β -mannanase บริสุทธิ์ โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนหรือสับสเตรท ระยะเวลาหมัก 6 วัน [29]

นอกจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีอี สามารถผลิตเอนไซม์แมนแนนเนส ยังสามารถผลิตไซแลนเนสได้เช่นกัน ได้มีงานวิจัยการผลิตไซแลนเนสเพื่อใช้ย่อยไซแลนโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีอี RUT C-30 จากกลีบข้าวโอ๊ตและเปลือกของปืทที่ใช้ผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน [30] และการศึกษา stereochemistry ของการย่อยสลาย glycosidic linkage ด้วย endo- β -1,4-xylanase ที่ได้จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีอี RUT C-30 [31]

แนวคิดของงานวิจัยนี้คือการนำเอนไซม์ผสมระหว่างเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีอี RT-P1 และ เชื้อยีสต์แซคาโรมายซิส ซีวีลีอี RT-P2 ที่ผลิตได้จากการหมักแข็งโดยใช้สับสเตรทที่เป็นกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมไปใช้ย่อยสลายได้ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสโดยนำเอนไซม์ผสมมาใช้ทั้งใน ขั้นตอนการปรับสภาพทางชีวภาพเบื้องต้นและการย่อยสลายร่วมกับการหมักเอทานอลแบบรวม ปฏิกริยาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยวของกระบวนการ two-step SSCF บนสมมติฐานการให้จุลินทรีย์ ผสมเติบโตบนแหล่งคาร์บอนหรือสับสเตรทที่มีอาหารเหลวเป็นตัวกลางที่เหมาะสมรวมทั้งความเป็น กรด-ต่างและอุณหภูมิของกระบวนการหมักแข็ง จุลินทรีย์ผสมจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาและเปลี่ยน เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลระหว่างการเติบโต และมียีสต์ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงให้อยู่ร่วมกันจะ เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลไปพร้อมกันด้วย [32]

2.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเอทานอลจากวัสดุเซลลูโลสิกโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้มี งานวิจัยและพัฒนาถึงศักยภาพของวัตถุดิบเหล่านี้ร่วมกับการผลิตชนิดของเอนไซม์เพื่อใช้ย่อยสลาย เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีอยู่มากมายในธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ได้อย่างยั่งยืน

เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีอี และ *A. niger* NCH-189 สามารถนำมาใช้ย่อยสลายแมนแนน (mannan) ได้ และกากมะพร้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted copra หรือ coconut oil cake) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี จึงได้มีการศึกษาการเพิ่มการผลิตเอนไซม์แมนแนนเนส (mannanase) โดยการ หมักเหลวจากกากมะพร้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้วด้วยเชื้อรา *A. niger* NCH-189 พบว่า กากมะพร้าวเป็น แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์แมนแนนเนส ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนและแมนแนนเป็น องค์ประกอบ แมนแนนเนส แอคทิวิตี เท่ากับ 28 U/mL ระยะเวลาที่ใช้หมัก 3 วัน ที่ 30°C ซึ่งมีค่า มากกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น 4 เท่า เอนไซม์แมนแนนเนสสามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้น้ำตาล [33]

กากมะพร้าวที่สกัดน้ำมันออกแล้วจึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการหมักแข็งเพื่อ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและแมนแนนเนสได้ เพราะองค์ประกอบทางเคมีมีเส้นใย โปรตีนในปริมาณมาก

และฟอสฟอรัสปริมาณเล็กน้อย โดยการใช้เอนไซม์ผสมจากการหมักแข็งระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีส RT-P1 และเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีวีลีส RT-P2 ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทเพื่อผลิตเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์เดียว

สำหรับกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมที่สามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอนไซม์ในงานวิจัยที่ผ่านมา คือกากองุ่นที่คั้นน้ำออกแล้ว (grape pomace) และกากเมล็ดองุ่น (grape seed) ที่สกัดสาร anthocyanins ออกแล้ว งานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานองค์ประกอบและสมบัติทางกายภาพของกากองุ่นที่คั้นน้ำออกแล้ว และเมล็ดองุ่น พบว่า ประกอบด้วยโพลีฟีนอล 95-97% เส้นใยอาหาร 30-32% และ โปรตีน 60-70% [34]

การย่อยสลายกากองุ่นที่คั้นน้ำออกแล้วโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อรา *A. awamori* ในการหมักแข็ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนสและแพคติเนส กากองุ่นที่คั้นน้ำออกแล้วประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต (8% ในเมล็ดและ 13 % ในเปลือก) เส้นใย 50% ของมวลทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วยลิกนิน 64% ในเส้นใยและ 59% ในเปลือก นอกจากนี้เส้นใยยังมีเฮมิเซลลูโลส (18% ในเมล็ดและ 31% ในเปลือก) และเซลลูโลส (17.75% ในเมล็ดและ 6% ในเปลือก) ส่วนเพคตินในเส้นใยมีเพียงเล็กน้อยประมาณ 0.25% ในเมล็ด 4% ในเปลือก ได้มีการนำกากองุ่นไปใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการเติบโตของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ไวไรด์ (*Trichoderma viride*) ดังนั้น กากองุ่นจึงมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนสและแพคติเนสในกระบวนการหมักแข็ง เอนไซม์เหล่านี้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อาหารสัตว์ เชื้อเพลิงชีวภาพ อุตสาหกรรมเคมีที่ใช้วัสดุเซลลูโลสในกระบวนการ โดยเฉพาะไซแลนเนสใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ [35]

การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีส เป็นเอนไซม์ปรับสภาพน้ำองุ่นก่อนนำไปหมักเป็นไวน์จากน้ำองุ่น ใช้เวลา 24 ชั่วโมงที่ 20-22°C พบว่าเอนไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีส เตรียมจากเพคตินและเซลลูโลสให้ค่าเอนไซม์ แอคทิวิตีของ pectate-lyase, cellulase, β -1,3-Glucanase และ β -1,6-Glucanase ซึ่งสามารถทำให้ไวน์มีความขุ่นน้อยลง อัตราการหมักเอทานอลลดลงเนื่องจากสารอาหารน้อยลงเมื่อเทียบกับน้ำองุ่นที่ไม่ได้ปรับสภาพกับเอนไซม์ [36]

การใช้กากองุ่นเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไวน์สำหรับการผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มา ไวไรด์ โดยกระบวนการหมักแข็งเพื่อใช้เป็นสารควบคุมโรคพืช เชื้อราสายพันธุ์นี้ผลิต extracellular enzymes ที่เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช เช่น โคตินีสและ β -Glucanase ซึ่งย่อยสลายผนังเซลล์ของศัตรูพืช และเพคตินีสซึ่งทำให้พืชมีความต้านทานโรค เชื้อราสายพันธุ์ไตรโคเดอร์มา ไวไรด์ใช้ต้านทานโรคพืช ช่วยการเติบโตและเพิ่มอัตราการผลิต ที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับการผลิต extracellular enzymes จากเชื้อราสายพันธุ์นี้โดยการหมักแข็งยังมีน้อย งานวิจัยพบว่า ผลได้ของจุลินทรีย์ โคตินีส, β -Glucanase และเพคตินีส เท่ากับ 6.65×10^9 CFU/g สับสเตรทเริ่มต้น, 47.8 U/ g สับสเตรทเริ่มต้น, 8.32 U/ g สับสเตรทเริ่มต้น และ 9.83 U/ g สับสเตรทเริ่มต้น ตามลำดับ

เอนไซม์ที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อ *Cladosporium*, *Fusarium*, *Fuvai*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* และ *Rhizopus* [37]

กากเปลือกองุ่นและแอปเปิลเหลือทิ้งจากการผลิตไวน์ น้ำผลไม้ และไซเดอร์โดยใช้การย่อยสลายด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติกและไฮโดรคลอริก พบว่าความเข้มข้นกรดไตรฟลูออโรอะซิติกที่เหมาะสมคือ 2 โมลาร์, 121 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลได้ของโมโนแซคคาไรด์จากเปลือกผลไม้สูงกว่าการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกภายใต้สภาวะเดียวกัน เปลือกองุ่นเป็นแหล่งของฟิกเมนต์แอนโทไซยานิน (anthocyanin pigment) ที่ดี ขณะที่เปลือกแอปเปิลเป็นแหล่งของเคทีชิน (catechins) [38]

น้ำมันจากเมล็ดองุ่นผลิตได้โดยใช้การบีบอัดด้วยระบบไฮดรอลิกและการสกัดด้วยตัวทำละลาย ส่วนใหญ่ใช้นอร์มัล-เฮกเซน (n-hexane) ผลได้ของกระบวนการเพิ่มขึ้นจากการเพิ่มแรงอัดและการให้ความร้อน การขัดสีเมล็ดเพิ่มประสิทธิภาพและลดพื้นที่ผิวได้ ทางเลือกหนึ่งของการทำให้น้ำมันออกมาเพิ่มขึ้นโดยใช้การย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อการปรับสภาพเบื้องต้น ทำให้เมล็ดมีอนุภาคขนาดเล็กลง ผิวถูกย่อยเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์และแยกเซลล์ออกจากกันทำให้น้ำมันเซลล์ถูกทำลายทำให้สกัดน้ำมันได้เพิ่มขึ้น การย่อยสลายใช้เอนไซม์ร่วมกันระหว่างเซลลูเลสและเพคติเนส สำหรับที่ระยะเวลานานเพิ่มการย่อยได้โดยการใช้โปรติเอสร่วมด้วย การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ผสมซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้าระหว่างเซลลูเลสผลิตจาก *A. niger* เสมิ-เซลลูเลสผลิตจาก *Thermomyces lanuginosus* เพคติเนสผลิตจาก *A. aculeatus* และโปรติเอสผลิตจาก porcine pancreas กับเมล็ดองุ่นบด พบว่า ผลได้จากการสกัดเท่ากับ 13.7% ที่สภาวะเหมาะสมคือเวลาที่ใช้ 24 ชั่วโมง pH เท่ากับ 4 อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ขนาดอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.4 มิลลิเมตร และความเข้มข้นเอนไซม์ผสมของ เซลลูเลสเท่ากับ 29 โปรติเอสเท่ากับ 1191 ไซ-แลนเนสเท่ากับ 21 และเพคติเนสเท่ากับ 569 U/g ของเมล็ดองุ่น มีค่าเพิ่มขึ้น 106% ของเมล็ดองุ่นที่ไม่ได้ปรับสภาพเบื้องต้น สำหรับเวลาที่ใช้ 120 ชั่วโมง ผลได้เท่ากับ 17.5% มีค่าเพิ่มขึ้น 163% ของเมล็ดองุ่นที่ไม่ได้ปรับสภาพเบื้องต้น [39]

การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากองุ่นและบิทเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรโดยการหมักแข็งด้วยยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสอี ในระดับห้องปฏิบัติการ สภาวะเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อคือน้ำตาล 16.5% ที่ pH 4.5 ความชื้น 68% ความเข้มข้นของหัวเชื้อเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อกรัมของกากผลไม้และทำการบ่มในสภาพแวดล้อมที่หายใจอากาศที่ 28°C ระยะเวลาหมักเท่ากับ 96 ชั่วโมง พบว่า การหมักแข็งกากบิทให้ เอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลา 46 ชั่วโมง และผลได้มากกว่า 82% ของการใช้น้ำตาล และการหมักแข็งให้เอทานอลมากกว่าการหมักเหลว ข้อได้เปรียบของการหมักแข็งคือทางด้านเทคนิคและทางเศรษฐศาสตร์ ง่ายต่อการดำเนินงาน ประหยัดเวลาและพลังงาน วัตถุดิบราคาถูก [40]

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเพื่อเพิ่มเอนไซม์ β -mannanase โดย recombinant *Aspergillus sojae* การทดลองทำในขวดรูปหมู โดยใช้ Box-Behnken design of response

surface methodology กิจกรรมของเอนไซม์ β -mannanase สูงสุดมีค่าเท่ากับ 363 U/mL ใช้เวลาหมัก 4 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่เหมาะสมประกอบด้วย 7% กากน้ำตาลปี๊บ 0.43% แอมโมเนียมไนเตรด 0.1% ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ 0.05% แมกนีเซียมซัลเฟต (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ 207 รอบต่อนาที ระยะเวลาของการหมัก 6 วัน ที่สภาวะเหมาะสมกิจกรรมเอนไซม์ของ β -mannanase มีค่าเท่ากับ 482 U/mL ซึ่งเป็น 1.4 เท่าของการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลวซึ่งเท่ากับ 352 U/mL โดยที่เชื้อรา *Aspergillus sojae* ได้จากโคลนนิ่งและเปลี่ยนรูปเป็น endo- β -1,4-mannanase จาก *A. fumigatus* IMI 385708 ไปเป็น *A. sojae* [41]

2.3 วัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

2.3.1 โครงสร้างของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Dyk et al. 2012)

วัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic materials, LCMs) ประกอบด้วย ลิกนิน คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส แพคติน โปรตีน เถ้า เกลือ และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งลิกนินจะประกอบด้วยหน่วยของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) ได้แก่ p-coumaryl, coniferyl, guaiacyl, syringyl และ sinapyl alcohol และมีความต้านทานต่อการย่อยสลายสูงมาก องค์ประกอบของลิกนินพบมากในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน ขณะนี้ยังไม่พบโครงสร้างสามมิติของลิกนิน ไม้ยืนต้นมีลิกนินอยู่ที่ผนังเซลล์ส่วนที่ทำให้แข็งและทนทาน ทำให้ผนังเซลล์กันน้ำได้ และป้องกันโรค

เค้าโครงหลักของเซลล์พืชคือเซลลูโลสประกอบด้วยสายโซ่ของกลูโคสที่เชื่อมด้วย β -1,4-linkages สายโซ่นี้เชื่อมด้วยพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงทำให้สายโซ่เซลลูโลสมีแบบฟอร์มเป็นไมโครไฟบริล (microfibrils) ทำให้เป็นผลึก(crystalline) ในธรรมชาติ ที่ยากต่อการย่อยสลาย บางส่วนของโครงสร้างเซลลูโลสอาจเป็นอสัณฐาน (amorphous) ในธรรมชาติซึ่งง่ายต่อการย่อยสลาย เซลลูโลสถูกตรึงในกลุ่มของเฮมิเซลลูโลส แพคติน และลิกนิน ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสถูกพบในช่องว่างระหว่างเซลลูโลสไมโครไฟบริลในผนังเซลล์ปฐมภูมิและทุติยภูมิ เช่นเดียวกับ middle lamellae

โครงสร้างและองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสแปรผันมากกว่าเซลลูโลส ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของไซแลน(xylan polymer) แมนแนน (mannan polymer) กาแลคแทน (galactan polymer) และอะราบิแนน (arabinan polymer) ในธรรมชาติเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดคือไซแลน ประกอบด้วยโครงสร้างหลักของ β -D-xyloparanosyl residues ถูกเชื่อมกับ β -1,4-glucosidic bonds ในพืชไซแลนเป็นชั้นหุ้มพันธะไฮโดรเจนกับเซลลูโลส ขณะที่สร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมกับลิกนินซึ่งเป็นฝักอยู่ด้านนอกเพื่อป้องกันพืช รูปแบบของไซแลนเป็นส่วนสำคัญของผนังเซลล์พืช มีอยู่ประมาณร้อยละ 30-35 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด โครงสร้างส่วนใหญ่ของไซแลนคือ heteroxylan ซึ่งประกอบด้วย xylose residues ในสายโซ่หลักกับ acetate, arabinose และ galactose residues ที่เป็นกลุ่มมาแทนที่ องค์ประกอบของไซแลนแปรผันกับสายพันธุ์พืช

แมนแนนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสและประกอบด้วยน้ำตาล ได้แก่ แมนโนส กาแลคโทส และกลูโคส ส่วนประกอบแปรผันตามชนิดของพืชและรวมทั้งประกอบด้วยกลูโคแมนแนนในไม้เนื้อแข็ง (hardwood) กาแลคโทแมนแนน และกาแลคโทกลูโคแมนแนนในไม้เนื้ออ่อน (softwood)

แพคติน (pectin) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ชอบน้ำ (hydrophilic polysaccharide) อยู่ระหว่างโครงข่ายของเซลลูโลส (intercellular network) และเป็นส่วนที่นุ่มละลายน้ำได้ แพคตินในธรรมชาติมีความแตกต่างกันสูง ส่วนประกอบหลักคือ galacturonic acid ส่วนประกอบอื่นๆ มีดังนี้ rhamnose, arabinose, galactose, fucose และ apiose ขณะที่ galacturonic acid มี methyl-esterification หรือ acetylation อยู่ในระดับสูง

องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ ได้รับการรายงานในบทความวิจัย ดังตารางที่ 2.1 และแปรผันกับแหล่งของลิกโนเซลลูโลส ผลแตกต่างขององค์ประกอบอาจเนื่องมาจากวิธีการวิเคราะห์ และฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน การปรับปรุงสภาพเบื้องต้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้องค์ประกอบของวัสดุสับสเตรทชนิดเดียวกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ค่าต่างๆ ในตารางใช้เป็นเกณฑ์เท่านั้น ควรวิเคราะห์องค์ประกอบของสับสเตรทเมื่อนำมาใช้ เฮมิเซลลูโลสก็เช่นเดียวกัน

2.3.2 วิธีปรับปรุงวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพื่อเอทานอล (Margeot et al. 2009)

การนำชีวมวลประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิลเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้แล้วในปัจจุบันนี้ เอทานอลนับเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลคือวัสดุลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีปริมาณมหาศาล จึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยที่เป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก นอกจากนี้เอทานอลจากไม้และของเหลือทางเกษตรกรรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้แต่ต้องได้รับการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีและเศรษฐศาสตร์ “กระบวนการแบบดั้งเดิม (conventional process)” สำหรับการผลิตเอทานอลจากชีวมวลประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก ดังรูปที่ 2.1 คือ

ก. การปรับปรุงเบื้องต้น (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างของแมทริกซ์ของลิกโนเซลลูโลส

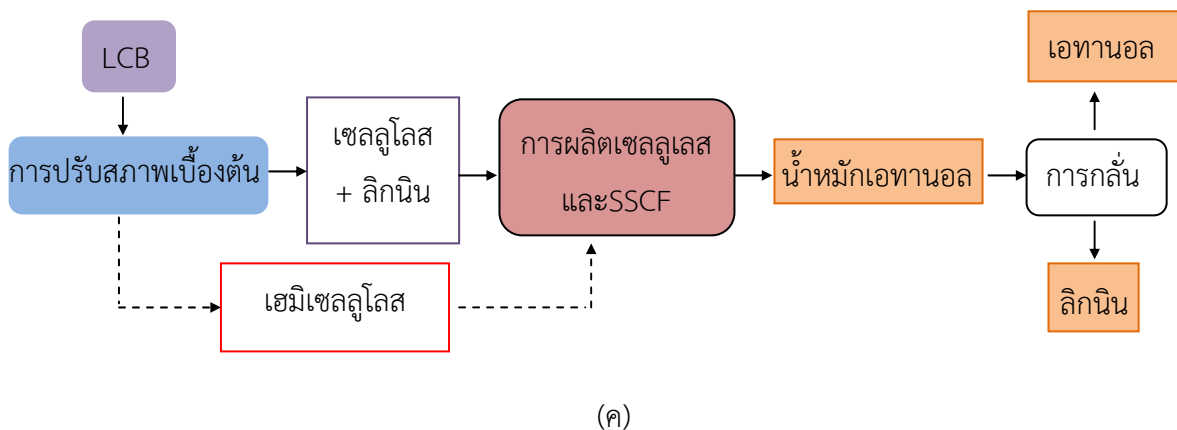
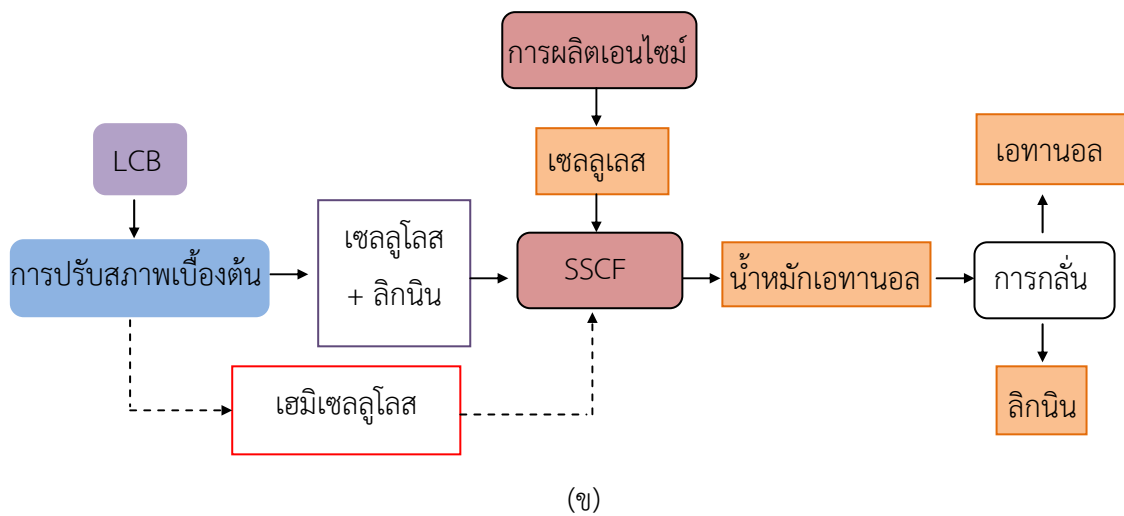
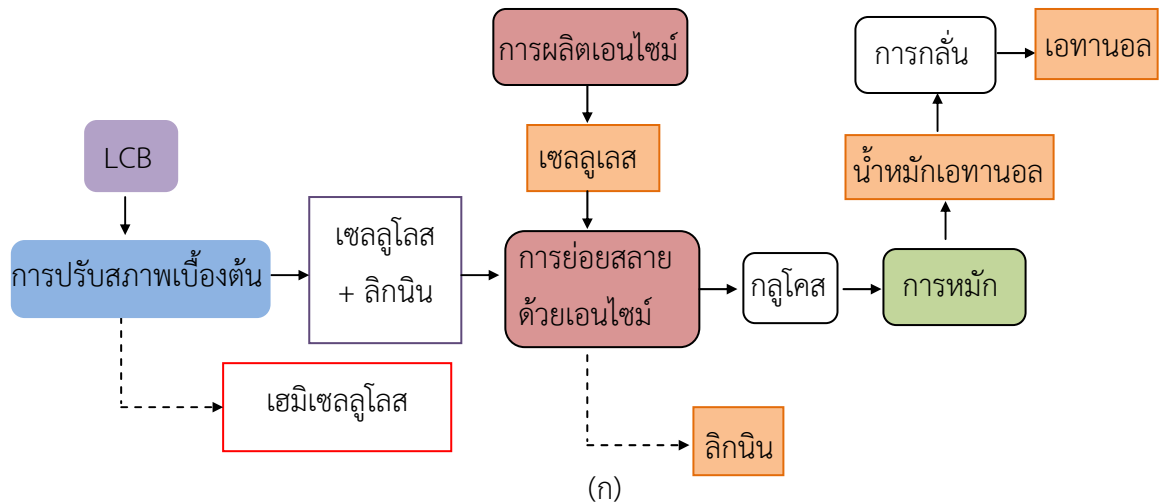
ข. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) เป็นการนำเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ (cellulolytic enzymes) มาใช้ย่อยสลายพันธะพอลิเมอร์ของเซลลูโลสซึ่งเป็นโมเลกุลสายโซ่ยาว ให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลเดี่ยว คือน้ำตาล

ค. การหมัก (fermentation) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพให้น้ำตาลเป็นเอทานอลโดยใช้ยีสต์

ง. การกลั่น-การกลั่นซ้ำ-การทำแห้ง (distillation-rectification-dehydration) และการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อให้เอทานอลมีคุณภาพเป็นเชื้อเพลิง

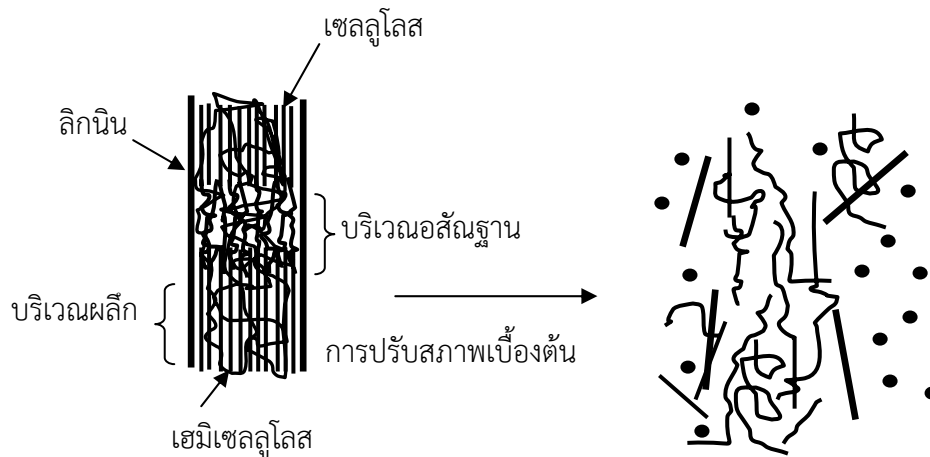
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบโดยประมาณ (%) ของวัสดุชีวมวลชนิดต่างๆ หรือของเหลือทิ้งจาก
เกษตรกรรม ที่สามารถถูกนำไปใช้สำหรับการย่อยสลายให้ได้น้ำตาลอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อ
การผลิตเอทานอลชีวภาพ ร้อยละของเส้นใยและอื่นไม่ได้แสดงไว้ในตาราง (ที่มา: Dyk et al.
2012)

ชีวมวล	เซลลูโลส %	เฮมิเซลลูโลส %	ลิกนิน %	อ้างอิง
Rapeseed stover	27.6	20.2	18.3	Li et al. (2009a)
Corn cobs	35-39	38-42	4.5-6.6	Okeke and Obi (1994)
	45	35	15	Howard et al. (2003)
Rice hull	24-29	12-14	11-13	Okeke and Obi (1994)
	36.1	19.7	19.4	Lee (1997)
Melon shells	35	19	30	Okeke and Obi (1994)
Corn stover	39	19.1	15.1	Lee (1997)
(<i>Zea mays</i>)	41.7	20.5	18	Merino and Cherry (2007)
Wheat straw	36.6	24.8	14.5	Lee (1997)
	44	29.6	10.4	Dijkerman et al. (1997)
	41.3	30.8	7.7	Bridgeman et al. (2008)
	33	23	17	Merino and Cherry (2007)
	30	50	15	Howard et al. (2003)
Rice straw	41	21.5	9.9	Lee (1997)
(<i>Oryza sativa</i> sp.)	39	15	10	Merino and Cherry (2007)
	32.1	24	18	Howard et al. (2003)
Bagasse	38.1	26.9	18.4	Lee (1997)
	39.3	27.2	12.2	Dijkerman et al. (1997)
	43	25	24	Merino and Cherry (2007)
	33.4	30	18.9	Howard et al. (2003)
Sawdust	45.0	15.1	25.3	Dijkerman et al. (1997)
Coconut fibre	17.7	2.2	34	Dijkerman et al. (1997)
Nut shell	25-30	25-30	30-40	Howard et al. (2003)
Leaves	15-20	80-85	0	Howard et al. (2003)
Grasses (average)	25-40	25-50	10-30	Howard et al. (2003)



รูปที่ 2.1 แผนภาพการผลิตเอทานอลชีวภาพจากชีวมวลประเภทวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ก) กระบวนการแบบดั้งเดิม (ข) กระบวนการหมักแบบรวมปฏิกิริยาและการหมักร่วม (simultaneous saccharification and co-fermentation process, SSCF) (ค) consolidated bioprocessing (CBS), LCB, lignocellulosic biomass เส้นประแทนทางทางเลือกของกระบวนการเพิ่มเติมขึ้นกับกระบวนการบำบัดเบื้องต้นที่เลือกใช้ (ที่มา: Margeot et al. 2009)

การปรับปรุงสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสเบื้องต้น มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้เซลลูโลสที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น โดยการเอาผนังเซลล์ของพืชออกไป ดังรูป 2.2 ปัจจัยของการปรับปรุงสภาพเบื้องต้น ประกอบด้วย การเพิ่มพื้นที่ผิวที่เอนไซม์สามารถเข้าถึงได้ การทำลายโครงสร้างของฟลิก สลายพันธะพอลิเมอร์ของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และหรือการละลายของลิกนินและปรับโครงสร้างลิกนิน



รูปที่ 2.2 แผนภาพจุดประสงค์การปรับปรุงเบื้องต้นของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (Balat, 2011)

เทคโนโลยีการปรับปรุงเบื้องต้นแบ่งออกได้ดังนี้

1. การปรับปรุงเบื้องต้นทางกายภาพคือการลดขนาดอนุภาคด้วยการบด (milling and grinding)
2. การปรับปรุงเบื้องต้นทางกายภาพ-เคมี (physic-chemical pretreatment) ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) หรือเรียกว่า autohydrolysis, น้ำร้อน (hydrothermaolysis) หรือ liquid hot water, LHW, wet oxidation และการระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fibre explosion, AFEX)
3. การปรับปรุงเบื้องต้นทางเคมี (chemical pretreatment) ได้แก่ ต่าง ปูนขาว กรดเจือจาง กรดร้อน (acid cooking) สารออกซิไดซิง และตัวทำละลายอินทรีย์ หรือการสกัดด้วย organosolv
4. กระบวนการทางชีวภาพ คือการนำจุลินทรีย์มาใช้อย่อยสลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ brown-rot, white-rot และ soft-rot

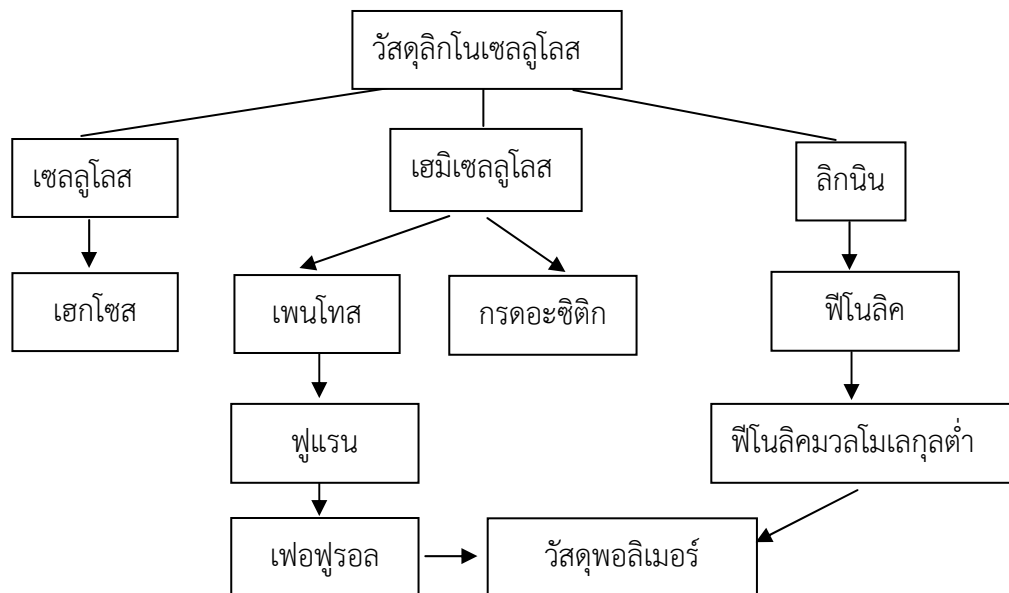
อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าวข้างต้นยังไม่ได้รับการพัฒนาเพียงพอที่มีความเป็นไปได้ทางด้านเทคนิคและเศรษฐศาสตร์ในการนำไปใช้กับกระบวนการระดับใหญ่ (large-scale processes) เช่น การบดไม้ลดขนาดอนุภาคถูกนำไปใช้ร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ข้อได้เปรียบและข้อด้อยของกระบวนการปรับปรุงเบื้องต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสแบบต่างๆ สรุปดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ข้อได้เปรียบและข้อด้อยของกระบวนการปรับปรุงสภาพเบื้องต้นวัสดุลิกโนเซลลูโลสแบบต่างๆ
(ที่มา: Balat, 2011)

กระบวนการปรับปรุงสภาพเบื้องต้น	ข้อได้เปรียบ	ข้อด้อย
การลดขนาดทางกล	ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส	การซ้ากลึงไฟฟ้าสูงกว่าค่าวัตถุดิบ
การระเบิดด้วยไอน้ำ	ทำให้เฮมิเซลลูโลสย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงรูปลิกนิน มีประสิทธิภาพต่อการลงทุน (cost-effective)	ทำลายส่วนของไซแลน ทำลายลิกนินได้ไม่สมบูรณ์ เกิดสารประกอบยับยั้งต่อจุลินทรีย์
การระเบิดเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (AFEX)	เพิ่มการเข้าถึงพื้นที่ผิว กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ไม่เกิดสารยับยั้งต่อจุลินทรีย์	ไม่มีประสิทธิภาพสำหรับชีวมวลที่มีลิกนินสูง
การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์	เพิ่มการเข้าถึงพื้นที่ผิว มีประสิทธิภาพต่อการลงทุน ไม่เกิดสารยับยั้งต่อจุลินทรีย์	ไม่ได้ปรับปรุงลิกนินและเฮมิเซลลูโลส
การใช้โอโซน (Ozonolysis)	ลดลิกนิน ไม่เกิดของเหลือพิช	ต้องใช้โอโซนมาก ราคาแพง
การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis)	เปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสไปเป็นไซโลสและน้ำตาลอื่นๆ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน	ต้นทุนสูง; กัดกร่อนอุปกรณ์ เครื่องจักร การเกิดของสารพิษ
การย่อยด้วยด่าง (Alkali hydrolysis)	กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เพิ่มการเข้าถึงพื้นที่ผิว	ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน ไม่สามารถนำเกลือกลับคืนมาได้ และรวมตัวเข้าไปในชีวมวล
Organosolv	ย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส	ต้องระบายตัวทำละลายออกจากเครื่องปฏิกรณ์ ถูกระเหย ถูกควบแน่น และใช้การหมุนเวียน ต้นทุนสูง
ไพโรไลซิส (pyrolysis)	ผลิตภัณฑ์เป็นก๊าซและของเหลว	อุณหภูมิสูง เกิดเถ้าขึ้น
Paused electrical field	สภาวะที่บรรยากาศ รบกวนเซลล์พืช	ต้องทำวิจัยกระบวนการต่อไป
การย่อยทางชีวภาพ	อุปกรณ์อย่างง่าย ย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ต้องการพลังงานต่ำ	อัตราการย่อยสลายต่ำมาก

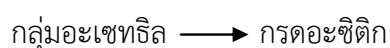
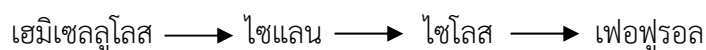
ปัญหาหลักคือ ได้โมเลกุลน้ำตาลน้อยที่สุด และมีสารยับยั้งเกิดขึ้น (สารประกอบ furanic และ phenolic) และข้อจำกัดของการใช้สารเคมี พลังงาน และน้ำ รวมทั้งมีของเสียเกิดขึ้น **การเลือกเทคโนโลยีการปรับสภาพเบื้องต้นที่เหมาะสมยังคงทำได้ยาก เพราะสมรรถนะขึ้นกับชีวมวลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ**

เทคนิคการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสพอลิเมอร์คาร์โบไฮเดรตให้น้ำตาลก่อนนำไปทำการหมักเอทานอลต้องผ่านการย่อยสลายที่เรียกว่าไฮโดรไลซิส (hydrolysis) การไฮโดรไลซิสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสวิธีต่างๆ ที่นิยมนำมาใช้มากที่สุดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือการย่อยสลายทางเคมีด้วยกรดเจือจางและเข้มข้น (dilute and concentrated acid hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) นอกจากนี้ยังมีการย่อยสลายวิธีอื่นอีกบ้าง ได้แก่ การใช้รังสีแกมมา (gamma-ray) หรือคลื่นลำอิเล็กตรอน (electron-beam irradiation) หรือคลื่นไมโครเวฟ แต่กระบวนการดังกล่าวไม่เป็นทางการค้ายังอยู่ในระหว่างการวิจัย

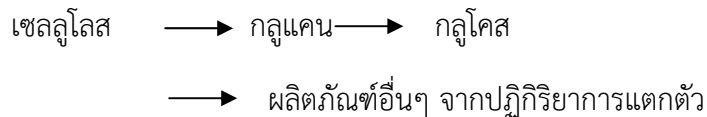


รูปที่ 2.3 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายหลักที่เกิดขึ้นระหว่างไฮโดรไลซิสของวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ที่มา: Balat, 2011)

ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส ดังรูปที่ 2.3 เมื่อเฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ ไซโลส แมนโนส กรดอะซิติก กาแลคโทสและกลูโคส จะถูกปลดปล่อยออกมา การนำไซโลสไปใช้หลักคือเปลี่ยนเป็นไซลิตอล (xylitol) ซึ่งคือกลุ่มฟังก์ชันสารให้ความหวาน (a functional sweetener) เขียนการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสเป็นสมการอย่างง่ายได้คือ



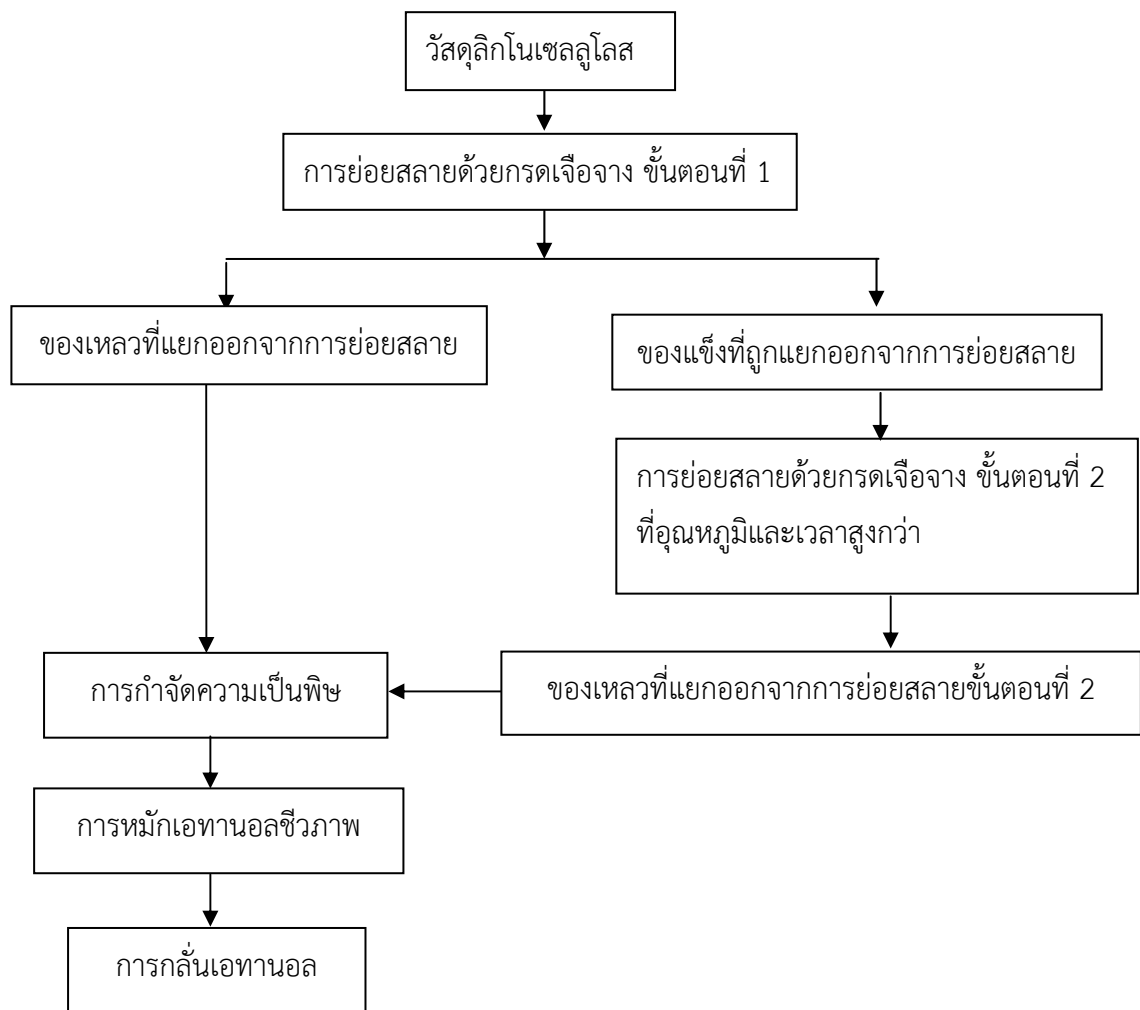
การย่อยสลายไซแลนได้ผลิตภัณฑ์หลักออกมา 8 สารประกอบ คือ น้ำ เมทานอล (methanol) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดโพรไพโอนิก (propionic acid) ไฮดรอกซี-1-โพรพาโนน (hydroxyl-1-propanone) ไฮดรอกซี-1-บิวทาโนน (hydroxyl-1-butanone) และ 2-ฟอฟูรอลดีไฮด์ (2-furfuraldehyde) ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ไซโลสถูกย่อยสลายต่อไปเป็นฟอฟูรอล ทำนองเดียวกัน การย่อยสลายเฮกโซสจะได้ 5-ไฮดรอกซีเมทิล ฟอฟูรอล หรือ HMF (5-hydroxymethyl furfural) ส่วนเซลลูโลสถูกย่อยเป็นกลูโคส ดังสมการ



การย่อยสลายด้วยสารเคมี (chemical hydrolysis) คือการนำวัสดุ lignocellulosic มาทำปฏิกิริยากับสารเคมีโดยใช้เวลาที่อุณหภูมิเฉพาะเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากสายไซโลสและเฮมิเซลลูโลส ในกระบวนการย่อยสลายด้วยสารเคมีนี้อาจจะเป็นการปรับสภาพเบื้องต้นควบคู่กับการย่อยในขั้นตอนเดียว ส่วนมากใช้กรดซึ่งอาจเป็นกรดเจือจางหรือกรดเข้มข้น

กระบวนการย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง เป็นเทคโนโลยีเก่าแก่ที่สุดใช้สำหรับเปลี่ยนเซลลูโลสในชีวมวลเป็นเอทานอลชีวภาพ กระบวนการนี้ดำเนินการภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงในเวลาสั้นเป็นวินาทีหรือนาทีและต่อเนื่อง สารละลายกรดที่ใช้คือ 1% H_2SO_4 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิประมาณ 488 K หรือ 215 องศาเซลเซียส ผลได้น้ำตาลประมาณ 50% การรวมปฏิกิริยาจากกรดและอุณหภูมิสูงต้องใช้วัสดุของเครื่องปฏิกรณ์เฉพาะ จึงทำให้มีราคาแพง ปฏิกิริยาอันดับแรกเปลี่ยนวัสดุเซลลูโลสเป็นน้ำตาลและอันดับสองเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นสารเคมีอื่น ซึ่งทั้งสองปฏิกิริยาเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน

การย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง จึงแบ่งกระบวนการออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ดำเนินการที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อเพิ่มผลได้ของเฮมิเซลลูโลสให้มากที่สุด (0.7% H_2SO_4 , 463 K) ให้ได้น้ำตาลคาร์บอน 5 ขั้นตอน ที่ 2 ที่อุณหภูมิสูงเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสส่วนที่อยู่ในวัตถุดิบที่สภาวะเหมาะสม (488 K, 0.4% H_2SO_4) เปลี่ยนเป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 จากการทดลองใหม่ๆ พบว่ากระบวนการ 2 ขั้นตอนนี้ (3 นาทีต่อขั้นตอน) ผลได้คือ 89% แมนโนส 82% กาแลคโทส แต่ได้กลูโคสเพียง 50% และกลูโคสนี้เปลี่ยนเป็นเอทานอลซึ่งมีผลได้สูงสุดเท่ากับ 90% ของทฤษฎี แผนภาพของการย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แผนภาพของการย่อยสลายด้วยกรดเจือจาง (ขั้นตอนที่ 1 และ ขั้นตอนที่ 2) และการหมักแบบแยกของน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซส (ที่มา: Balat, 2011)

กระบวนการย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้น มีจุดประสงค์เพื่อให้เฮมิเซลลูโลสปลดปล่อยน้ำตาลออกมาในขั้นตอนต่อมาต้องการให้ชีวมวลแห้ง ตามด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (70-90%) ความเข้มข้นของกรดที่ใช้อยู่ในช่วง 10-30% เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยามากกว่าการใช้กรดเจือจาง กระบวนการนี้ให้การเปลี่ยนจากเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ และรวดเร็ว และน้ำตาลเพนโทสเกิดได้น้อย ปัจจัยวิกฤตต้องทำให้กระบวนการนี้เป็นไปได้ทางเศรษฐศาสตร์คือน้ำตาลที่ได้ควบคู่กับต้นทุนของกรดที่ใช้และการหมุนเวียนกรดมาใช้ซ้ำ ผลได้ของเอทานอลจากการย่อยสลายลำต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ดังตารางที่ 2.3 การใช้กรดเข้มข้นสามารถลดต้นทุนการผลิตมากกว่าการใช้กรดเจือจาง อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่ตามมาคือ ด้านสิ่งแวดล้อมและการกัดกร่อน รวมทั้งต้นทุนการใช้กรดสูงและอุปสรรคทางเศรษฐศาสตร์ของการหมุนเวียนกรดมาใช้ใหม่

ตารางที่ 2.3 ผลได้ของเอทานอลชีวภาพจากการย่อยสลายลำต้นข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
(ที่มา: Balat, 2011)

ปริมาณลำต้นข้าวโพด (กิโลกรัม)	1000
ปริมาณเซลลูโลส (กิโลกรัม)	430
ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเซลลูโลสและการผลิต (% dry weight)	76
ผลได้เอทานอลชีวภาพทางทฤษฎี (% dry weight)	51
ประสิทธิภาพการหมักกลูโคส (% dry weight)	75
ผลได้เอทานอลชีวภาพจากน้ำตาลกลูโคส (กิโลกรัม)	130
ปริมาณลำต้นข้าวโพด (กิโลกรัม)	1000
ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (กิโลกรัม)	290
ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสและการผลิต (% dry weight)	90
ผลได้เอทานอลชีวภาพทางทฤษฎี (% dry weight)	51
ประสิทธิภาพการหมักไซโลส (% dry weight)	50
ผลได้เอทานอลชีวภาพจากน้ำตาลไซโลส (กิโลกรัม)	66
ผลได้เอทานอลชีวภาพทั้งหมดจากลำต้นข้าวโพด 1000 กิโลกรัม	196
	(225.7 ลิตร = 59 แกลลอน)

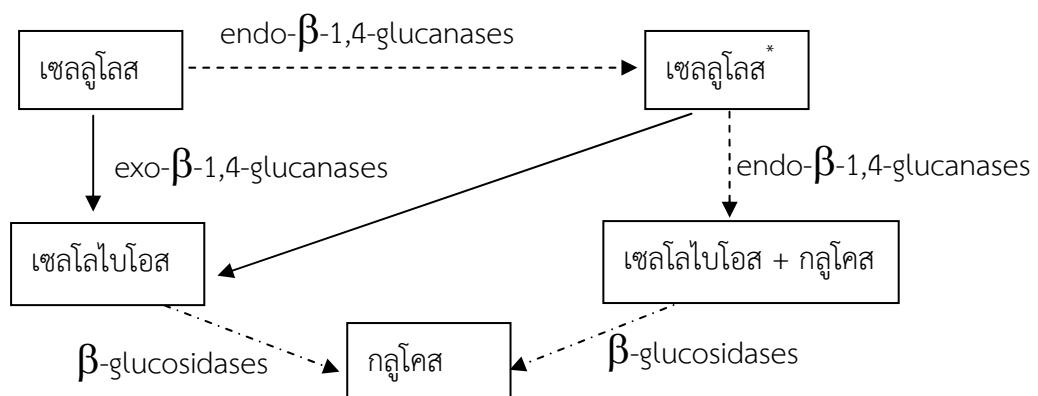
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)สามารถนำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคสได้ดีกว่าการย่อยสลายด้วยกรด ถึงแม้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ เพราะปัจจัยโครงสร้างของสับسترที่เป็นอุปสรรคและขัดขวางการเข้าถึงของเอนไซม์ ได้แก่ ปริมาณของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส พื้นที่ผิวและความเป็นผลึกของเซลลูโลส ต้นทุนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดหรือต่าง เพราะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ใช้สภาวะอ่อน ไม่รุนแรง (พีเอช 4.8) และอุณหภูมิไม่สูงมากนัก (318-323 K) และไม่มีปัญหาคัดกร่อน ผลได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สูง (75-85%) และมีการพัฒนางานวิจัยอย่างต่อเนื่องตลอด 10 ปีที่ผ่านมา (85-95%) การเปรียบเทียบสถานะและสมรรถนะของกระบวนการที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลส 3 แบบ ดังตารางที่ 2.4 ทางเลือกหนึ่งคือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยใช้เอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส) เพื่อไฮโดรไลซ์ลิกโนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลที่สามารถทำการหมักได้ (fermentable sugar)

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีเป้าหมายสลายพันธะพอลิเมอร์ของพอลิแซคคาไรด์ในน้ำที่อยู่ในส่วนของแข็งที่ยังคงเหลืออยู่หลังจากการปรับสภาพเบื้องต้น ผลิตภัณฑ์พอลิแซคคาไรด์ที่ได้ส่วนใหญ่หลังการปรับสภาพเบื้องต้นคือ **เซลลูโลส** เอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบสภาวะและสมรรถนะของกระบวนการที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลส 3 แบบ
(ที่มา: Balat, 2011)

ย่อยสลายโดยใช้	สารเคมี	อุณหภูมิ (K)	เวลา	ผลได้น้ำตาล	ใช้ประโยชน์
กรดเจือจาง	<1% H ₂ SO ₄	488	3 นาที	50-70	ปัจจุบัน
กรดเข้มข้น	30-70% H ₂ SO ₄	313	2-6 ชั่วโมง	90	ปัจจุบัน
เอนไซม์	เซลลูเลส	323	1.5 วัน	75 → 95	ปัจจุบัน → 2020

กลุ่มแรกคือ endo- β -1,4-glucanases (EG, EC 3.1.2.4) เข้าไปจับส่วนในของสายโซ่เซลลูโลส (endogenous part), กลุ่มสองคือ exo- β -1,4-glucanases หรือ cellobiohydrolases (CBH, EC 3.2.1.91) เข้าไปจับส่วนปลายสุดของสายโซ่พอลิเมอร์ แตกพันธะสายโซ่ปลดปล่อยเซลโลไบโอส ในที่สุดกลุ่มสามคือเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidases, BG, EC 3.2.1.21) หรือเซลโลไบแอส (cellobiase) เข้าไปย่อยเซลโลไบโอสได้เป็นกลูโคส 2 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (ที่มา: Balat, 2011)

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ที่เรียกว่าเซลลูเลส เอนไซม์เหล่านี้ได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียและรา ซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่ต้องการอากาศหรือไม่ต้องการอากาศ หน่ออุณหภูมิปานกลางหรือสูง แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสอย่างมีประสิทธิภาพ คือ *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* และ *Streptomyces* ส่วนราที่ถูกนำมาใช้ผลิตเซลลูเลส ได้แก่ *Sclerotium rolfsii*, *P.chrysosporium* และ สายพันธุ์ของ *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* และ *Penicillium* ราสายพันธุ์ *Trichoderma* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (*T. viride*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum*) ได้รับการยอมรับว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ดีและใช้ทำลายเซลลูโลสผลึกได้ดีมาก ผลิตภัณฑ์เซลลูเลสทางการค้าแยกมาจาก *T. reesei* ถูกใช้มานานตั้งแต่อดีตในอาหารธัญพืช

อุตสาหกรรมเหล้า เบียร์ ผลไม้และผัก ปัจจุบันได้นำมาใช้ผลิตเอทานอลชีวภาพ *T. reesei* ผลิตปล่อยเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร

เซลลูเลสคือกลุ่มของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจากการเติบโตของราและทำการย่อยสลายเซลลูโลส ดังรูปที่ 2.5 กลไกที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางสำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยการทำงาน (synergistic actions) ร่วมกันของเอนไซม์ต่างๆ คือเอ็นโดกลูคาเนส (EG) เอ็กโซกลูคาเนส หรือเซลโลไบโอไฮโดรเลส (CBH) และเบต้า-กลูโคซิเดส (BGL) เอนไซม์ EG เข้าไปย่อยสลายพันธะ β -1,4-glycosidic ที่อยู่ระหว่างสายโซ่หลักของเซลลูโลสแบบสุ่มเพื่อผลิตปลายสายโซ่ใหม่ CBH เข้าไปตัดที่ปลายสายโซ่เซลลูโลสเพื่อปลดปล่อยเซลโลไบโอสหรือกลูโคสละลายน้ำได้ และ BGL ย่อยสลายเซลโลไบโอสเป็นกลูโคสเพื่อที่จะกำจัดการยับยั้งที่เกิดจากเซลโลไบโอส BGLทำให้กระบวนการย่อยสลายสมบูรณ์ด้วยการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของเซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส การเสริมกลุ่มของเบต้า-กลูโคซิเดสในการย่อยสลายเป็นสิ่งที่ต้องการ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ได้รับจาก *T. reesei* ไม่เพียงพอเพื่อป้องกันการถูกยับยั้งที่เป็นผลมาจากการสะสมของเซลโลไบโอส ระหว่างการย่อยสลายเซลลูโลส คุณลักษณะของสับสเตรทของแข็งแปรผัน ประกอบด้วย (1) ปลายสายโซ่เซลลูโลสเปลี่ยนแปลงจำนวนเป็นผลจากการเกิดโดย EG และการใช้โดย CBH และ (2) การเข้าถึงของเอนไซม์ที่สายโซ่เซลลูโลสเปลี่ยนแปลง เป็นผลมาจากการใช้สับสเตรทและการแตกของเซลลูโลสออกเป็นโมเลกุลเล็กลง

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ คือ สับสเตรท กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) สภาพของปฏิกิริยา (อุณหภูมิ พีเอชและตัวแปรอื่นๆ) และการยับยั้งที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ (product inhibition) การวิจัยควรมุ่งเน้นกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงผลได้และอัตราการย่อยสลาย รวมทั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ขึ้นกับลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลส ลักษณะของเซลลูโลสที่ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายประกอบด้วย (1) โครงสร้างโมเลกุลเซลลูโลส (2) ความเป็นผลึกของเซลลูโลส (3) พื้นที่ผิวของเส้นใยเซลลูโลส (4) องค์การบวมของเส้นใยเซลลูโลส (5) องศาของพอลิเมอร์ไรซ์เซชัน (6) การมีลิกนินหรือสารอื่นๆ รวมอยู่ ความเข้มข้นสับสเตรทน้อยทำให้ผลได้และอัตราต่ำ และถ้าเพิ่มปริมาณเซลลูเลสที่ต้องการให้สูงขึ้นอาจทำให้ต้นทุนเพิ่มขึ้น ความต้องการปริมาณเซลลูเลสเท่ากับ 10 FPU (filter paper unit) ต่อกรัมของชีวมวล มักจะใช้ในการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเพราะว่าโปรไฟล์ของการย่อยสลายให้ผลได้น้ำตาลระดับสูงในเวลา (48-72 ชั่วโมง) และราคาของเอนไซม์ที่สมเหตุผล

ข้อจำกัดหนึ่งของการใช้เซลลูเลสคือมีการลดลงของอัตราเนื่องจากเกิดการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (เซลโลไบโอส และกลูโคส) ขึ้น การใช้การหมักแบบรวมปฏิกิริยา (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ โดยการย่อยสลายเซลลูโลสไปพร้อมๆ กับการหมักผลิตภัณฑ์น้ำตาลไปเป็นเอทานอลในเวลาเดียวกัน

การย่อยสลายเอมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ถ้ามีเอนไซม์ตัวช่วยเพิ่ม ได้แก่ เอมิเซลลูเลส (hemicellulases) และลิกนินเนส (ligninases) อาจเพิ่มการย่อยสลายพันธะกิ่งรอบสายโซ่หลักได้มาก

ขึ้นโดยทำให้เอนไซม์เข้าถึงสายโซ่หลักเซลลูโลสได้สะดวกยิ่งขึ้น ปัญหาของอุตสาหกรรมเอทานอลจากวัสดุกลีโนเซลลูโลสคือ ราคาการผลิตเอนไซม์สูงและการย่อยสลายชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นจำเป็นต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป จึงต้องมีวิธีการปรับปรุงต่างๆ ขึ้น เพื่อให้เอนไซม์ใหม่ๆ ที่มีราคาถูกลงและใช้ในปริมาณไม่มากนัก

แหล่งอุตสาหกรรมหลักของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสคือเชื้อราที่ทนอุณหภูมิปานกลาง คือ ไตรโคเดอร์มา รีซีอี (*mesophilic soft-rot fungus, Trichoderma reesei*) หรือเรียกว่า *Hypocrea jecorina* เนื่องจากเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปแบบสัณฐานจะมีความสามารถขับโปรตีนได้สูง การผลิตเอนไซม์โดยใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจากเซลลูโลสชีวมวล ไตรโคเดอร์มา รีซีอี จึงเป็นสายพันธุ์ที่มีสมรรถนะสูงในการผลิตเซลลูเลสผสม (native cocktail) โดยร้อยละ 90 ของเอนไซม์ผสมถูกขับออกมาจากไตรโคเดอร์มา รีซีอี ได้แก่ CBH I, CBH II, EG I และ EG II ในสัดส่วนโดยประมาณ 60:20:10:10 ส่วนร้อยละน้อยกว่า 1 เชื้อราชนิดนี้ขับเบต้า-กลูโคซิเดส อย่างไรก็ดีตาม เอนไซม์ผสมที่ได้ตามธรรมชาติได้จากสภาวะที่ไม่เหมาะสม จึงต้องปรับปรุงการย่อยสลายกลีโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ผสมบริสุทธิ์ ปัจจุบันได้ใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวเคมีเพื่อการปรับปรุงเอนไซม์จากไตรโคเดอร์มา รีซีอี อย่างเต็มที่

การหมักเอทานอลจากกลีโนเซลลูโลส น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสคือ โมเลกุลน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (hexose) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และโมเลกุลน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลเพนโทส (pentose) ไซโลส (xylose) และอะราไบโนส (arabinose) ผสมกันอยู่ในสารยับยั้ง ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และฟีนอลิก ยีสต์خمปังแซคคาโรมายซิส ซีรีวีซีอี ซึ่งใช้กันมานานมากในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลเหล่านี้ แต่มีความสามารถต่ำในการเปลี่ยนน้ำตาลเพนโทส ไซโลส และอะราไบโนส จึงต้องทำการปรับปรุงจุลินทรีย์ที่ปลดปล่อยเอนไซม์ที่สามารถใช้ย่อยสลายน้ำตาลดังกล่าวได้

การหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกริยา (SSF) จากกลีโนเซลลูโลส ในกระบวนการนี้มีน้ำตาลเข้มข้นน้อยเหลืออยู่ในถังปฏิกรณ์และมีการกระตุ้นให้หมักไซโลสได้โดยไม่ถูกยับยั้งการถ่ายโอนไซโลส การใช้ SSF จึงเป็นการปรับปรุงวิธีการหมักไซโลสด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมจาก *Candida intermedia*

2.3.3 เฮมิเซลลูโลสสำหรับเอทานอลเพื่อพลังงานทดแทน (Girio et al. 2010)

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีอยู่ 2 ใน 3 ของวัสดุกลีโนเซลลูโลส ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรพในการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นการผลิตอันดับที่สอง (second generation ethanol production) จุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนส่วนของเฮมิเซลลูโลสในวัสดุกลีโนเซลลูโลส ไม่ว่าจะอยู่ในรูปของโมโนเมอร์ (monomeric form) หรือกลุ่มของโอลิโกเมอร์ริก (oligomeric form) จะทำให้ผลได้ของเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ น้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสที่ถูกสกัดออกจากวัสดุกลีโนเซลลูโลสโดยใช้สารเคมีจำพวกกรดอะซิติก จะมีสารฟูลเวอริกอยู่ซึ่งเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในระหว่างการย่อยสลายทาง

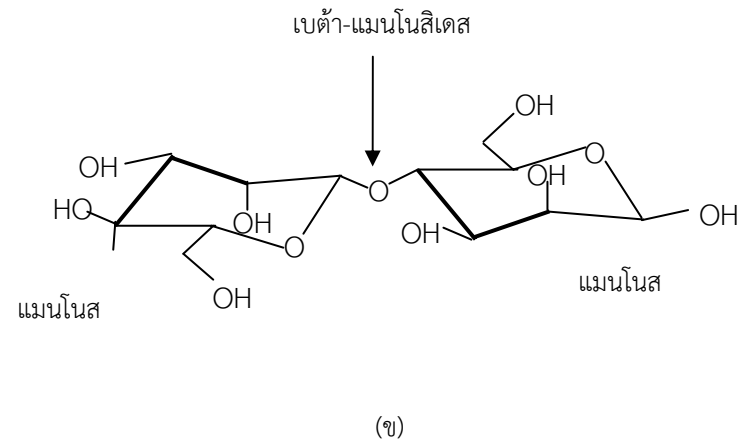
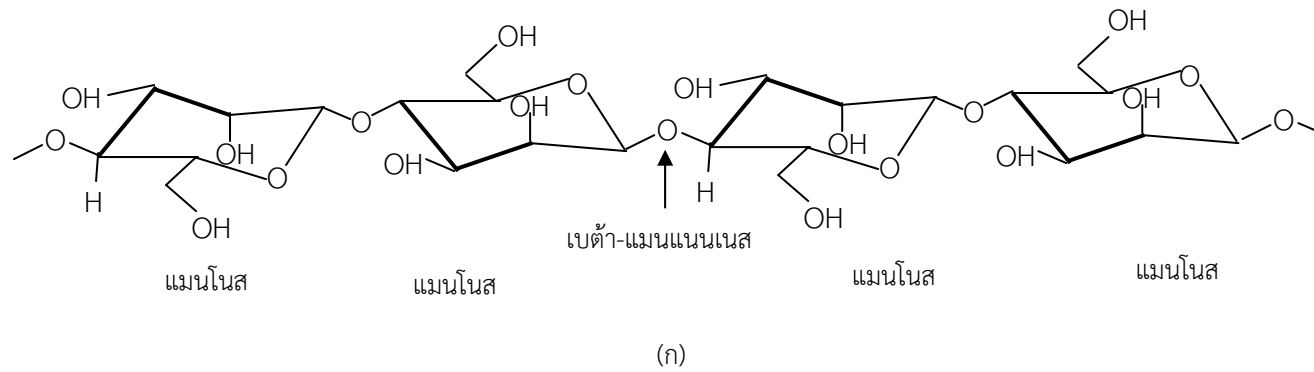
ชีวภาพและการหมักเอทานอล ถ้ายังคงมีลิกนินปนอยู่ด้วยก็จะรบกวนกระบวนการเช่นเดียวกัน ดังนั้น แนวนอนในปัจจุบันจึงต้องมีย่าน้อยที่สุด 3 ขั้นตอน ดังได้กล่าวมาแล้วใน 3.2.2 เพื่อเอาชนะอุปสรรคต่างๆ ในการผลิตเอทานอลทางการค้าโดยใช้วัสดุลิกโนเซลลูโลส

โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีกิ่ง (heterogeneous class of polymer) เป็นองค์ประกอบในพีซีร้อยละ 15-35 ซึ่งเป็นน้ำตาลเพนโทส (β -D-xylose, α -L-arabinose) เฮกโซส (β -D-mannose, β -D-glucose, α -D-galactose) และ/หรือ กรดยูโรนิก (uronic acid, α -D-glucuronic, α -D-4-O-methylgalacturonic and α -D-galacturonic acids) น้ำตาลอื่นๆ ได้แก่ α -L-rhamnose และ α -L-fucose อาจจะมีอยู่ในปริมาณน้อยและกลุ่มของไฮดรอกซิล (hydroxyl-groups) ของน้ำตาลสามารถถูกแทนที่ด้วยกลุ่มของอะเซทิล (acetyl groups) ส่วนพอลิเมอร์สายโซ่ตรง (homopolymers) ของไซโลส เรียกว่า โฮโมไซแลน (homoxylans) พบในสาหร่ายทะเลเท่านั้น (สาหร่ายสีแดงและสีเขียว)

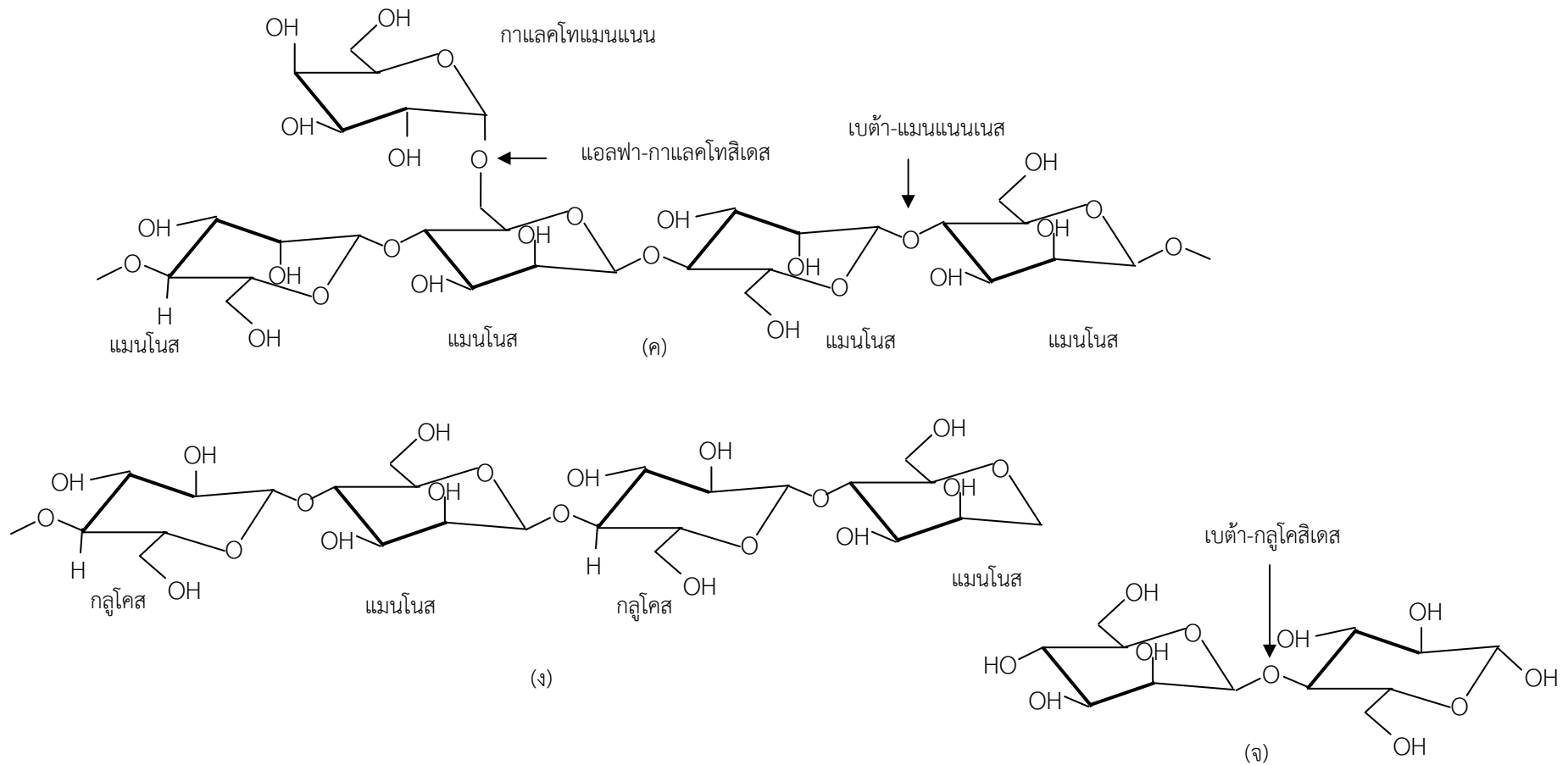
ประเด็นสำคัญของเฮมิเซลลูโลสคือไซแลน (มีปริมาณมากที่สุด) และกลูโคแมนแนน ไซแลนจึงเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์อยู่ร้อยละ 20-30 ของไม้เนื้อแข็ง (hardwood) และลำต้นไม้ (herbaceous plants) ในเนื้อเยื่อของต้นหญ้าและธัญพืชมีไซแลนอยู่ถึงร้อยละ 50 ไซแลนมีปริมาณมากในของเหลือไม้ยืนต้น เกษตรกรรม อุตสาหกรรมเกษตร ไม้และเยื่อใย อุตสาหกรรมกระดาษ สำหรับเฮมิเซลลูโลสชนิดแมนแนน ในรูปของกลูโคแมนแนนและกาแลคโทแมนแนนซึ่งเป็นสารประกอบเฮมิเซลลูโลสหลักของผนังเซลล์ไม้เนื้ออ่อน ขณะที่เปอรอนในไม้เนื้อแข็ง

โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสชนิดต่างๆ ขึ้นกับกำเนิดทางชีววิทยา ดังตารางที่ 2.5 เมื่อเฮมิเซลลูโลสผ่านกระบวนการย่อยสลาย โมเลกุลจะแตกออกเป็นโมโนเมอร์ ดังตารางที่ 2.6 ตามลำดับ

โครงสร้างของแมนแนน (Zyl et al. 2010) แมนแนนแบ่งเป็นกลุ่มหลัก 2 กลุ่ม คือแมนแนนกับกลูโคแมนแนน ขึ้นกับการเชื่อมตำแหน่ง β -1,4 กับสายโซ่หลัก D-mannose ซึ่งถูกแตกโมเลกุลจากแมนแนน หรือการรวมของโมเลกุลของแมนแนนกับ D-glucose ซึ่งแตกโมเลกุลจากกลุ่มกลูโคแมนแนนกลุ่มต่างๆ เหล่านี้แบ่งย่อยการเชื่อมตำแหน่งเป็นการเชื่อม α -1,6 กับกาแลคโทสซึ่งเป็นกลุ่มข้างเคียง (side group) สายโซ่ตรงของแมนแนนและกลูโคแมนแนนประกอบด้วย D-galactose ไม่เกิน 5% (w/w) และเรียกว่ากาแลคโทแมนแนนและกาแลคโทกลูโคแมนแนน ตามลำดับ โครงสร้างของแมนแนน 4 รูปแบบที่แตกต่างกันดังรูปที่ 2.6

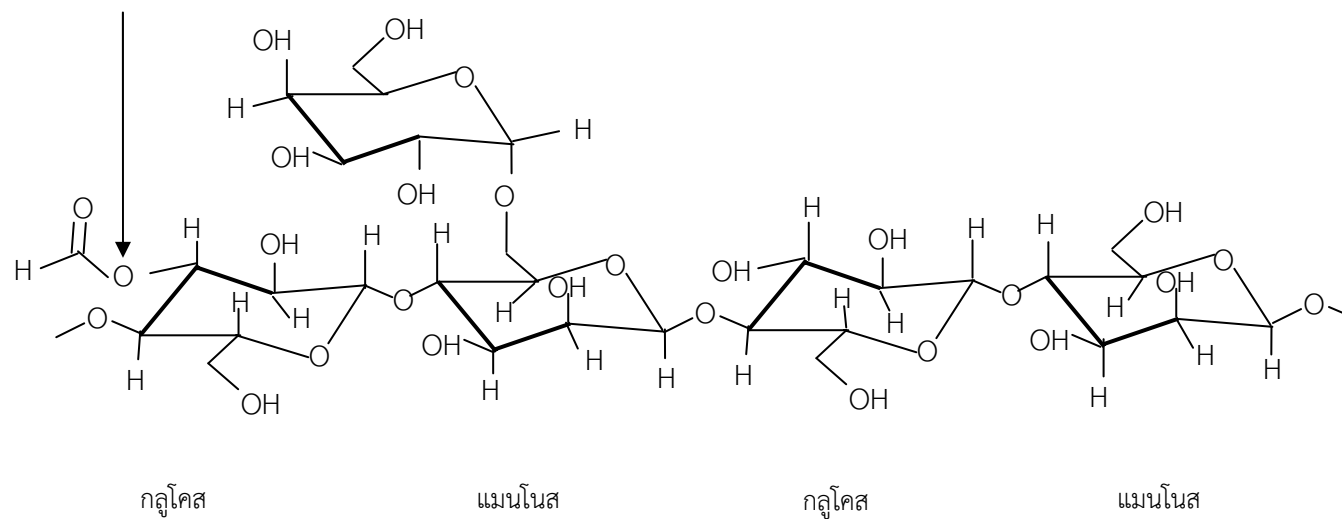


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของแมนแนนและเอนไซม์ที่ต้องการย่อยสลายแมนแนน (ก) สายโซ่ตรงแมนแนน สายโซ่ตรงหลักแมนแนนถูกย่อยสลายด้วย เบต้า-แมนแนนเนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (ข) แอนโนส ซึ่งถูกย่อยต่อไปโดยเบต้า-แอนโนซิเดส (β -annosidase) ผลได้ในที่สุดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส (ที่มา: Zyl et al. 2010)



รูปที่ 2.6 (ต่อ) โครงสร้างของแมนแนนและเอนไซม์ที่ต้องการย่อยสลายแมนแนน (ค) กิ่ง กาแลคโทแมนแนน ถูกแอลฟา-กาแลคโทซิเดส ย่อยและปลดปล่อยกาแลคโทส (ง) สายโซ่ตรงกลูโคแมนแนน และ (จ) กลูโคแมนโนส โอลิโกแซคคาไรด์ (glucomannose oligosaccharides) ซึ่งถูกย่อยต่อไปโดยเบต้า-แอนโนซิเดส (β -annosidase) และเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) ผลได้ในที่สุดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส กลูโคสและกาแลคโทส (ที่มา: Zyl et al. 2010)

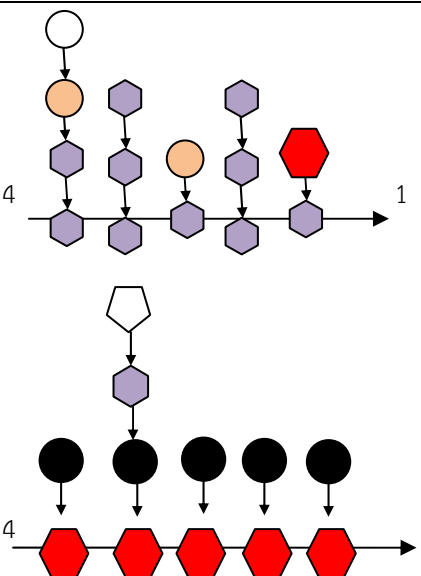
อะเซทิลแมนแนน เอสเตอเรส



(จ)

รูปที่ 2.6 (ต่อ) โครงสร้าง (จ) กิ่ง กาแลคโทกลูโคแมนแนน สายโซ่หลักแมนแนนถูกย่อยสลายด้วย เบต้า-แมนแนนเนส ขณะที่แอลฟา-กาแลคโทซิเดสและอะเซทิลแมนแนน เอสเตอเรส ปลดปล่อยกาแลคโทสและกลุ่มอะเซทิล ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเบต้า-แมนแนนเนส (ข) แอนโนส (annose) และ (จ) กลูโคแมนโนส โอลิโกแซคคาไรด์ (glucomannose oligosaccharides) ซึ่งถูกย่อยต่อไปโดยเบต้า-แอนโนซิเดส (β -annosidase) และเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) ผลได้ในที่สุดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนโนส กลูโคสและกาแลคโทส (ที่มา: Zyl et al. 2010)

ตารางที่ 2.5 ชนิดโพลีแซคคาไรด์หลักที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลส (ที่มา: Girio et al. 2010)

ชนิดโพลีแซคคาไรด์	แหล่งกำเนิด	ตัวย่อ	ปริมาณ ¹	หน่วย			DP ²	สัญลักษณ์
				สายโซ่หลัก	กิ่ง	เชื่อม		
Arabinogalactan	Softwoods	AG	1-3;35 ³	β -D-Galp	β -D-Galp	β -(1→6)	100-600	
Xyloglucan	Hardwoods, grasses	XG	2-25	β -D-Glcp	α -L-Araf	α -(1→3)		
					β -L-Arap	β -(1→3)		
					β -D-Xylp	β -(1→4)		
					β -D-Galp	α -(1→3)		
					α -L-Araf	β -(1→2)		
					α -L-Fucp	α -(1→2)		
					Acetyl	α -(1→2)		

¹ % dry biomass

² Degree of polymerization

β -L-Arap; β -L-Araf; β -D-Galp; β -D-Glcp; β -D-Manp; β -D-Xylp; α -L-Fucp; Feruloyl; Acetyl; 4-O-Me- α -D-GlcpA

³ (up to) in the heartwood of larcges

ตารางที่ 2.5 (ต่อ) ชนิดโพลีแซคคาไรด์หลักที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลส (ที่มา: Girio et al. 2010)

ชนิดโพลีแซคคาไรต์	แหล่งกำเนิด	ตัวย่อ	ปริมาณ ⁴	หน่วย			DP ⁵	สัญลักษณ์
				สายโซ่หลัก	กิ่ง	เชื่อม		
Galactoglucomannan	Softwoods	GGM	10-25	β -D-Manp	β -D-Galp	α -(1 $\rightarrow$ 6)	40-100	
Glucomannan	Softwoods and hardwoods	GM	2-5	β -D-Manp			40-70	
				β -D-Glcp				
Glucuronoxylan	Hardwoods	GX	15-30	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA	α -(1 $\rightarrow$ 2)	100-200	
Arabinoglucuronoxylan	Grasses, cereals, softwood	AGX	5-10	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA β -L-Araf	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)	50-185	

⁴ % dry biomass

⁵ Degree of polymerization



ตารางที่ 2.5 (ต่อ) ชนิดโพลีแซคคาไรด์หลักที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลส (ที่มา: Girio et al. 2010)

ชนิดโพลีแซคคาไรด์	แหล่งกำเนิด	ตัวย่อ	ปริมาณ ¹	หน่วย			DP ²	สัญลักษณ์
				สายโซ่หลัก	กิ่ง	เชื่อม		
Arabinoxylan	Cereals	AX	0.15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf Feruloyl	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)		
Glucuronoarabinoxylan	Grasses, cereals	GAX	15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA Acetyl	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)		
Homoxylan	Algae	X		β -D-Xylp				

¹ % dry biomass

² Degree of polymerization



ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุ lignocellulosic ต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Softwoods								
Douglas fir	6.0	3.0	-	3.7	-	-	-	(1)
Pine	5.3-10.6	20.-4.2	5.6-13.3	1.9-3.8	-	2.6-6.0	1.2-1.9	(2,3)
Spruce	5.3-10.2	1.0-1.2	9.4-15.0	1.9-4.3	0.3	1.8-5.8	1.2-2.4	(2, 4-7)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torget et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Hardwoods								
Aspen	18-27.3	0.7-4.0	0.9-2.4	0.6-1.5	0.5	4.8-5.9	4.3	(1, 2, 4, 8)
Birch	18.5-24.9	0.3-0.5	1.8-3.2	0.7-1.3	0.6	3.6-6.3	3.7-3.9	(2, 4)
Black locust	16.7-18.4	0.4-0.5	1.1-2.2	0.8	-	4.7	2.7-3.8	(2, 9)
Eucalypt	14-19.1	0.6-1	1-2.0	1-1.9	0.3-1	2	3.-3.6	(10-13)
Maple	18.1-19.4	0.8-1	1.3-3.3	1.0	-	4.9	3.6-3.9	(2, 9)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torget et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Hardwoods								
Oak	21.7	1.0	2.3	1.9	-	3	3.5	(14)
Poplar	17.7-21.2	0.9-1.4	3.3-3.5	1.1	-	2.3-3.7	0.5-3.9	(2, 15)
Sweet gum	19.9	0.5	0.4	0.3	-	2.6	2.3	(16)
Sycamore	18.5	0.7	1.0	-	-	-	3.6	(9)
Willow	11.7-17.0	2.1	1.8-3.3	1.6-2.3	-	-	-	(4, 17)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torget et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Agricultural and agro-industrial materials								
Almond shells	34.3	2.5	1.9	0.6	-	-	-	(18)
Barley straw	15	4.0	-	-	-	-	-	(19)
Brewery's spent grain	15	8	0	1	0	2	0.8	(12)
Corn cobs	28-35.3	3.2-5.0	-	1-1.2	1	3	1.9-3.8	(9, 13, 21, 22)
Corn fibre	21.6	11.4	-	4.4	-	-	-	(23)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torget et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Agricultural and agro-industrial materials								
Corn stalks	25.7	4.1	<3.0	<2.5	-	-	-	(24)
Corn stover	14.8-25.2	2-3.6	0.3-0.4	0.8-2.2	-	-	1.7-1.9	(9, 25, 26)
Olive stones	2.0-3.7	1.1-1.2	0.2-0.3	0.5-0.7	0.3-0.5	1.2-2.2	-	(27)
Rice husks	17.7	1.9	-	-	-	-	1.62	(28)
Rice straw	14.8-23	2.7-4.5	1.8	0.4	-	-	-	(23, 26)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torget et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) องค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสของวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่างๆ^{1,2,3} (ที่มา: Girio et al. 2010)

วัตถุดิบ	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	อ้างอิง ⁴
Agricultural and agro-industrial materials								
Sugar cane bagasse	20.5-25.6	2.3-6.3	0.5-0.6	1.6	-	-	-	(29-31)
Wheat bran	16	9	0	1	0	2	0.4	(13)
Wheat straw	19.2-21.0	2.4-3.8	0-0.8	1.7-2.4	-	-	-	(8, 26)

¹ Non-glycosidic units

² Expressed as g/100 g of dry material

³ The percentages of oses were, in some cases, calculated from the corresponding “polymers”. Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; UA, uronic acids; AcG, acetyl groups.

⁴ 1. Schell et al. 1999, 2. Fengel and Wegener 1983, 3. Ballesteros et al. 2000, 4. Taherzadeh et al. 1997, 5. Tengborg et al. 1998, 6. Soderstrom et al. 2002, 7. Soderstrom et al. 2004, 8. Grohmann et al. 1985, 9. Torget et al. 1991, 10. Pereira 1988, 11. Miranda and Pereira 2002, 12. Garrote et al. 1999b, 13. Kabel et al. 2002, 14. Conner 1984, 15. Torget and Hsu 1994, 16. Torget et al. 1990, 17. Sassner et al. 2004, 18. Montane et al. 1994, 19. Magee and Kosaric 1985, 20. Gominho et al. 2001, 21. Ropars et al. 1992, 22. Garrote et al. 2001b, 23. Allen et al. 2001b, 24. Rubio et al. 1998, 25. Torgete et al. 2000, 26. Lee 1997, 27. Fernandez-Bolanos et al. 2004, 28. Vila et al. 2002, 29. Dekker and Wallis 1983, 30. Neureiter et al. 2002; Aguilar V 2002.

2.4 เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ต้องการใช้เพื่อย่อยลิกโนเซลลูโลส (Dyk et al. 2012)

เอนไซม์หลายชนิดที่มีคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ถูกนำมาใช้ย่อยองค์ประกอบทั้งหมดของลิกโนเซลลูโลสได้ตามต้องการ ตารางที่ 2.7 แสดงชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเชิงซ้อน เอนไซม์ที่ได้รับการยอมรับในการย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นโมโนเมอร์ของน้ำตาลมีอยู่ 3 ชนิด คือ

ก. exo-1,4- β -glucanase, EC 3.2.1.91 และ EC 3.2.1.76 (cellobiohydrolase)

ข. Endo-1,4- β -glucanase, EC 3.2.1.4

ค. β -glucosidase แบ่งเป็น EC 3.2.1.21 (cellobiases)

Cellobiohydrolase เข้าไปตัดตรงปลายสายโซ่เซลลูโลส ขณะที่ endo-glucanase ตัดสายโซ่เซลลูโลสตรงกลางและลดองค์ประกอบโพลีเมอร์ลง Cellobiohydrolase อาจจะชอบตัดสายโซ่เซลลูโลสที่เป็นทั้งน้ำตาลรีดิวซิงหรือไม่เป็นรีดิวซิงก็ได้

องค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสแปรผันมากกว่าเมื่อเทียบกับเซลลูโลส ดังนั้นจึงต้องการชนิดของเอนไซม์จำนวนมากเพื่อการย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสามารถแบ่งออกเป็นเอนไซม์ทำลายโพลีเมอร์ซึ่งตัดตรงสายโซ่หลัก (backbone) และเอนไซม์ที่ย้ายกลุ่มแทนที่ซึ่งบดบังการเข้ามาตัดพันธะโพลีเมอร์ออกไป

เอนไซม์แกนสำหรับการย่อยสลายไซแลนไปเป็นโมโนเมอร์คือ endo-xylanases ซึ่งตัดสายโซ่หลักของไซแลนให้สั้นลงเป็น oligosaccharides และ β -xylosidase ซึ่งตัด xylo-oligosaccharide ขนาดสั้นๆ ไปเป็นไซโลส ทำนองคล้ายๆ กัน เอนไซม์แกนสำหรับการย่อยสลายแมนแนนไปเป็นโมโนเมอร์ คือ endo-mannanase และ β -mannosidase อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไป ไซแลนและแมนแนน มีกลุ่มแทนที่ที่แตกต่างกันมาเชื่อมสายโซ่หลัก ได้แก่ อะราไบโนส อะเซทิล กาแลคโทส และกลูโคส ซึ่งต้องการแหล่งรองรับ (host) เอนไซม์รอง (ancillary enzymes) ที่ไม่ใช่เอนไซม์แกน เพื่อให้เอนไซม์แกนเข้าถึงและย่อยสายโซ่หลักได้

เอนไซม์รองต่างๆ ได้แก่ acetyl xylan esterase, β -xylosidase, endo-mannanase, β -mannosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, ferulic acid esterase, α -galactosidase, *p*-coumaric acid esterase และ acetyl mannan esterase เอนไซม์ที่ตัดการเชื่อมระหว่างเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน คือ ferulic acid esterase ส่วน α -L-arabinofuranosidase มีความเฉพาะตรงที่ตัด 1,2 linkages หรือ 1,3 linkages ขณะที่เอนไซม์อื่นๆ สามารถตัดกลุ่มแทนที่ได้ 2 กลุ่มที่เป็น arabinose residues จาก arabinoxylan เอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถย่อยแพคติน pectin methyl esterase ย้ายกลุ่ม methyl จากแพคตินเพื่อให้เข้าถึงการย่อยสลายโพลีเมอร์ด้วยเอนไซม์ ได้แก่ polygalacturonases, pectin lyase หรือ pectate lyase

ตารางที่ 2.7 เอนไซม์หลักบางชนิดที่ต้องการใช้ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสให้เป็นโมโนเมอร์ (ที่มา: Dyk et al. 2012)

ลิกนิน	Laccase, Manganese peroxidase, Lignin peroxidase
แพคติน	Pectin methyl esterase, pectate lyase, polygalacturonase, rhamnogalacturonan lyase
เฮมิเซลลูโลส	Endo-xylanase, acetyl xylan esterase, β -xylosidase, endo-mannanase, β -mannosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, ferulic acid esterase, α -galactosidase, <i>p</i> -coumaric acid esterase
เซลลูโลส	Cellobiohydrolase, endo-glucanase, β -glucosidase

ยิ่งไปกว่านั้น rhamnogalacturonases และ rhamnogalacturonan lyase เข้าย่อยสลาย “hairy regions” ในแพคติน ขณะที่ pectin acetyl esterases ย้าย acetyl group จาก acetylated homogalacturonan และ rhamnogalacturonan

จุลินทรีย์ที่ผลิตระบบเอนไซม์ 2 ชนิดสำหรับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสใช้ชื่อว่า ระบบอิสระ (free system) และ ระบบเชิงซ้อน (complexed system) ระบบอิสระเกิดกับแบคทีเรียและเชื้อราที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria and fungi) ที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger*

ระบบเชิงซ้อนเกิดขึ้นเป็นมัลติเอนไซม์เชิงซ้อน (multienzyme complexes) มีชื่อ cellulosome ซึ่งส่วนใหญ่พบในแบคทีเรียไม่ต้องการอากาศ ได้แก่ *clostridi*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Acetovibrio cellulolyticus*

2.5 กระบวนการหมักสถานะของแข็ง (solid-state fermentation) เพื่อผลิตเอนไซม์ (Singhan et al. 2009)

การหมักสถานะของแข็งหรือเรียกสั้นๆ ว่า การหมักแข็งหรือ SSF คือกระบวนการหมักประกอบด้วยชั้นสับสเตรทของแข็ง (solid matrix) ที่ไม่มีน้ำหรือปราศจากน้ำอิสระ อย่างไรก็ตาม สับสเตรทจะต้องมีระดับความชื้นเริ่มต้นเพื่อสนับสนุนการเติบโตและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ชั้นของแข็งเป็นทั้งแหล่งของสารอาหารและเป็นที่ยึดเกาะของสารอาหารอย่างง่ายเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การหมักแข็งใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนสับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง SSF คล้ายกับที่อยู่ของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและเป็นตัวเลือกให้กับจุลินทรีย์เติบโตและเพิ่มมูลค่าโดยปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ออกมา ส่วนการหมักกึ่งเหลว (submerged fermentation) หรือ SmF ถูกพิจารณาเป็นสิ่งที่ทำลายต่อที่อยู่ตามธรรมชาติของจุลินทรีย์ ยกเว้นจุลินทรีย์ที่อยู่ในทะเลที่ชอบอยู่ในน้ำอิสระมากกว่า

เพราะว่ามากกว่า 98% ของจุลินทรีย์ที่แยกได้มาจากผิวของแข็งที่อยู่ใต้น้ำทะเล เราปรับตัวได้ดีเมื่อใช้เทคนิคของกระบวนการ SSF ในระดับห้องปฏิบัติการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อเมแทบอลิซึมของรา SSF นำไปใช้ในการทำปุ๋ยหมักทางหนึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือทางเกษตรกรรมทำให้มีความคุ้มค่าด้านเศรษฐศาสตร์และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ในอดีตกระบวนการหมักทั้งหมดใช้หลักการของเทคโนโลยีการหมักแข็ง หลังจากปี ค.ศ. 1940 ประเทศตะวันตกให้ความสำคัญมากกับกระบวนการ SmF ซึ่งใช้ในการผลิตยาเพนนิซิลิน ทำให้ SSF ลดความนิยมลง ระหว่างปี ค.ศ. 1950-1960 กระบวนการ SSF ได้ถูกนำมาใช้ผลิตยาเตียรอยด์จากการเพาะเลี้ยงรา ระหว่างปี ค.ศ. 1960-1970 ได้ใช้ SSF ผลิตโปรตีนเสริมเป็นอาหารของวัวโดยใช้ของเหลืออุตสาหกรรมเกษตร นับเป็นการใช้วัตถุดิบต้นทุนต่ำทำให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น นับแต่นั้นมามีการนำ SSF ไปใช้ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพต่างๆ ในอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ข้อดีของ SSF มีมากกว่า SmF จึงถูกนำมาใช้ด้านการจัดการของเสีย การอนุรักษ์พลังงานชีวมวล และการผลิตอาหาร เชื้อเพลิง เทคโนโลยีที่สามารถตัดแต่งพันธุกรรมสายพันธุ์ราใช้ SSF ในการผลิตเช่นเดียวกัน

SSF เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์และราตามทฤษฎีของกิจกรรมของน้ำ (water activity) สำหรับแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้มีการศึกษาการผลิตสารพิษบนรำข้าวสาลีพบว่ามีประสิทธิภาพคุ้มทุน (cost effective)

ปัจจัยสำคัญที่สุดซึ่งมีผลต่อ SSF คือความชื้น และธรรมชาติของสับสเตรทที่นำมาใช้ การเลือกความชื้นขึ้นกับจุลินทรีย์ที่นำมาเพาะเลี้ยงและธรรมชาติของสับสเตรทด้วยเช่นกัน เราต้องการความชื้นต่ำ ประมาณ 40-60% ก็เพียงพอ แต่การเลือกสับสเตรทขึ้นกับหลายปัจจัย ปัจจัยหลักคือราคาและการใช้ประโยชน์รวมทั้งต้องคัดกรองของเหลืออุตสาหกรรมเกษตรด้วย

ปัจจุบันสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วมาก เราต้องการความก้าวหน้าของเทคโนโลยีเพื่อเร่งนวัตกรรมเป็นด้านหลัก SSF เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่มีความได้เปรียบที่ถูกนำไปใช้ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มอัตราการผลิต ของการหมักให้สูงขึ้น ความเข้มข้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์สูงได้ผลิตภัณฑ์ที่เสถียรภาพ การเพาะเลี้ยงเชื้อราผสม ต้องการความปลอดภัยต่ำเพราะกิจกรรมของน้ำที่ใช้ใน SSF มีค่าต่ำ ความท้าทายคือการทำผลิตภัณฑ์สุดท้ายให้บริสุทธิ์ ขณะที่ปัจจุบัน มีความก้าวหน้าทางวิศวกรรมชีวเคมี เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมากมายได้รับการออกแบบซึ่งสามารถเอาชนะอุปสรรคต่างๆ ของการขยายระดับการผลิตรวมทั้งสามารถเฝ้าติดตามการถ่ายโอนความร้อนและมวลอย่างต่อเนื่องได้โดยใช้เครื่องมือวัดอัตโนมัติ

การขยายขนาด SSF ยังคงมีอุปสรรคด้านการถ่ายโอนความร้อนและมวลภายในชั้นของสับสเตรท การติดตามตัวแปรต่างๆ หลากๆ ตัวแปรแบบ on-line และการผสมของเบดอย่างเพียงพอ โดยไม่มีการทำลายจุลินทรีย์ รวมทั้งขนาดอนุภาคของเบด ความร้อนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมเมแทบอลิกของการเติบโตของจุลินทรีย์ ความร้อนที่เกิดขึ้นอาจทำให้จุลินทรีย์ตายตอนท้ายของกระบวนการ ความชื้นที่มากเกินไปทำให้ความพรุนของสับสเตรทต่ำลง ทำให้ออกซิเจนแทรกซึมผ่านเข้าไปไม่ได้หรือได้น้อยลง

ขณะที่ความชื้นน้อยเกินไปทำให้การเข้าถึงของสารอาหารไม่ดีผลทำให้ขัดขวางการเติบโตของจุลินทรีย์ การแก้ปัญหาความยากสำหรับสมรรถนะเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพต้องได้รับการค้นคว้าในลำดับต่อไป

Singhan, et. al., 2010. ได้นำเสนอว่าเซลลูโลสเป็นที่ต้องการของตลาดและเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งการผลิตเอทานอลจากการเปลี่ยนชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ด้วยเซลลูเลสเป็นหลัก การผลิตเซลลูเลสให้มีประสิทธิภาพจึงต้องปรับปรุงพัฒนาเทคโนโลยีกระบวนการทางชีวภาพ การหมักแข็ง และการหมักกึ่งเหลว ในรายงานนำเสนอผู้ผลิตรายใหญ่ที่ผลิตเซลลูเลสทางการค้าและจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอโนไซม์ รวมทั้งชนิดของกระบวนการทางชีวภาพ สายพันธุ์ จุลินทรีย์สับสเตรตที่ใช้ ขนาดของการหมัก เอโนไซม์ แอคทิวิตี ในการผลิตเซลลูเลส ซึ่งมีตั้งแต่ระดับขวด เชย่จนถึงถังหมักขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 2 ลิตร ถึง 700 ลิตร หรือถังหมักชนิดถาด ในรายงานอ้างถึงการผลิตเซลลูเลสโดย SSF มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์มากกว่า SmF ประมาณ 10 เท่า โดยการใช้การเพาะเลี้ยงรา *T. reesei* ในอาหารเหลวที่มีเกลือแร่ต่างๆ การผลิตเซลลูเลสโดยใช้ของเหลือจากเกษตรกรรมเป็นสับสเตรตภายใต้ SSF นับเป็นการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในปัจจุบันและในอนาคตเพื่อการผลิตในระดับการค้าที่ใช้วัตถุดิบเซลลูโลสในธรรมชาติที่มีราคาถูก เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก SSF มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ พีเอช อีออนของโลหะ ฯลฯ SSF คือเทคโนโลยีที่พอเพียงต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเอทานอลเพื่อพลังงานทดแทน

2.6 กระบวนการหมักกึ่งเหลว (submerged fermentation) เพื่อผลิตเอทานอล (Singhan, et. al., 2010)

การหมักกึ่งเหลวหรือ SmF คือการหมักในที่ที่มีน้ำอยู่มากเกินไป (excess water) ส่วนใหญ่ การผลิตเอโนไซม์ในระดับใหญ่ (large-scale) ใช้เทคโนโลยี SmF เพราะผลิตได้อย่างต่อเนื่องและง่ายต่อการดำเนินการ เซลลูเลสการค้าส่วนใหญ่ได้จากการเพาะเลี้ยง *T. reesei* หรือ *A. niger* ในอาหารเหลว หรือ SmF การผลิตเซลลูเลสในเชื้อดังกล่าวได้รับผลกระทบจากพารามิเตอร์ต่างๆ เป็นอย่างมาก ซึ่งประกอบด้วย ธรรมชาติของเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรต พีเอชของอาหารเหลว สารอาหารที่อยู่ในน้ำ (nutrient) การเพิ่มสารเหนี่ยวนำ (inducer supplementation) อุณหภูมิของการหมัก การผลิตเซลลูเลส ในระดับใหญ่ต้องการความเข้าใจและการควบคุมการเติบโตและความสามารถของเชื้อที่นำมาใช้เป็นผู้ผลิต (producer) ที่เหมาะสม เซลลูเลสที่ผลิตได้จากราเส้นใย *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Humicola* สามารถผลิตได้ที่ช่วงของพีเอชและอุณหภูมิแตกต่างกัน สูตรของอาหารเหลวที่ใช้เป็นสื่อ (media formulation) สำหรับการหมักที่ทำให้การเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดีหรือเหมาะสมนั้นต้องพิจารณาอย่างมีนัยสำคัญเพราะไม่มีสูตรทั่วไป อาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง *T. reesei* นิยมใช้สูตรอาหารเหลวของ Mandels และ Reese หรือ Mandel และ Weber ที่ปรับปรุงหรือไม่ได้ปรับปรุงเพิ่ม อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารเหลวต่างๆ เหล่านี้มีความซับซ้อนอย่างมากเพราะปัจจัยมากมาย และปฏิกิริยาต่างๆ สามารถส่งผลกระทบต่ออัตราการผลิตเซลลูเลสได้

การผลิตเซลลูเลสต้องระวังเกี่ยวกับการนำจุลินทรีย์เซลลูเลส (microbial cellulase) มาใช้ เพราะจุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ภายใต้กลไกการเหนี่ยวนำ (induction mechanism) และการยับยั้ง (repress mechanism) และกระบวนการที่ถูกออกแบบและสูตรอาหารที่ใช้ แลคโทสคือสารเหนี่ยวนำ ยีนส์เซลลูเลสที่รู้จักกันแพร่หลายและนำมาใช้เป็นสารเติม (additive) ในอาหารสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก ส่วนใหญ่การผลิตเซลลูเลสนิยมใช้กระบวนการแบบแบทช์หรือแบบกะ (batch process) การปรับปรุงการผลิตเซลลูเลสที่ต้องใช้เวลาการผลิตยาวนานซึ่งมีข้อจำกัดทางเทคนิค จึงได้มีการพยายามใช้กระบวนการแบบกึ่งกะ (fed-batch) หรือแบบต่อเนื่อง (continuous mode) เพื่อข้ามสาเหตุของการยับยั้งจากการสะสมของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาการหมักนานเพิ่มขึ้นกับอัตราการผลิตที่ลดต่ำลง

ในระบบเซลลูเลส น้ำตาลกลูโคสและเซลโลโอไอโอสคือสารยับยั้งเอนไซม์จึงได้มีความพยายามพัฒนาจุลินทรีย์กลายพันธุ์ที่ต่อต้านตัวยับยั้งดังกล่าวได้ เซลลูเลสที่ได้จาก *T. reesei* เป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำและมีกิจกรรมดีที่สุดเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในตัวกลางที่มีเซลลูโลส ส่วนใหญ่เซลลูโลสบริสุทธิ์เตรียมมาจาก Solka-Floc และ Avicell ในอาหารเหลวให้ผลได้สูง แต่ถ้าใช้วัสดุเซลลูโลสธรรมชาติเป็นแหล่งคาร์บอน ผลได้เซลลูเลสจากจุลินทรีย์ต่ำ แหล่งคาร์บอนหลักของการหมักเซลลูเลสการค้าคือ ชีวมวลเซลลูโลส ได้แก่ ของเหล้าจาก ลำต้น เยื่อ และธัญพืช ข้าว รำข้าวสาลี ชาน ของเสียจากอุตสาหกรรมกระดาษ

การผลิตเซลลูเลสในการเพาะเลี้ยงเกี่ยวข้องกับการเติบโตของจุลินทรีย์ ราเส้นใยมีแนวโน้มเติบโตติดกับผิวและอิทธิพลของชนิดการเติบโตต่อสรีรศาสตร์ของรา (fungal physiology) ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างละเอียด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การนำมาสัมพันธ์กับอัตราการผลิต ภายใต้สภาวะธรรมชาติ ราที่สัมผัสกับผิวต้องการใช้สารอาหาร ปลดปล่อยเอนไซม์ และการเติบโตของยอดไฮฟี ราเส้นใยสามารถเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้น้ำอิสระ การเติบโตของราใน SmF ไม่ใช่ธรรมชาติ การเติบโตบนและภายในสับสเตรทของแข็งคือหลักการเบื้องต้นสัมพันธ์กับการเกาะติดของเซลล์ (adhesion) รูปร่างลักษณะการเติบโตของราเส้นใยเป็นพารามิเตอร์สำคัญสัมพันธ์กับอัตราการผลิตของกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ ในกระบวนการระดับใหญ่ การเติบโตของราเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต