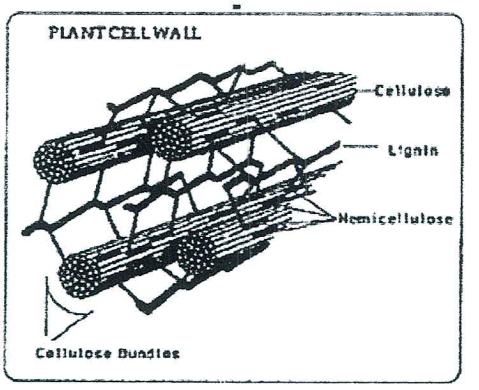
บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1 ลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosics)

ลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosics) เป็นชีวมวลที่เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากที่สุดในโลก จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบไปด้วย เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ยังมีองค์ประกอบอื่นอยู่ในผนังเซลล์ของพืช มีทั้งส่วนที่ต้องทำการสกัด และที่ไม่ต้องสกัด โดยสารที่ต้องทำการสกัดประกอบไปด้วย ไขมัน แว็กซ์ แทนนิน เรซิน เป็นต้น ส่วนสารที่ไม่ต้องสกัด องค์ประกอบส่วนใหญ่คือพวกสารอนินทรีย์ เช่น ซิลิกา คาร์บอเนต ออกซาเลต เป็นต้น (Bharathi และ Ravindra, 2006)

ชีวมวลแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินไม่เท่ากันซึ่งจะขึ้นกับ ชนิดและอายุของไม้ โดยไม้ที่มีลิกนินมาก จะมีความแข็งสูง และในไม้ชนิดเดียวกัน ไม้ที่มีอายุมากจะมีปริมาณลิกนินมาก โดยการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในไม้จะเป็นไป ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในชีวมวล

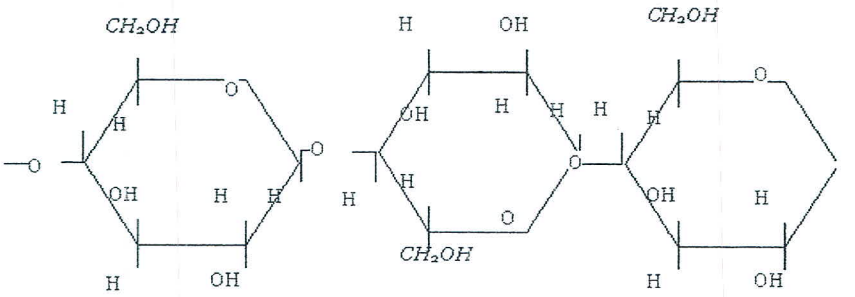
ที่มา: Sjostrom (1981)

ในผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะมีการจัดเรียงตัวดังภาพที่ 1 กล่าวคือ เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะเกิดการรวมกันเป็นมัดของเซลลูโลส (cellulose bundles)ซึ่งมีลิกนินล้อมรอบอยู่ โดยมีเฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลลูโลสกับลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน การจัดเรียงตัวในลักษณะดังกล่าว ทำให้เส้นใยที่อยู่ในผนังเซลล์ มีความแข็งแรงสูงขึ้น

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวล

1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพวกพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลของพืช โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลายหน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ β(1-4)-glycosidic (ภาพที่ 2) เซลลูโลสจะไม่ละลายด้วยน้ำตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ เมื่อไฮโดรไลซ์สลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการไฮโดรลิซิสสลายตัว ไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ และได้โอลิโกแซ็กคาไรด์



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีเซลลูโลส

ที่มา: Chemistryland (2010)

สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจจะสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ ส่วนที่เป็นเซลลูโลสโครงสร้างแบบผลึก (crystalline) นั้นจะมีความคงทนต่อเอนไซม์และกรดมาก ส่วนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนแต่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่มจะเรียกว่าเซลลูโลสแบบหลวม (amorphous) เซลลูโลสธรรมชาติส่วนใหญ่จะ

เป็นเซลลูโลสแบบผลึก หรือโครงสร้างแบบระเบียบ ซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริล มีความแข็งแรงและไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใด ๆ ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด คือ

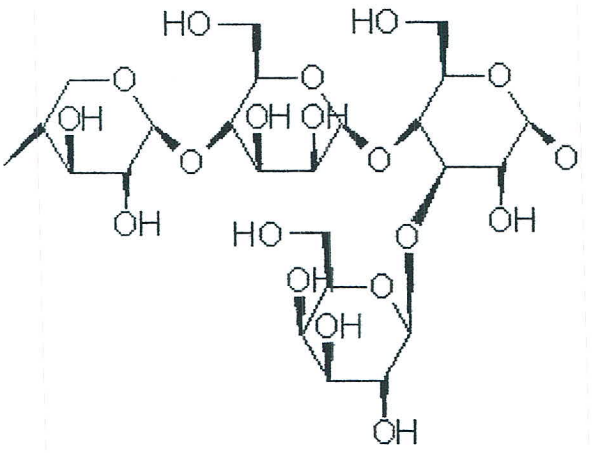
1. แอลฟาเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

2. บีต้าเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

3. แกมมาเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์(วรณี และวิชัย, 2546)

2. เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses)

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรทอสัณฐาน (Amorphous polymeric carbohydrate) พบมากในพวกไม้ใบกว้างและพวกพืชตระกูลหญ้า (ภาพที่ 3) เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 หรือ 6 โมเลกุล น้ำตาลที่ประกอบอยู่ภายในเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ ไซโลส, อะราบิโนส, กลูโคส, กาแลกโตส และแมนโนส เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นพว เฮเทโรไกลแคน (Heteroglycan) คือประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2-4 ชนิด ส่วนเฮมิเซลลูโลสชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียวเรียกว่า โฮโมไกลแคน (Homoglycan) นั้นจะพบเป็นส่วนน้อย ซึ่งชนิดของน้ำตาลและปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของพืช เฮมิเซลลูโลสละลายในสารละลายที่เป็นด่างเจือจาง ปกติจะอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบเพกทินในผนังเซลล์ของพืช โดยส่วนใหญ่แล้วจะพบเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์



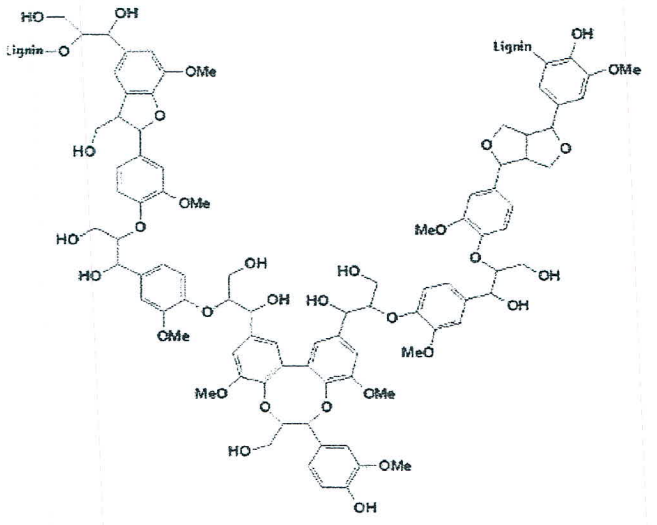
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Princeton (2010)

สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีนัสประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ เพนโทแซน ส่วนใหญ่เป็นไซแลนและอะราบิแนน เมื่อนำไปไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่นเฮกโซแซน ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน กาแลกแทน และกลูแคน เมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาล แมนโนส กาแลกโทส และกลูโคส ตามลำดับ พอลิยูโรไนด์ ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดพอลิยูโรนิกและยังพบกรดยูโรนิกปนอยู่ด้วย ที่สำคัญคือ เฮกซูโลนิก(วรณี และวิชัย, 2546)

3. ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนิน แสดงในภาพที่ 4 ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดเช่น ในเอทานอลหรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ลิกเนส หรือลิกนินเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในรา

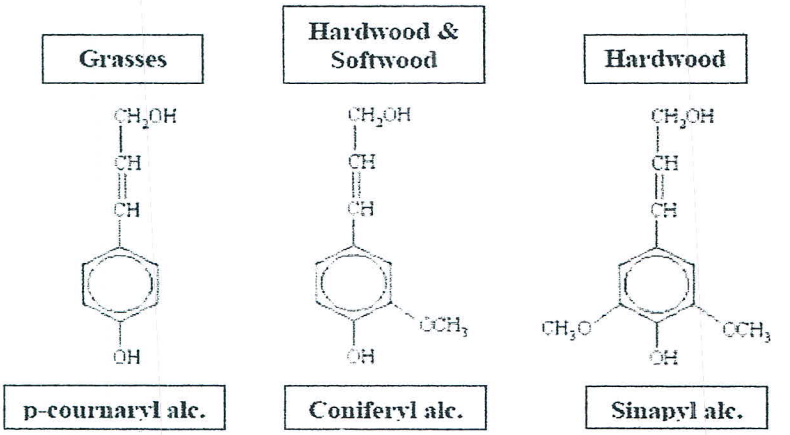


ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

ที่มา: plantphys (2010)

ปกติลิกนินจะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกันและมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย นอกจากนี้ยังพบในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลสทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันเซลลูโลสจากการไฮโดรลิซิสอีกด้วย โดยลิกนินนั้นจัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งของ ปัจจุบันยังไม่สามารถแยกลิกนินบริสุทธิ์ออกมาได้ ดังนั้นการศึกษาถึงโครงสร้างของลิกนินให้ชัดเจนจึงไม่อาจกระทำได้ แต่มีผู้ศึกษาสูตรเคมีซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ซึ่งวิเคราะห์ได้เป็น $C_9H_{8.83}O_{2.37}$ $(OCH_3)_{0.96}$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 3,000–30,000 (วรณี และวิชัย, 2546)

หน่วยย่อยของลิกนิน หรือ Monolignols มีรูปแบบหลัก ๆ ที่พบในธรรมชาติ 3 โมโนเมอร์ แสดงดังภาพที่ 5 โมโนเมอร์ลิกนินชนิด p-coumaryl alcohol พบมากในพืชตะกูลหญ้า ส่วน coniferyl alcohol เป็นโมโนเมอร์ลิกนินที่มีมากในพืชใบแคบ (softwood) ด้านไม้ใบกว้าง (hardwood) พบว่า มีทั้ง coniferyl และ sinapyl alcohols เป็นโครงสร้างหลักในการรวมตัวเป็นลิกนิน โดยในไม้ใบแคบมีลิกนินอยู่ 26-32 เปอร์เซ็นต์ และไม้ใบกว้าง มีลิกนินอยู่ประมาณ 20-28 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 โครงสร้างโมโนเมอร์ของลิกนิน

ที่มา: Noomjapan (2010)

ลิกนินสามารถนำไปใช้ในการผลิตเป็นกาวไม้ ส่วนผสมในคอนกรีต ส่วนผสมในอาหารสัตว์ หรือ ตัวเชื่อมต่อในอาหารสัตว์ สารควบคุมฝุ่นในท้องถนน และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น

2.3 ชนิดของชีวมวล

การศึกษานี้ได้ศึกษาการใช้ชีวมวล 4 ชนิด คือ ยูคาลิปตัส กระถินเทพา ลำต้นปาล์มน้ำมัน และทางใบปาล์ม

1. ยูคาลิปตัส

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ Eucalyptus sp. ชื่อวงศ์คือ Myrtaceae ชื่อสามัญคือ ยูคาลิปตัสชื่อทางการค้าคือ Red gum ยูคาลิปตัสเป็นพันธุ์ไม้ต่างประเทศ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปออสเตรเลียเป็นส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกสภาพดิน ตั้งแต่ดินทราย ดินเค็ม ดินเปรี้ยว แต่ไม่ทนดินที่มีหินปูนสูงทนต่อความแห้งแล้งได้ (ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ, 2550)ความต้องการเยื่อยูคาลิปตัสมีเพิ่มมากขึ้นในตลาดโลกของเยื่อไม้ใบกว้าง โดยจะมีการผลิต รวม 10 ล้านตัน/ปี และทุกปีมีปริมาณการผลิตจะเพิ่มขึ้น 6 เปอร์เซ็นต์ มากเป็นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อไม้ทั่วไป (Patt และคณะ, 2006) โดยองค์ประกอบทางเคมีของยูคาลิปตัสมีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัส *(Eucalyptus globulus)*

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ (เทียบกับน้ำหนักแห้งของชีวมวล)
เซลลูโลส	51.3
ลิกนิน	21.9
ไซแลน	19.9
กลูโคแมนแนน	1.4
สารแทรก	2.5

ที่มา: Patt และคณะ (2006)

2. กระถินเทพา

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Acacia mangium* Willd ชื่อวงศ์คือ Leguminosae-Minosoideae ชื่อสามัญคือ Kra thin te pha (ไทย), Sabah salwood, Tongke hutan หรือ mangge hutan (อินโดนีเซีย) ชื่อทางการค้าคือ Brown salwood (ชื่อทางการค้าของออสเตรเลีย) (ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากร ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.)

ไม้กระถินเทพาเป็นพันธุ์ไม้อะเคเซีย ที่มีการปลูกป่าเศรษฐกิจอย่างจริงจัง และเป็นชนิดไม้ที่ปลูกกันมาในต่างประเทศมากที่สุดโดยเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และเวียดนาม (Awang และ Taylor, 1993) สำหรับในประเทศไทยก็มีการปลูกกันมากเช่นเดียวกัน เพราะกระถินเทพามีการเจริญเติบโตเร็ว ลำต้นเปลาตรง ให้ผลผลิตได้สูง (Harwood และ Williams, 1992) ไม้กระถินเทพา ถูกศึกษาถึงปริมาณ และคุณลักษณะทางโครงสร้างของลิกนิน ไซแลนและเซลลูโลส โดย Pinto (2005) แสดงดังตารางที่ 2 สรุปองค์ประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของไม้กระถินเทพา *(Acacia mangium)*

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา *(Acacia mangium)*

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ (เทียบกับน้ำหนักแห้งของชีวมวล)
Ashes	0.22
Extractives	
-Ethanol/Toluene	4.46
-Dichloromethane	1.32
-Methanol/water	4.05
Lignin	
-Klason lignin	27.1
-Acid soluble lignin	0.54
-Holocellulose	70.9
Cellulose (Kurschner-Hoffer)	46.5
Pentosans	13.3
Neutral monosaccharides c	
-Rhamnose	0.3
-Arabinose	0.2
-Xylose	10.9
-Mannose	1
-Galactose	0.6
-Glucose	48
-Uronic acids	7.6

ที่มา: Pinto และคณะ (2005)

3. ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา อยู่ในตระกูล Palmae ชื่อพฤกษศาสตร์ *Elaeis guineensis* Jacq.

พรชัย (2549) กล่าวว่าสภาพแวดล้อมทางภูมิอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันเป็นอย่างมาก ซึ่งปาล์มน้ำมันที่ปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะมีการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่แตกต่างกัน โดยปาล์มน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ที่มีปริมาณฝนตกกระจายประมาณ 1,800-2,000 มิลลิเมตร/ปี แสงแดดอย่างน้อยวันละ 5 ชั่วโมง อุณหภูมิเฉลี่ย 29-32 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 75

การใช้ประโยชน์จากผลผลิตปาล์มน้ำมัน (พรชัย, 2549)

ผลผลิตหลักที่ได้จากปาล์มน้ำมันก็คือน้ำมันสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันของมนุษย์ทั้งบริโภคและอุปโภคกว่า 2,300 ชนิด น้ำมันที่ได้จากผลปาล์มน้ำมันจัดเป็นน้ำมันที่มีคุณสมบัติทางเคมีดีที่สุดประเภทหนึ่ง นอกจากนี้แล้วผลพลอยได้จากปาล์มน้ำมันยังมีอีกมากมาย ได้แก่

1. ทะลายปาล์มน้ำมัน เป็นส่วนเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในโรงงาน ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารและกากใยเป็นจำนวนมาก จึงใช้กลับคืนสู่สวนปาล์มน้ำมันเพื่อคลุมโคนต้น เพาะเห็ดเป็นต้น

2. กากใยจากส่วนเปลือก เป็นส่วนของเปลือกที่เหลือจากขั้นตอนการสกัดน้ำมัน ส่วนนี้สามารถนำไปทำปุ๋ยอินทรีย์ เฟอร์นิเจอร์ และใช้เป็นเชื้อเพลิงของโรงงานในหม้อไอ-น้ำ

3. กะลาปาล์มน้ำมัน ที่เหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม กะลาปาล์มน้ำมันสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงของหม้อไอน้ำในโรงงาน อาจนำไปทำถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และวงการแพทย์

4. ทางใบปาล์มน้ำมัน สามารถนำไปทำปุ๋ย ใช้คลุมหน้าดินเพื่อเพิ่มความชื้น หรืออาจนำส่วนของทางใบไปทำเฟอร์นิเจอร์

5. ต้นปาล์มน้ำมันเก่า นำไปทำเชื้อเพลิงซึ่งมีชีวมวล (biomass) สูงมาก

3.1 ลำต้นปาล์มน้ำมัน

ลักษณะทางกายภาพ Hartley (1988) กล่าวว่า ลำต้นจะมีการเจริญเติบโตในช่วงต้นเป็นไปอย่างช้า ๆ ลำต้นจะพัฒนาการเจริญเติบโตออกทางด้านข้างก่อนแล้วจึงมีการยืดตัวขึ้นทางส่วนสูง เมื่อลำต้นเริ่มยืดตัวทางด้านสูงฐานของใบก็จะถูกสร้างขึ้น ซึ่งส่วนของลำต้นประกอบไปด้วยส่วนของใบและปล้อง ส่วนของข้อจะปรากฏให้เห็นภายนอกก็ต่อเมื่อใบหลุดร่วง ในส่วนของฐานใบจะติดอยู่กับลำต้นเป็นเวลาอย่างน้อง 12 ปี ส่วนในเรื่องของอัตราการขยายตัวของลำต้นค่อนข้างจะผันแปรซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และทางพันธุกรรม

สมบัติทางเคมี Khozirah และคณะ (1991) อธิบาย ส่วนลำต้นของปาล์มน้ำมันจะมีปริมาณลิกนินและโฮโลเซลลูโลส น้อยอย่างเห็นได้ชัด แต่มีสารแทรกในปริมาณสูง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของลำต้นปาล์มน้ำมัน

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ (เทียบกับน้ำหนักแห้งของชีวมวล)
สารแทรกที่ละลายในเอทานอล-เบนซีน	9.8
โฮโลเซลลูโลส	45.7
แอลฟาแซลลูโลส	29.2
ลิกนิน	18.8
เพนโตแซน	18.8
เถ้า	2.3

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mohamad และคณะ (1985)

3.2 ทางใบปาล์มน้ำมัน

ลักษณะทางกายภาพ ใบปาล์มน้ำมันมีลักษณะคล้ายใบมะพร้าว สละ และจาก ซึ่งเป็นแบบทางใบ และมีใบประกอบ ใบปาล์มน้ำมันจะถูกพัฒนาจากเนื้อเยื่อในส่วนของ terminal bud ของ apical meristematic tissue การผลิตทางใบขึ้นอยู่กับอายุของปาล์มน้ำมัน ในปาล์มอายุน้อยจะมีการผลิตทางใบในรอบปีสูงกว่าปาล์มน้ำมันอายุมาก โดยที่ต้นอายุน้อย 3 ปีแรกจะมีอัตราการผลิตทาง

ใบ 3-4 ทาง/เดือน หรือประมาณปีละ 36-48 ทาง ในขณะที่ปาล์มน้ำมันอายุเกิน 3 ปีไปแล้ว จะมีอัตราการผลิตทางใบช้าลงเป็น 2-3 ทาง/เดือน หรือประมาณปีละ 24-36 ทาง

Nikhom (1996) กล่าวว่า จำนวนของทางใบนั้นสามารถที่จะตัดได้จำนวน 2 ทางใบต่อต้นต่อเดือน ซึ่งเมื่อผึ่งให้แห้งแล้วจะได้น้ำหนัก 1.2 กิโลกรัมต่อทางใบ และ 125 ต้นต่อเฮกเตอร์ ซึ่งสามารถประมาณได้ว่าจะได้ผลผลิตประมาณ 3,600 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ต่อปี ซึ่งจำนวนทางใบที่สามารถผลิตได้ในโลกนี้ประมาณ 18,000,000 ตัน (คำนวนจากพื้นที่ปลูกทั้งหมดเป็นน้ำหนักแห้งในปี 1992)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของทางใบปาล์มน้ำมันที่ระยะต่าง ๆ

องค์ประกอบทางเคมี (%)	A	B	C	D
สกัดด้วยแอลกอฮอล์-เบนซิน	4	4.7	4.6	2.6
Klason lignin	19.7	19.7	19	22.2
ลิกนิน	22.5	22.7	22.1	25.2
โฮโลเซลลูโลส	76.7	79.8	80.5	84.9
แอลฟา-เซลลูโลส	41.9	44.9	44.6	50.4
เฮมิเซลลูโลส	34.8	34.9	34.9	34.5

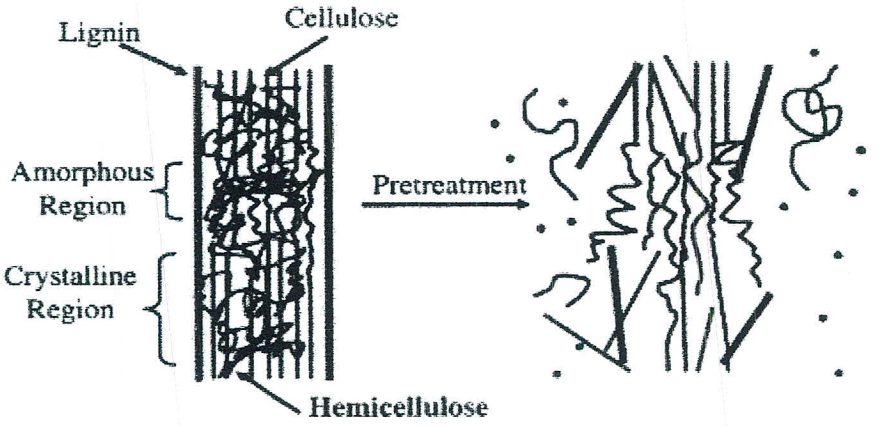
หมายเหตุ A = โคนใบ, B = ก้านใบ 4 ฟุตหลังจากโคนใบ, C = ก้านใบระหว่าง 4-8 ฟุต, D = ก้านใบระหว่าง 8-12 ฟุต

ที่มา : Hiroshi *et al.* (1988)

2.4 การพรีทรีตเมนต์ (pretreatment)

วัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก ๆ คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ซึ่งเซลลูโลสและลิกนินนี้จะอยู่รวมกันที่บริเวณผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อชั้นในของเซลล์ โดยมีเฮมิเซลลูโลสเป็นตัวเชื่อมประสานระหว่างเซลลูโลสและลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรงสูง การปรับสภาพวัตถุดิบนั้นทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้มากขึ้น เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลนำไปใช้ในการหมักต่อไป และมีจุดประสงค์เพื่อทำให้โครงสร้างที่เป็นผลึก หรือโครงสร้างระเบียบ (crystalline) ของเซลลูโลส และลิกนินที่ติดอยู่แตกออกดังภาพที่ 6

นอกจากนี้ยังกำจัดเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของลิกโนเซลลูโลส โดยการปรับสภาพวัตถุดิบมีประโยชน์ดังนี้ 1) ปรับปรุงโครงสร้างของน้ำตาล หรือเพิ่มความสามารถในขั้นตอนการย่อยให้ได้น้ำตาล 2) ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต 3) ลดการเกิด by-products ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนการย่อย และการหมัก และ 4) ลดต้นทุนในการผลิต การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นหนึ่งในขั้นตอนที่แพงที่สุดในการเปลี่ยนชีวมวลเป็นน้ำตาลที่ใช้ในการหมัก และจะเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพและมีค่าใช้จ่ายลดลงหากมีการวิจัยและพัฒนาที่เหมาะสม (Mosier และคณะ, 2005; Kumar และคณะ, 2009)



ภาพที่ 6 การปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: Mosier และคณะ (2005)

วิธีการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลมีมากมาย ซึ่งสามารถแบ่งจำแนกออกได้ดังนี้ คือกระบวนการทางกายภาพ เคมีกายภาพ เคมี และชีวภาพ

1. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางกายภาพ

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบชีวมวล และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวเพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าไปไฮโดรไลซ์ทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น และเพื่อลดโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างแบบผลึก ถ้าใช้กระบวนการทางกล วัตถุดิบจะถูกบดให้ละเอียด โดยการตัด การบด หรือ การใช้ความร้อน ซึ่งขนาดของวัตถุดิบจะถูกทำให้อยู่ระหว่าง 10-30 มิลลิเมตร หลังจากที่ผ่านการ

2. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ

2.1 การระเบิดไอน้ำ (steam explosion หรือ autohydrolysis)

การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดด้วยไอน้ำถูกนำมาใช้ในการแยกวัสดุจำพวกไม้ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เมื่อประมาณ 60 ปีมาแล้ว และเทคโนโลยีนี้ได้มีการศึกษาปรับปรุงจนในปัจจุบันเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำสามารถทำงานได้ทั้งรูปของกระบวนการแบบเบ็ดเสร็จ (batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) ในการทำงานจะใช้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิ และความดันสูงไปแยกเอาส่วนของเฮมิเซลลูโลสออกมาจากส่วนของเซลลูโลส และลิกนินที่ประกอบอยู่ในไม้หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยระยะเวลาของการระเบิดด้วยไอน้ำจะไม่เกิน 5 นาที ส่วนของเซลลูโลส และลิกนินที่เหลือจะแยกออกจากกันโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอไซด์ ซึ่งจากเทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำนี้ก็จะสามารถแยกเอาส่วนต่าง ๆ คือ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน ไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีมูลค่าเพิ่มต่าง ๆ ได้ ๆ (Biorefinary) ตัวแปรที่สำคัญของเทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำ คือ อุณหภูมิของไอน้ำและระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด ซึ่งตัวแปรทั้งสองจะรวมกันเป็นตัวแปรเดียวเรียกว่า Severity factor (R_o) ดังสมการแสดงความสัมพันธ์ดังนี้

$$R_o = \int_0^t \exp[\frac{(T-100)}{14.75}]dt$$

หรือ

$$\log R_o = \log\{t \exp[\frac{(T-100)}{14.75}]\}$$

เมื่อ R_o คือ ค่า Severity factor

t คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด (นาที)

T คือ อุณหภูมิของไอน้ำ (°C)

กลไกในการทำงานของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ คือ ไอน้ำที่อุณหภูมิสูงจะไปทำให้หมู่แอซีทิล (acetyl group) ของโมเลกุลของไซแลนกลายเป็นกรดแอซีติก ซึ่งกรดแอซีติกนี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โมเลกุลของไซแลนให้กลายเป็นไซโลส และโอลิโกไซโลสเกิดขึ้น นอกจากนี้ถ้าสภาวะในการระเบิดด้วยไอน้ำรุนแรงก็สามารถเกิดปฏิกิริยาดีไฮเดรชันทำให้โมเลกุลของไซโลสกลายเป็นเฟอร์ฟูรอลเกิดขึ้นได้ด้วย รวมทั้งเกิดการไฮโดรลิซิสโมเลกุล

ของเซลลูโลสเป็นกลูโคส และสลายพันธะโมเลกุลของลิกนินให้กลายเป็นลิกนินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเกิดขึ้นได้ ดังนั้นในการระเบิดด้วยไอน้ำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในสาระละลายเฮมิเซลลูโลสก็ คือ ไซโลส โอลิโกไซโลส เฟอร์ฟูรอล 5-ไฮดรอกซีฟูรอล กลูโคส และสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดด้วยไอน้ำจึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อประโยชน์ในการใช้งาน

3. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมี

3.1 การพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรด

กรดซัลฟุริกเจือจางจะผสมเข้ากับชีวมวล เพื่อไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และสลายน้ำตาลไซโลสให้กลายเป็นเฟอร์ฟูรอลต่อ เฟอร์ฟูรอลจะนำกลับคืนมาโดยการกลั่น กรดที่ผสมหรือสัมผัสกับชีวมวลจะคงอยู่ในอุณหภูมิ 160-220 องศาเซลเซียส ใช้ช่วงเวลาจากวินาทีเป็นนาที โดยกรดซัลฟิวริกถูกนำมาใช้ในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

การไฮโดรลิซิสโดยกรด จะเกิดการปลดปล่อยสารโมเลกุลขนาดกลางหรือโอลิโกเมอร์และสารโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนเมอร์ นั่นคือกรดจะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสเป็นกลูโคส ตามด้วยการไฮโดรลิซิสกลูโคสเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ และผลิตภัณฑ์ตัวอื่นออกมา (Mosier, 2005)

ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรดคือ ให้ผลได้ของน้ำตาลเฮมิเซลลูโลสมากรวมถึงการทำให้ความสามารถในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสสูง โดยการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้มากกว่าเซลลูโลส ทำให้เหมาะสมต่อการไฮโดรลิซิสเอนไซม์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออกได้ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือจำเป็นต้องมีขั้นตอนการสะเทินกรดให้เป็นกลาง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสน้ำตาลต่อ ทำให้ผลได้ของน้ำตาลลดลง และได้องค์ประกอบอื่นเกิดขึ้น ได้แก่ กรดแอซีติก และเฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ในขั้น ตอนการหมักได้ วิธีการนี้ยังต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพง โดยถังปฏิกรณ์ที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อน และแข็งแรงในอุณหภูมิและความดันสูงได้ (Pauley, 2007)

3.2 การพรีทรีตเมนต์โดยด่าง

การใช้สารละลายด่าง ในการพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบชีวมวล มีประสิทธิภาพคือขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนิน โดยมีกลไกของปฏิกิริยา saponification ของพันธะเชื่อมโยงของเอสเทอร์ภายในโมเลกุลที่ของไซแลนของเฮมิเซลลูโลส และองค์ประกอบอื่น เช่น ลิกนิน กับด่างแก่ มีรายงานว่ารูพรุนของวัสดุลิกโนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น โดยการกำจัดพันธะเชื่อมโยง (Silverstein, 2004) การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้นdegree of polymerization และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในไม้ใบกว้างและส่งผลดีต่อพืชจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ

4. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางชีวภาพ

การพรีทรีตเมนต์ทางชีวภาพ จะใช้เชื้อรา เช่น brown-rot, white-rot และ soft-rot เป็นต้นซึ่งจะไฮโดรไลซ์ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ โดยรากลุ่ม White-rot เป็นกลุ่มราในคลาส Basiomycetes ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ส่วนการไฮโดรลิซิสลิกนิน ของรากลุ่ม White-rot ได้แก่ Phanerochaete chrysosporium, Pleurotus ostreatus, และ Trametes versicolor เกิดด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ราประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกาเนสเพอร์ออกซิเดส (MnP) และ แลกเคส (laccases) (Silverstein, 2004)

ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยใช้เชื้อราคือ ไม่ต้องใช้สารเคมีที่มีความรุนแรง และอุณหภูมิที่ใช้ไม่สูง ใช้พลังงานต่ำ เป็นสภาวะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้สารเคมีและอุณหภูมิสูง ส่วนข้อเสียคือ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง จึงทำให้ใช้เวลาในการไฮโดรลิซิสลิกนินนานขึ้น เพราะเกิดอัตราการไฮโดรลิซิสชีวมวลต่ำ (Silverstein, 2004)

2.5 การย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินดังนั้นเมื่อทำการย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคา

ไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสนั้นจะได้น้ำตาลหลายชนิดปะปนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจากการย่อย สำหรับการย่อยมี 2 วิธีได้แก่ วิธีการย่อยด้วยกรด และวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์

1. การไฮโดรลิซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไป ทำให้ได้ผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ เฟอฟูรอล นอกจากนี้กรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป กรดซัลฟูริกเจือจาง 1 เปอร์เซ็นต์เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรง และไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนจึงมีราคาแพง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีกรดเจือปน

2.การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลสซึ่งเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ ß-1,4-Glucosidic linkage ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน (Lyn และคณะ, 2002) ดังนี้

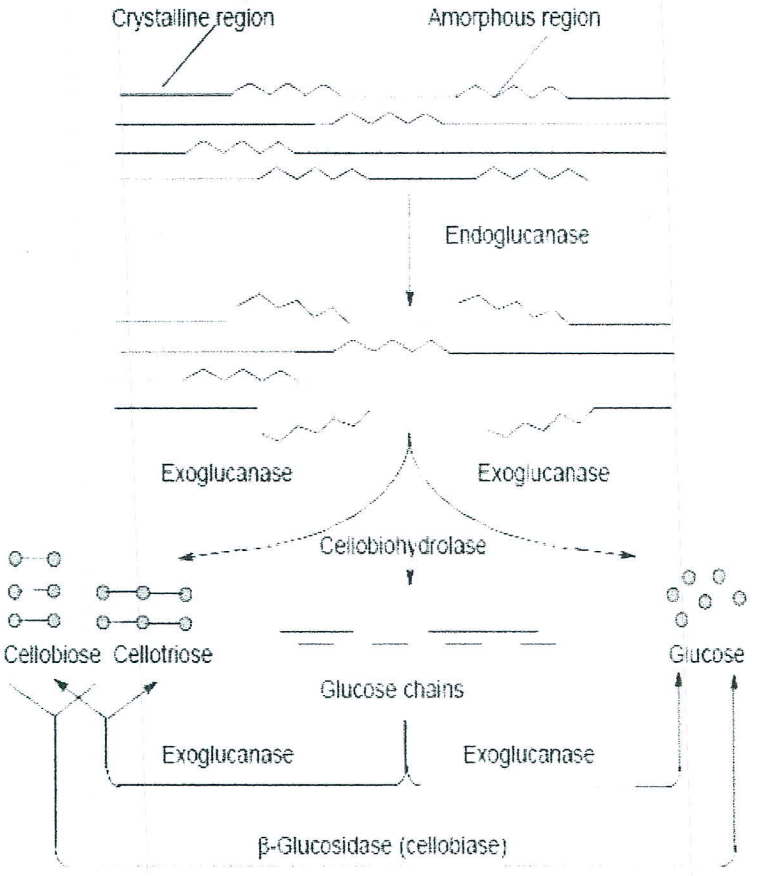
1. Endoglucanase (EG; 1, 4-ß-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย ß-1, 4-glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ cello-oligosaccharide, glucose, cellobiose

2. Exoglucanase หรือ cellobiohydrolase (CBH; 1, 4-ß-D-glucan cellobiohydrolase;EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducingผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ cellobiose

3. ß-glucosidase (ß-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobiose และcello-oligosaccharide ได้เป็นกลูโคส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีน เท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นในการเร่ง โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำผลิต

เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างผลึก หรือส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline region) และส่วนที่ไม่มีระเบียบ (amorphous region) เอนไซม์ endoglucanase จะเข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วง ๆ เอนไซม์ exoglucanase เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมา จากนั้นโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ exoglucanase และโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ßglucosidase ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส (Zhu, 2005) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส

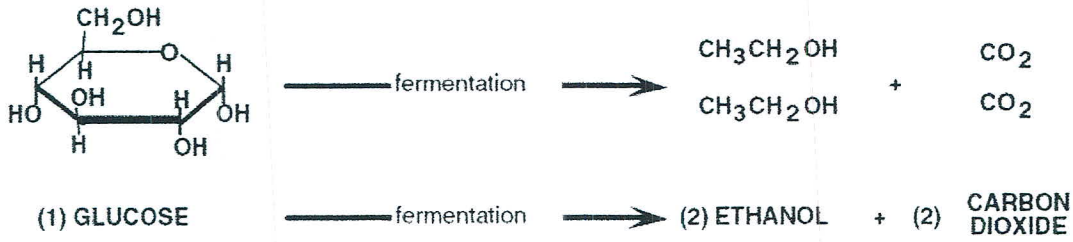
ที่มา: Zhu (2005)

2.5 กระบวนการหมักเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส

ในกระบวนการผลิตเอทานอล กระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญเนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังสมการ

น้ำตาล + ยีสต์ ⟶ เอทานอล + คาร์บอนไดออกไซด์ + พลังงาน

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเอทานอลนั้น โดยน้ำตาลแต่ละชนิดเมื่อนำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลนั้นจะได้ปริมาณเอทานอล และผลผลิตอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน เช่น น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อนำมาผลิตเอทานอล จะได้เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

ที่มา: Murphy และ McCarthy (2005)

2.6 การผลิตเอทานอลจากชีวมวลโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักแบบพร้อมกัน

(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

กระบวนการย่อยและหมักพร้อมกัน (SSF) เป็นการรวมการย่อยเซลลูโลส และการหมักไว้ในขั้นตอนเดียว สำหรับข้อได้เปรียบของการหมักแบบ SSF คือ สามารถเพิ่มอัตราการย่อยได้เนื่องจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยเป็นตัวกลางที่จุลินทรีย์ผลิตเอทานอลนำไปใช้ต่อไป เมื่อระดับของเซลโลไบโอสและกลูโคสต่ำมาก การยับยั้งของเซลลูเลสจะลดลง ซึ่งทำให้อัตราการผลิตน้ำตาลรวมทั้งผลได้เพิ่มขึ้น และเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการลดลง ใช้อุปกรณ์ หรือถังปฏิกรณ์ในการผลิตเอทานอลน้อยลง เนื่องจากรวมถังในขั้นตอนการย่อย และการหมักไว้ในถังเดียวกัน ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง (Sun และ Cheng, 2002)

กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลนั้นต้องนำวัตถุดิบผ่านการพรีทรีตเมนต์ เพื่อกำจัดลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสให้ได้มากที่สุดแล้ว ใช้เอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลสให้ได้กลูโคสมากที่สุดเช่นกัน แล้วนำกลูโคสที่ได้มาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ ในการผลิตเอทานอลจากชีวมวลนั้นต้องใช้ถึง 3 ขั้นตอนด้วยกันคือ การพรีทรีตเมนต์ชีวมวล การย่อยด้วยเอนไซม์ และการหมักด้วยจุลินทรีย์จึงได้เอทานอลออกมา ในปัจจุบันมีการใช้กระบวนการหมักและการย่อยพร้อมกันในการผลิตเอทานอลโดยใช้ชีวมวลกันอย่างแพร่หลาย เป็นการรวมการย่อยเซลลูโลส และการหมักไว้ในขั้นตอนเดียว เนื่องจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยเป็นตัวกลางที่จุลินทรีย์ผลิตเอทานอลนำไปใช้ต่อไป ซึ่งจะช่วยในการแก้ปัญหาเรื่องเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย อาทิ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการลดลง มีผลทำให้ลดต้นทุนในการผลิตลง และเมื่อระดับของเซลโลไบโอสและกลูโคสต่ำมากการยับยั้งของเซลลูเลสจะลดลงซึ่งทำให้อัตราการผลิตน้ำตาลและผลได้เพิ่มขึ้น (Philippidis, 1996) มีการศึกษาการใช้ปริมาณเชื้อและเอนไซม์ต่ำในการหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักและย่อยพร้อมกัน เพื่อลดค่าใช้จ่ายในการผลิต โดยใช้วัตถุดิบจากฟางข้าวบาร์เล่ย์ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ และใช้เอนไซม์ Celluclast 1.5 Lและ Novozym 188 และยีสต์ขนมปังในการย่อยและหมักพร้อมกัน

แม้ว่าการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน (SSF) จะมีข้อดีทางเศรษฐศาสตร์มากกว่าการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักแยกกัน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) แต่วิธีการย่อยเป็นน้ำตาลและการหมักพร้อมกัน (SSF) ยังมีปัญหาในเรื่องอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยและเชื้อที่ใช้ในการหมักแตกต่างกัน (Kádár และคณะ, 2004) เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักและย่อยพร้อมกัน (SSF) อยู่ระหว่างอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการย่อย (45-50 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่ที่ดีที่สุดสำหรับการทำงานของยีสต์ (30 องศาเซลเซียส) (Philippidis, 1996)

นอกจากนี้กระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้กระบวนการหมักและย่อยพร้อมกันนั้นยังช่วยแก้ปัญหาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอสได้ เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสจะย่อยเซลลูโลส ได้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้นจะถูกจุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต พร้อมทั้งผลิตเอทานอลในเวลาเดียวกัน ทำให้ไม่เกิดการสะสมในระบบ (Molds และคณะ, 2000)

2.7 การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทะกุจิ

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากุชิถูกพัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเป็นเทคนิค หรือกลไกทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้ง่าย หรือสะดวกขึ้นการปรับปรุงนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน โดยศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลองหรือออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีการทากุชิออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA)(Box และคณะ, 1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลอง และระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยนั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ L4 (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA (L4) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 L-4 (23) Orthogonal array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	A	B	C
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

ที่มา: Roy (2001)

ซึ่งเทคนิคนี้ประกอบด้วย 8 ขั้นตอน และในขั้นตอนทั้งหมดสามารถจัดกลุ่มใหญ่ ๆ ออกได้ 3 กลุ่ม (Madhav, 1989) คือ

1. การออกแบบการทดลอง (Designing of experiment : DOE)

1.1 บ่งชี้หน้าที่หลัก ผลข้างเคียง และแบบ หรือชนิดของความผิดพลาด

1.2 บ่งชี้ปัจจัยรบกวน และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบสำหรับการคำนวณการเสื่อมคุณภาพ

1.3 บ่งชี้ลักษณะของคุณภาพที่สังเกตได้ และหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการทดลอง

1.4 บ่งชี้ปัจจัยควบคุม และระดับต่าง ๆ ของปัจจัย

1.5 ออกแบบการทดลองแบบเมทริกซ์ และการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง

2. การทำการทดลอง (Conducting experiment)

ทำการทดลองโดยใช้การทดลองแบบเมทริกซ์

3. การวิเคราะห์ และการยืนยันผลการทดลอง (Analyzing and confirming predicted result)

3.1 การวิเคราะห์ข้อมูล ทำนายระดับที่เหมาะสมของปัจจัยควบคุม และทำนายการทดลองภายใต้ระดับเหล่านี้

3.2 ยืนยันผลการทำนาย และออกแบบการทดลองต่อไป

การวัดค่าในวิธีการทากุชิจะแสดงในรูปของอัตราส่วน Signal/Noise (อัตราส่วน S/N) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (qualitycharacteristic, QC) ซึ่งสามารถแสดงถึงความต้องการการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองที่ต้องการต่างกันออกไปประกอบด้วย 3 รูปแบบ ดังนี้ 1. QC = B (Bigger is better) 2. QC = S(Smaller is better) และ 3. QC = N (Nominal is best) นอกจากนี้ วิธีการทากุชิยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

4. ข้อดีของการออกแบบการทดลองโดยอาศัยวิธีการทากุชิ

4.1 เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และใช้ได้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการสื่อสาร และโทรคมนาคม เป็นต้น

4.2 ช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง

4.3 ช่วยให้การทำการทดลองง่าย และสะดวกขึ้น

4.4 ให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือได้ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง