



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ  
การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

Optimization of Biomass Pretreatment for Increasing Enzymatic Hydrolysis

นามผู้วิจัย นางสาวนิชฌิมา สุพันธุ์มัตย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจกสุขสถิตย์, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr.rer.nat. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิคม แหลมลัก, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์สุนิษฐ์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

สิงสิงห์ มตาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ  
การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

Optimization of Biomass Pretreatment for Increasing Enzymatic Hydrolysis

โดย

นางสาวนิชชีมา สุพันธุ์มัตย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2553

นิชชีมา สุพันธุ์มณเฑียร 2553: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D. 156 หน้า

ไม้ยูคาลิปตัสและกระถินเทพาเป็นไม้โตเร็วที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ขึ้นไม้สับยูคาลิปตัสและกระถินเทพาจะถูกพรีทรีตโดยการระเบิดไอน้ำที่อุณหภูมิ 200 และ 210 องศาเซลเซียส และเวลา 2, 4 และ 6 นาที ( $\log R_o$  3.24-4.02) ซึ่งเยื่อยูคาลิปตัสและกระถินเทพาที่สภาวะเหมาะสม จะให้ค่าสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสต่ำสุด และสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด คือที่สภาวะ  $\log R_o$  3.84 และ  $\log R_o$  3.54 ให้ค่า 3.64, 53.94 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และ 8.00, 51.05 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และให้ประสิทธิภาพการพรีทรีตเมนต์ในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 81.38 และ 56.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การหาสภาวะการสกัดที่เหมาะสมของเยื่อยูคาลิปตัสและกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำ สภาวะเหมาะสม โดยอาศัยวิธีทากูชิในการออกแบบการทดลอง โดยแปรผันปัจจัยแบบ  $L_9(3^3)$  orthogonal array ได้สภาวะเหมาะสมของไม้ทั้ง 2 ชนิดสภาวะเดียวกัน ดังนี้ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเวลา 90 นาที โดยได้สัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุดของเยื่อยูคาลิปตัสและกระถินเทพา เท่ากับ 76.84, 16.79 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และ 61.54, 29.86 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น เยื่อยูคาลิปตัสจะได้สัดส่วนเซลลูโลสสูงขึ้น 75.63 เปอร์เซ็นต์ แต่สัดส่วนเฮมิเซลลูโลสและสัดส่วนลิกนินลดลง 89.21 และ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเยื่อกระถินเทพา จะได้สัดส่วนเซลลูโลสและสัดส่วนลิกนินสูงขึ้น 32.24 และ 12.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสลดลง 79.38 เปอร์เซ็นต์

ยูคาลิปตัสและกระถินเทพานำมาศึกษาการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์โดยใช้วัตถุดิบ 3 แบบ คือวัตถุดิบเริ่มต้น, เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม และเยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำและสกัดสภาวะเหมาะสม สรุปได้ว่า วิธีพรีทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ของไม้ทั้ง 2 ชนิด คือการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดต่าง โดยเยื่อยูคาลิปตัสให้ค่าความเข้มข้นกลูโคสสูงสุด 29.47 กรัม/ลิตร และอัตราการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส 49.89 เปอร์เซ็นต์ (ผลได้กลูโคส 34.52 เปอร์เซ็นต์) และเยื่อกระถินเทพาให้ค่าความเข้มข้นกลูโคสสูงสุด 3.67 กรัม/ลิตร และอัตราการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส 7.86 เปอร์เซ็นต์ (ผลได้กลูโคส 5.35 เปอร์เซ็นต์)

---

ลายมือชื่อนิสิต

---

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nichchima Supantamart 2010: Optimization of Biomass Pretreatment for Increasing Enzymatic Hydrolysis. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pramuk Parakulsuksatid, Ph.D. 156 pages.

Eucalyptus and Acacia wood are fast growing wood commonly found in Thailand. They are an alternative feedstock for the production of ethanol. Eucalyptus and Acacia chips have been pretreated by steam explosion at temperature 200 and 210 °C; 2, 4 and 6 minutes (logRo 3.24-4.02). The Eucalyptus and Acacia fiber contained the significant lowest hemicelluloses and high celluloses at 3.64 %DW, 53.94 %DW and 8.00 %DW, 51.05 %DW, at logRo 2.84 and logRo 3.54 respectively. Their pretreatment efficiencies of hemicelluloses removal were 81.38 % and 56.24 %, respectively.

Taguchi experimental design was used to optimize the alkaline extract condition of Eucalyptus and Acacia treated with optimize steam explosion condition and the 3 factors of  $L_9(3^3)$  orthogonal array were selected. The following conditions of these biomass were obtained: 25% NaOH 70 °C of temperature and 90 minute of extraction time. At this optimal condition, The highest cellulose and the lowest lignin were 76.84, 16.79 %DW of the Eucalyptus fiber and 61.54, 29.86 %DW of the Acacia fiber, respectively. For eucalyptus fiber, the cellulose was increased 75.63 % but the hemicelluloses and lignin were decreased 89.21 and 32.00 % For Acacia fiber, the cellulose and lignin content were increased 32.24 and 12.93 %, whereas the hemicelluloses decreased 79.38 % from raw materials.

Enzymatic hydrolysis of Eucalyptus and Acacia in three different forms: raw material (untreated), steam exploded fiber and alkali extracted following the steam exploded fiber, were studied the effect of lignin removal and cellulose conversion into glucose. Therefore, it is concluded that the most effective pretreatment method for enzymatic hydrolysis for the two biomass was the steam explosion following the alkaline extraction. Eucalyptus fiber produced 29.47 g/l of glucose and the cellulose conversion ratio was 49.89 % (glucose yield of 34.52 %). The Acacia fiber produced 3.66 g/l glucose and the cellulose conversion ratio was 7.86 % (glucose yield of 5.35 %)

\_\_\_\_\_  
Student's signature

\_\_\_\_\_  
Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประมุข กระจกสุขสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิคม แหลมสัถ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา ประธานการสอบ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้โอกาสและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย และการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5) ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย รวมถึงญาติพี่น้องทุกคน ที่ได้ให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและคณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำลงใจ และมิตรภาพที่ดีในการศึกษาระดับปริญญาโท รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา อีกทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการเตรียมตัวอย่างไม้ในงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอน และให้ความรู้มาจนถึงปัจจุบัน

นิชฌิมา สุพันธุ์มมาตย์

พฤษภาคม 2553

## สารบัญ

## หน้า

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| สารบัญ                                                                                                                                   | (1) |
| สารบัญตาราง                                                                                                                              | (2) |
| สารบัญภาพ                                                                                                                                | (6) |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ                                                                                                                | (9) |
| คำนำ                                                                                                                                     | 1   |
| วัตถุประสงค์                                                                                                                             | 3   |
| การตรวจเอกสาร                                                                                                                            | 4   |
| อุปกรณ์และวิธีการ                                                                                                                        | 41  |
| อุปกรณ์                                                                                                                                  | 41  |
| วิธีการ                                                                                                                                  | 43  |
| ผลและวิจารณ์                                                                                                                             | 48  |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                                                                                                                        | 96  |
| สรุป                                                                                                                                     | 96  |
| ข้อเสนอแนะ                                                                                                                               | 98  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                                                                                                                     | 99  |
| ภาคผนวก                                                                                                                                  | 107 |
| ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์                                                                                                               | 108 |
| ภาคผนวก ข การประมาณค่าพารามิเตอร์                                                                                                        | 128 |
| ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง                                                                                                                 | 133 |
| ภาคผนวก ง The 3 <sup>rd</sup> International Conference on Fermentation Technology for<br>Value Added Agricultural Products (FerVAAP2009) | 148 |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน                                                                                                               | 156 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลชนิดต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)                                                                                                                                                                     | 6    |
| 2        | ปริมาณหมู่ฟังก์ชันของลิกนินในไม้แต่ละชนิด                                                                                                                                                                                         | 10   |
| 3        | องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัส ( <i>Eucalyptus globulus</i> )                                                                                                                                                                  | 14   |
| 4        | องค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา ( <i>Acacia mangium</i> )                                                                                                                                                                       | 17   |
| 5        | ผลของวิธีการพรีทรีตเมนต์ ต่อการไฮโดรลิซิสของชีวมวลแต่ละชนิด                                                                                                                                                                       | 21   |
| 6        | ปริมาณพลังงานที่ใช้กระบวนการทางกลเพื่อลดขนาดของชีวมวลที่มาจาก<br>การเกษตรที่มีขนาดแตกต่างกัน                                                                                                                                      | 23   |
| 7        | L-4 (23) Orthogonal array                                                                                                                                                                                                         | 38   |
| 8        | สถานะที่ใช้ในการระเบิดไอน้ำของชีวมวล โดยแปรผันความดันและเวลา                                                                                                                                                                      | 44   |
| 9        | ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยในการหาสถานะการสกัดด้วยด่าง ของ<br>ชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ                                                                                                            | 45   |
| 10       | L <sub>9</sub> (3 <sup>3</sup> ) Orthogonal Array                                                                                                                                                                                 | 45   |
| 11       | ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการทดลองการหาสถานะการสกัดด้วยด่าง ของ<br>ชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ออกแบบ<br>โดยวิธีทากูชิ                                                                                   | 46   |
| 12       | สัดส่วนของชิ้นไม้สับยูคาลิปตัส และกระถินเทพา แต่ละขนาดตะแกรง                                                                                                                                                                      | 48   |
| 13       | องค์ประกอบทางเคมี ไม้ยูคาลิปตัสและไม้กระถินเทพา ก่อนการ<br>พรีทรีตเมนต์                                                                                                                                                           | 49   |
| 14       | ค่า severity factor ที่สัมพันธ์กับอุณหภูมิและเวลาของการระเบิดไอน้ำ                                                                                                                                                                | 50   |
| 15       | องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ                                                                                                                                                                                | 51   |
| 16       | องค์ประกอบทางเคมี เยื่อยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ ตามด้วยการสกัด<br>ด้วยน้ำตามลำดับ                                                                                                                                                | 51   |
| 17       | สรุปสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพการลดลงของ<br>เฮมิเซลลูโลสในแต่ละขั้นตอนของการพรีทรีตเมนต์ ที่สถานะการระเบิด<br>ไอน้ำ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที และการสกัดด้วยน้ำ 80<br>องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เยื่อยูคาลิปตัส | 53   |

### สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                        | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 18       | องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อกระถิ่นเทพาหลังระเบิดไอน้ำ                                                                                                                                                                                    | 54   |
| 19       | องค์ประกอบทางเคมี เยื่อกระถิ่นเทพาหลังระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ตามลำดับ                                                                                                                                                        | 54   |
| 20       | สรุปสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพการลดลงของเฮมิเซลลูโลสในแต่ละขั้นตอนของการพรีทรีตเมนต์ ที่สภาวะการระเบิดไอน้ำที่เหมาะสม คือ 210 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที และการสกัดด้วยน้ำ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ไม่ใช้กระถิ่นเทพา | 57   |
| 21       | ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้อยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยด่าง ณ สภาวะที่แตกต่าง                                                                                                                                                          | 59   |
| 22       | อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และการลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยด่าง                                                                                                                        | 60   |
| 23       | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส เยื่อยูคาลิปตัส                                                                                                                                                             | 61   |
| 24       | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อยูคาลิปตัส                                                                                                                                                                  | 63   |
| 25       | สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนิน จากการทดลอง ทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อยูคาลิปตัส                                                                                                                                   | 66   |
| 26       | สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อยูคาลิปตัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำโดยการคำนวณวิธีทากุชิ                                                                        | 68   |
| 27       | เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลอง และที่ได้จากการประมาณค่าซึ่งคำนวณโดยวิธีทากุชิ ในสภาวะการสกัดต่างเหมาะสม ของเยื่อยูคาลิปตัส ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที                       | 69   |
| 28       | สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อยูคาลิปตัส ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน                                                                                                                                  | 70   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่            |                                                                                                                                                                | หน้า |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 29                  | ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีเยื่อกระดาษที่สกัดด้วยด่าง ณ สภาวะที่แตกต่างกัน                                                                                     | 70   |
| 30                  | อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และการลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อกระดาษที่สกัดด้วยด่าง                                                    | 72   |
| 31                  | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสเยื่อกระดาษ                                                                                             | 73   |
| 32                  | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อกระดาษ                                                                                                 | 73   |
| 33                  | สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนิน จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อกระดาษ                                                                | 75   |
| 34                  | สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและลดสัดส่วนลิกนินในเยื่อกระดาษที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำโดยการคำนวณวิธีทางสถิติ | 77   |
| 35                  | องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อกระดาษ ที่ได้จากการทดลองยืนยันผลของสภาวะที่เหมาะสมการสกัดด้วยด่างที่ได้จากวิธีทางสถิติ                                                | 80   |
| 36                  | เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลอง และจากการประมาณค่าซึ่งคำนวณโดยวิธีทางสถิติในสภาวะการสกัดด้วยด่างที่เหมาะสมของเยื่อกระดาษ                                       | 80   |
| 37                  | สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้กระดาษ ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์สภาวะเหมาะสมแต่ละขั้นตอน                                                                     | 82   |
| 38                  | การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง                                                                                                              | 92   |
| <b>ตารางผนวกที่</b> |                                                                                                                                                                |      |
| ก1                  | ค่าการทำการฟอสฟอไรต์มาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส                                                                                          | 122  |
| ก2                  | ค่าการทำการฟอสฟอไรต์มาตรฐานพาราไนโตรฟินอล เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส                                                                         | 124  |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ |                                                                                                                       | หน้า |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ค1           | ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัม/ลิตร) พื้นที่ใต้กราฟ และแสดงเวลาที่ใช้ในการแยกสาร (นาที) วิเคราะห์โดย HPLC                 | 146  |
| ค2           | ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส (กรัม/ลิตร) ที่เวลาต่าง ๆ วิเคราะห์โดย HPLC                                  | 147  |
| ค3           | เปอร์เซ็นต์ผลได้ของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส เมื่อชีวมวลลักษณะต่างๆ ผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง | 147  |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                 | หน้า |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในชีวมวล                                                                                                                                                                                        | 5    |
| 2      | ผนังเซลล์แบบทุติยภูมิ โครงสร้างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน<br>ในวัตถุดิบชีวมวล (ชั้น S1 และ S3 มีเซลลูโลสโครงสร้างแบบหลวม<br>(amorphous) และเฮมิเซลลูโลส เป็นส่วนใหญ่, ชั้น S2 มีเซลลูโลส<br>โครงสร้างแบบผลึก เป็นส่วนใหญ่ (crystalline) | 5    |
| 3      | โครงสร้างของเซลลูโลส                                                                                                                                                                                                                            | 7    |
| 4      | โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส                                                                                                                                                                                                                        | 8    |
| 5      | โครงสร้างและชื่อโมโนเมอร์ลิกนิน                                                                                                                                                                                                                 | 10   |
| 6      | หมู่ฟังก์ชันของลิกนินในไม้                                                                                                                                                                                                                      | 11   |
| 7      | โครงสร้างพอลิเมอร์ของลิกนิน                                                                                                                                                                                                                     | 11   |
| 8      | แนวคิดของไบโอรีไฟเนอรี                                                                                                                                                                                                                          | 13   |
| 9      | กระบวนการพรีทรีตเมนต์                                                                                                                                                                                                                           | 19   |
| 10     | วัตถุประสงค์ของการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล                                                                                                                                                                                                            | 20   |
| 11     | วัตถุประสงค์ของการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล                                                                                                                                                                                                            | 20   |
| 12     | แผนผังแสดงตัวอย่างระบบการเบิดไอน้ำ/สารละลาย                                                                                                                                                                                                     | 25   |
| 13     | กระบวนการ Ammonia Fiber Explosion                                                                                                                                                                                                               | 27   |
| 14     | แผนผังกระบวนการพรีทรีตเมนต์โดยต่าง                                                                                                                                                                                                              | 30   |
| 15     | การพรีทรีตเมนต์ชีวมวลโดยใช้ไอโซน สำหรับการผลิตเอทานอล                                                                                                                                                                                           | 30   |
| 16     | ขั้นตอนการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส                                                                                                                                                                                                    | 36   |
| 17     | ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่ม<br>สัดส่วนเซลลูโลส เชื้อจุลินทรีย์                                                                                                                                              | 65   |
| 18     | ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลด<br>สัดส่วนลิกนิน เชื้อจุลินทรีย์                                                                                                                                                   | 65   |
| 19     | ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่ม<br>สัดส่วนเซลลูโลสเชื้อกระถินเทพา                                                                                                                                               | 76   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่            |                                                                                                                       | หน้า |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 20                | ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลด<br>สัดส่วนลิกนิน เชื้อกระถินเทพา                         | 76   |
| 21                | ลักษณะทางกายภาพของเชื้อชีวมวลแต่ละชนิด ก่อนและหลังการสกัดด้วย<br>ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สภาวะเหมาะสม                 | 83   |
| 22                | ลักษณะทางกายภาพของชีวมวลแต่ละชนิด ก่อนนำมาเป็นสารตั้งต้นใน<br>การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์                                | 85   |
| 23                | ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิส<br>ยูคาลิปตัส 3 แบบด้วยเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง | 87   |
| 24                | ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิส<br>กระถินเทพา 3 แบบด้วยเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง | 87   |
| 25                | ลักษณะเชื้อชีวมวลและสีสารละลายที่ได้เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วย<br>เอนไซม์ 72 ชั่วโมง                                  | 88   |
| 26                | การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ที่ได้จากการไฮโดรลิซียูคาลิปตัส (AE) ต่าง<br>ลักษณะ ด้วยเอนไซม์                                | 93   |
| 27                | การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิสกระถินเทพา (AA)<br>ต่างลักษณะ ด้วยเอนไซม์                                | 93   |
| <b>ภาพผนวกที่</b> |                                                                                                                       |      |
| ก1                | ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไซโลสและค่าดูดกลืนแสง                                                                        | 119  |
| ก2                | กราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส                                                                 | 122  |
| ก3                | กราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟินอลเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์<br>เบต้า-กลูโคซิเดส                                             | 124  |
| ก4                | กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC                                                                      | 127  |
| ก5                | กราฟมาตรฐานน้ำตาลเซลโลไบโอส ที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC                                                                  | 127  |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพผนวกที่                                                                           | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ก1 ผลลัพธ์ ANOVA ของเซลลูโลส ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS        | 134  |
| ก2 ผลลัพธ์ ANOVA ของเฮมิเซลลูโลส ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS    | 135  |
| ก3 ผลลัพธ์ ANOVA ของลิกนิน ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS          | 137  |
| ก4 ผลลัพธ์ ANOVA ของเถ้า ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS            | 138  |
| ก5 ผลลัพธ์ ANOVA ของเซลลูโลส กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS        | 140  |
| ก6 ผลลัพธ์ ANOVA ของเฮมิเซลลูโลส ไม้กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS | 141  |
| ก7 ผลลัพธ์ ANOVA ของลิกนิน กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS          | 143  |
| ก8 ผลลัพธ์ ANOVA ของเถ้า ไม้กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS         | 144  |
| ก9 โครมาโตแกรม HPLC ของน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร          | 146  |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|              |                                                                                              |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| S/N ratio    | อัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง                                          |
| dB           | หน่วยของ S/N ratio (เดซิเบล)                                                                 |
| d.f.         | องศาความอิสระ                                                                                |
| ANOVA        | การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance)                                               |
| DOE          | การออกแบบการทดลอง (Design of Experiment)                                                     |
| OA           | ตารางแผนการทดลองของทากูชิ                                                                    |
| L            | จำนวนระดับของปัจจัย                                                                          |
| N            | จำนวนการทดลอง                                                                                |
| r            | จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง                                                                        |
| y            | ผลการทดลอง                                                                                   |
| <i>p</i> NPG | พาราไนโตรฟีนีล เบต้า-ดี-กลูโคพาราโนไซด์ ( <i>p</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) |
| FPU/ml       | The filter paper units per milliliter                                                        |
| IU/ml        | International units per milliliter                                                           |
| RE           | วัตถุดิบเริ่มต้น ไม้ยูคาลิปตัส                                                               |
| RA           | วัตถุดิบเริ่มต้น ไม้กระถินเทพา                                                               |
| SE           | เยื่อคาลิปตัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ                                      |
| SA           | เยื่อกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ                                    |
| AE           | เยื่อคาลิปตัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่าง                      |
| AA           | เยื่อกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่าง                    |

## การหาสถานะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

### Optimization of Biomass Pretreatment for Increasing Enzymatic Hydrolysis

#### คำนำ

เนื่องจากปัญหาการขาดแคลนน้ำมันดิบซึ่งคาดว่าจะในปี ค.ศ. 2050 ปริมาณน้ำมันดิบที่มีอยู่ในโลกจะหมดไป (Laherrère, 2003) จึงจำเป็นต้องหาแหล่งวัตถุดิบอื่นที่นำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิง วัสดุ และเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อทดแทนน้ำมันดิบ ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส นับได้ว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบที่เกิดขึ้นใหม่ ตลอดเวลา (renewable resources) เป็นที่ทราบกันดีว่า ส่วนประกอบหลักสำคัญที่อยู่ในชีวมวล คือ เซลลูโลส ถ้าหากสามารถนำเซลลูโลสจากชีวมวลมาใช้ประโยชน์ได้ จะทำให้มีแหล่งของเซลลูโลสที่มีต้นทุนต่ำ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง หน่วยย่อยของเซลลูโลสคือน้ำตาลกลูโคสที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตชีวภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ เอทานอล

บรรดาประเทศผู้นำ อาทิ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น และ ฝรั่งเศส ได้ทุ่มงบประมาณจำนวนมากในการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ผลิตเอทานอลจากชีวมวล ประเทศไทยมีแหล่งวัตถุดิบของชีวมวลจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย ทะลายปาล์มน้ำมัน ต้นปาล์มน้ำมัน และ พืชหรือไม้โตไวที่ปลูกขึ้นใช้ เช่น ปอ ป่าน ยูคาลิปตัส ยางพารา กระจับปี่ เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีที่ภาครัฐควรเห็นความสำคัญของงานวิจัยด้านชีวมวล และสนับสนุนงบประมาณอย่างจริงจัง ซึ่งจะประโยชน์ต่อประเทศไทยอย่างแท้จริงในอนาคต

เอทานอล เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ผสมน้ำมันเบนซิน เพื่อผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์ รัฐบาลไทยมีนโยบายสนับสนุนการใช้แก๊สโซฮอล์ เพื่อลดการนำเข้าน้ำมัน นอกจากนี้ เอทานอลยังใช้ผสมกับน้ำมันปาล์ม ผลิตไบโอดีเซลในรูปของเอทิลเอสเตอร์ได้ด้วย จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมไบโอดีเซลของไทย ปัจจุบันการผลิตเอทานอลในประเทศไทยใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลัง กากน้ำตาล และอ้อย อย่างไรก็ตามวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบก็สามารถใช้ผลิตเอทา-

นอลได้ แต่เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสในชีวมวล มีโครงสร้างเป็นผลึก (crystalline) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่แน่นหนา กอปรกับชีวมวลยังมีองค์ประกอบที่เป็นลิกนิน (lignin) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทำให้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนของการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและการหมักกลูโคสเพื่อเปลี่ยนให้เป็นเอทานอล ฉะนั้นจึงต้องทำการแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส และเพื่อปรับปรุงโครงสร้างของเซลลูโลสเอง ซึ่งขั้นตอนการแยกเซลลูโลสออกจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส และปรับปรุงโครงสร้างของเซลลูโลสนั้น กระทำได้โดยการทำพรีทรีตเมนต์ (pretreatment) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการพรีทรีตเมนต์ โดยศึกษาเทคนิคระเบิดไอน้ำ (steam explosion) และเทคนิคการกำจัดลิกนินโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (alkaline extraction) เพื่อช่วยทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น การกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้เหลือเฉพาะปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล โดยการระเบิดไอน้ำ เพื่อกำจัดเฮมิเซลลูโลส
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กำจัดลิกนินออกจากของเยื่อชีวมวล ที่ได้ภายหลังจากการระเบิดไอน้ำ
3. ศึกษาการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ของชีวมวลต่างลักษณะ
  - ก. วัตถุดิบเริ่มต้น
  - ข. เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ
  - ค. เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และการสกัดด้วยด่างสภาวะที่เหมาะสม

## การตรวจเอกสาร

### ชีวมวล

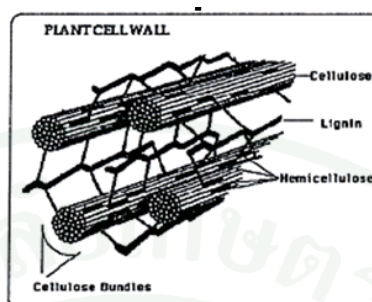
ชีวมวล คือสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งกักเก็บพลังงานจากธรรมชาติและสามารถนำมาใช้ผลิตพลังงานได้ เช่น เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรือกากทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม การเกษตร ได้แก่

แกลบ ได้จากการสีข้าวเปลือก  
 ชานอ้อย ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย  
 เศษไม้ ได้จากการแปรรูปไม้ยางพาราหรือไม้ยูคาลิปตัสเป็นส่วนใหญ่ และบางส่วนได้จากสวนป่าที่ปลูกไว้  
 กากปาล์ม ได้จากการสกัดน้ำมันปาล์มดิบออกจากผลปาล์มสด  
 กากมันสำปะหลัง ได้จากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง  
 ชังข้าวโพด ได้จากการสีข้าวโพดเพื่อนำเมล็ดออก  
 กาบและกะลามะพร้าว ได้จากการนำมะพร้าวมาปอกเปลือกออกเพื่อนำเนื้อมะพร้าวไปผลิตกะทิ และน้ำมันมะพร้าว  
 ลำเหล้ม ได้จากการผลิตแอลกอฮอล์ เป็นต้น  
 (นิรนาม, 2007)

ลิกโนเซลลูโลสิก (lignocellulosics) เป็นชีวมวลที่เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากที่สุดในโลก จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบไปด้วย เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ยังมีองค์ประกอบอื่นอยู่ในผนังเซลล์ของพืช มีทั้งส่วนที่ต้องทำการสกัด และที่ไม่ต้องสกัด โดยสารที่ต้องทำการสกัดประกอบไปด้วย ไขมัน แวกซ์ เทนิน เรซิน เป็นต้น ส่วนสารที่ไม่ต้องสกัด องค์ประกอบส่วนใหญ่คือพวกสารอินทรีย์ เช่น ซิลิกา คาร์บอนเนต ออกซาเลต เป็นต้น (Bharathi and Ravindra, 2006)

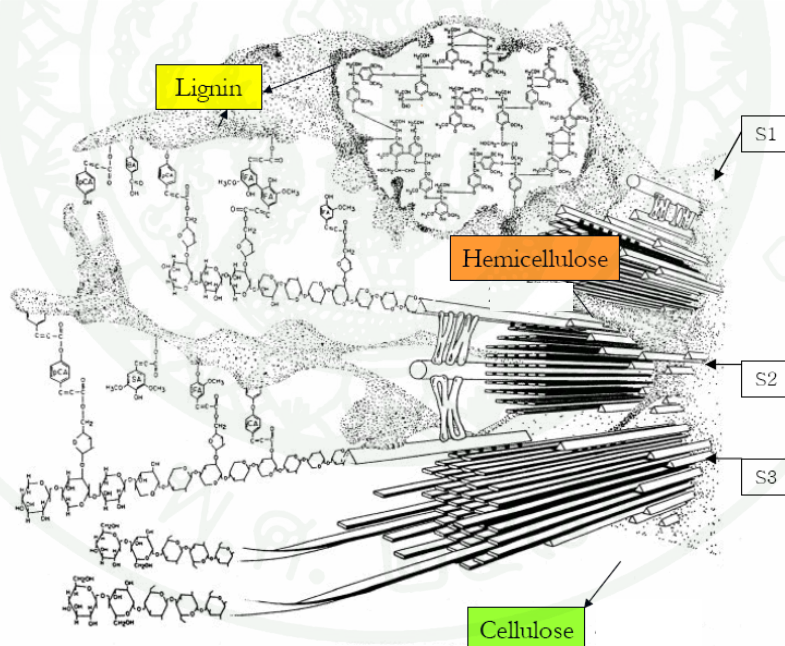
ชีวมวลแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนระหว่างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินไม่เท่ากัน แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งจะขึ้นกับ ชนิดและอายุของไม้ โดยไม้ที่มีลิกนินมาก จะมีความแข็งแรง และ

ในไม้ชนิดเดียวกัน ไม้ที่มีอายุมาก จะมีปริมาณลิกนินมาก โดยการจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในไม้จะเป็นไป ดังภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในชีวมวล

ที่มา: Sjostrom (1981)



ภาพที่ 2 ผนังเซลล์แบบทุติยภูมิ โครงสร้างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัตถุดิบชีวมวล (ชั้น S1 และ S3 มีเซลลูโลสโครงสร้างแบบหลวม (amorphous) และเฮมิเซลลูโลส เป็นส่วนใหญ่, ชั้น S2 มีเซลลูโลสโครงสร้างแบบผลึก เป็นส่วนใหญ่ (crystalline))

ที่มา: Bidlack (1992)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลชนิดต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง)

| Material           | Cellulose | Hemicellulose | Lignin | Ash     | Extractives |
|--------------------|-----------|---------------|--------|---------|-------------|
| Algae (green)      | 20-40     | 20-50         | -      | -       | -           |
| Cotton, flax, etc. | 80-95     | 5-20          | -      | -       | -           |
| Grasses            | 25-40     | 25-50         | 10-30  | -       | -           |
| Hardwoods          | 45±2      | 30±5          | 20±4   | 0.6±0.2 | 5±3         |
| Hardwood barks     | 22-40     | 20-38         | 30-55  | 0.8±0.2 | 6±2         |
| Softwoods          | 42±2      | 27±2          | 28±3   | 0.5±0.1 | 3±2         |
| Softwoods barks    | 18-38     | 15-33         | 30-60  | 0.8±0.2 | 4±2         |
| Cornstalks         | 39-47     | 26-31         | 3-5    | 12-16   | 1-3         |
| Wheat straw        | 37-41     | 27-32         | 13-15  | 11-14   | 7±2         |
| Newspapers         | 40-55     | 25-40         | 18-30  | -       | -           |
| Chemical pulps     | 60-80     | 20-30         | 2-10   | -       | -           |

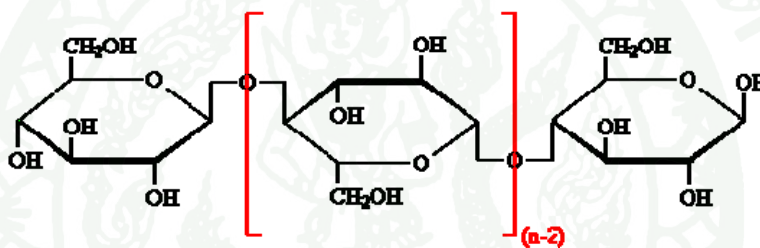
ที่มา: Goldstein (1981)

ในผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะมีการจัดเรียงตัวดังภาพที่ 1 และ 2 กล่าวคือ เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะเกิดการรวมกันเป็นมัดของเซลลูโลส (cellulose bundles) ซึ่งมีลิกนินล้อมรอบอยู่ โดยมีเฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลลูโลสกับลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน การจัดเรียงตัวในลักษณะดังกล่าว ทำให้เส้นใยที่อยู่ในผนังเซลล์ มีความแข็งแรงสูงขึ้น

## องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวล

### 1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างของโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสหลายหน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ  $\beta(1-4)$ -glycosidic (ภาพที่ 3) เซลลูโลสจะไม่ละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ เมื่อไฮโดรไลซ์สลายโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวนอกจากนี้ถ้าการไฮโดรไลซิสสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ และได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Anonymous, 2003)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา: Anonymous (n.d.)

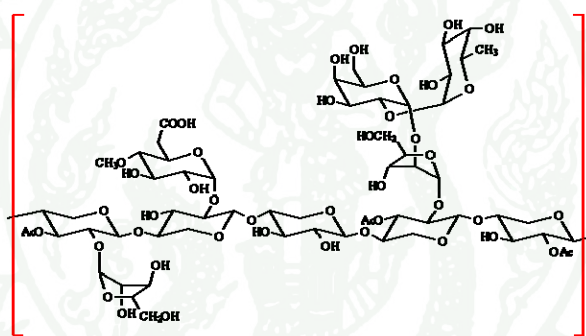
สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจจะสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ ส่วนที่เป็นเซลลูโลสโครงสร้างแบบผลึก (crystalline) นั้นจะมีความคงทนต่อเอนไซม์และกรดมาก ส่วนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนแต่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่มจะเรียกว่าเซลลูโลสแบบหลวม (amorphous) เซลลูโลสธรรมชาติส่วนใหญ่จะเป็นเซลลูโลสแบบผลึก หรือโครงสร้างแบบระเบียบซึ่งเรียงแน่นเป็นมัดไมโครไฟบริล มีความแข็งแรงและไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ใด ๆ ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของเซลลูโลสตามปริมาณการละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็น 3 ชนิด คือ

แอลฟาเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ไม่ละลายในสารละลายไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์

บีต้าเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด

แกมมาเซลลูโลส คือเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลายไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดแต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์ (วารณี และวิชัย, 2546)

## 2. เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: Anonymous (n.d.)

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไฮดรอกซิล (Amorphous polymeric carbohydrate) พบมากในพืชมะนาวและพืชมะนาว (ภาพที่ 4) เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 หรือ 6 โมเลกุล น้ำตาลที่ประกอบอยู่ในเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ ไซโลส, อะราบินอส, กลูโคส, กาแลกโตส และแมนโนส เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์เฮเทอโรไกลแคน (Heteroglycan) คือประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ กันตั้งแต่ 2-4 ชนิด ส่วน เฮมิเซลลูโลสชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียวเรียกว่า โฮโมไกลแคน (Homoglycan) นั้นจะพบเป็นส่วนน้อย ซึ่งชนิดของน้ำตาลและปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของพืช เฮมิเซลลูโลสละลายในสารละลายที่เป็นด่างเจือจาง ปกติจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบเพกทินในผนัง

เซลล์ของพืช โดยส่วนใหญ่แล้ว จะพบเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Anonymous, 1996)

สายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดปนกัน คือ

เพนโทแซน ส่วนใหญ่เป็นไซแลนและอะราบิแนน เมื่อนำไปไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส ไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น

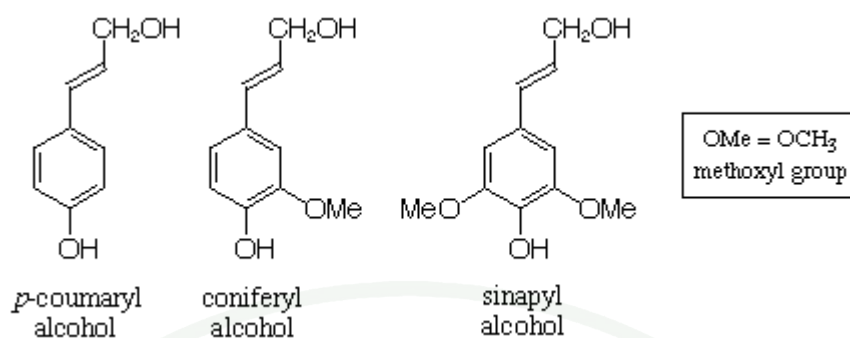
เฮกโซแซน ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน กาแลกแทน และกลูแคน เมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาล แมนโนส กาแลกโทส และกลูโคส ตามลำดับ

พอลิยูโรไนค์ ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดพอลิยูโรนิกและยังพบกรดยูโรนิกปนอยู่ด้วย ที่สำคัญคือ เฮกซูโลนิก (วรณี และวิชัย, 2546)

### 3. ลิกนิน (lignin)

ปกติลิกนินจะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกันและมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย นอกจากนี้ยังพบในโครงสร้างของเซลล์พืชบริเวณรอบ ๆ เซลลูโลสทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันเซลล์จากการไฮโดรลิซิสอีกด้วย 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 พบมากในพืชตระกูลหญ้า ส่วน coniferyl alcohol เป็นโมโนเมอร์ลิกนินที่มีมากในพืชใบแคบ (softwood) ด้านไม้ใบกว้าง (hardwood) พบว่ามีทั้ง coniferyl และ sinapyl alcohols เป็นโครงสร้างหลักในการรวมตัวเป็นลิกนิน โดยในไม้ใบแคบมีลิกนินอยู่ 26-32 เปอร์เซ็นต์ และไม้ใบกว้าง มีลิกนินอยู่ประมาณ 20-28 เปอร์เซ็นต์ (Richard, 2000)



ภาพที่ 5 โครงสร้างและชื่อโมโนเมอร์ลิกนิน

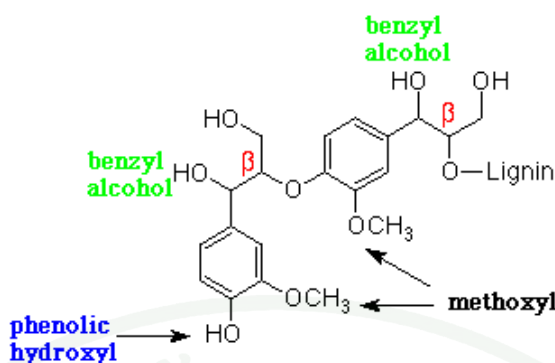
ที่มา: Richard (2000)

โครงสร้างลิกนิน มีความซับซ้อน และแตกต่างกันในพืชแต่ละสปีชีส์ มีการวิเคราะห์และวัดปริมาณหมู่ฟังก์ชันในไม้ โดยหมู่ฟังก์ชันหลักที่ถูกรวบรวมคือ methoxyl, phenolic hydroxyl และ benzyl alcohol (หมู่ hydroxyl บน alpha carbon) (Richard, 2000) แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 6 การที่ไม้ใบกว้างมีความแข็งแรงมากกว่าไม้ใบแคบ เนื่องจากการจัดรูปแบบของมอนอเมอร์ลิกนิน โดย ลิกนินในไม้ใบกว้าง มีมอนอเมอร์เป็น sinapyl alcohol ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน methoxyl 2 หน่วย เกาะอยู่ที่วงแหวน ทำให้สามารถเชื่อมต่อมอนอเมอร์ภายในลิกนินได้มากกว่า อีกทั้งไม้ใบกว้างมีโครงสร้างลิกนินที่มีหมู่ฟังก์ชัน methoxyl ปริมาณมาก ทำให้มีเกิดโครงสร้างลิกนินที่มีความซับซ้อนมากกว่า เมื่อเทียบกับในไม้ใบแคบ

ตารางที่ 2 ปริมาณหมู่ฟังก์ชันของลิกนินในไม้แต่ละชนิด

| หมู่ฟังก์ชัน      | ลิกนินในไม้ใบแคบ | ลิกนินในไม้ใบกว้าง |
|-------------------|------------------|--------------------|
| Methoxyl          | 95               | 150                |
| Phenolic Hydroxyl | 23               | 12                 |
| Benzyl Alcohol    | 35               | 45                 |

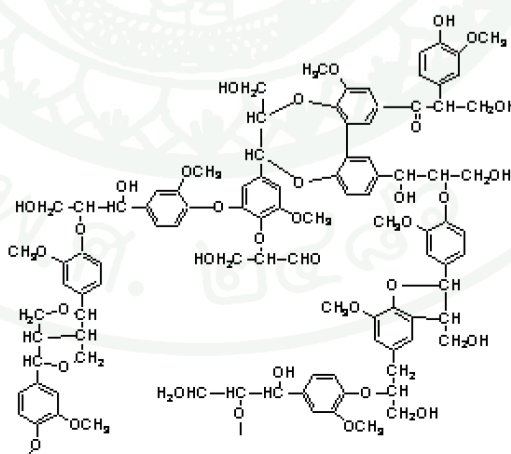
ที่มา: Richard (2000)



ภาพที่ 6 หมู่ฟังก์ชันของลิกนินในไม้

ที่มา: Richard (2000)

ลิกนิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนินเป็นสารที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมกันเป็นหน่วยย่อยหลายชนิดซึ่งเป็นสารอะโรมาติก ลิกนิน แสดงในภาพที่ 7 ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดเช่น ในเอทานอลหรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ลิกเนส หรือลิกนินเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในรา



ภาพที่ 7 โครงสร้างพอลิเมอร์ของลิกนิน

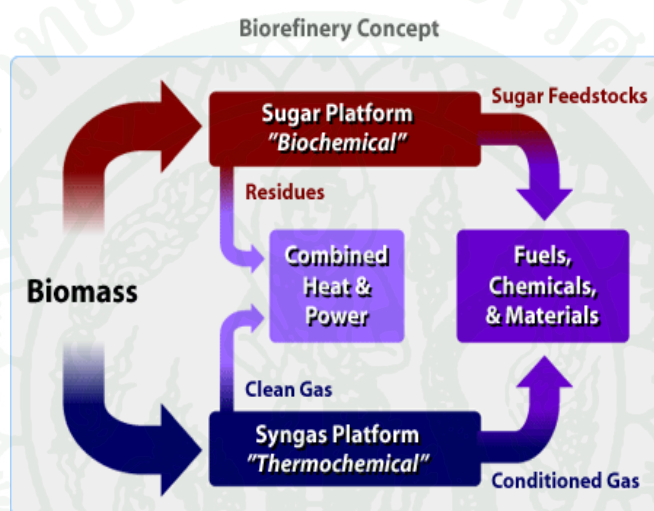
ที่มา: Lignin Institute (2002)

ลิกนินสามารถนำไปใช้ในการผลิตเป็นกาวยไม้ ส่วนผสมในคอนกรีต ส่วนผสมในอาหารสัตว์ หรือ ตัวเชื่อมต่อในอาหารสัตว์ สารควบคุมฝุ่นในท้องถนน และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น



## ไบโอรีไฟเนอรี

การนำชีวมวลประเภทไม้ หญ้า ผลผลิตทางการเกษตร วัสดุคิบทางชีวภาพ มาเปลี่ยนสภาพเป็น แหล่งสารเคมีหรือพลังงานที่มีค่า เช่น เชื้อเพลิงชนิดแข็ง ก๊าซ หรือเหลว ซึ่งก่อให้เกิดการปล่อยของเสียออกมาน้อยที่สุด เทคโนโลยีนี้เป็นรูปแบบของระบบการจัดการชีวมวล และเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ เพื่อนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิง พลังงาน และสารสังเคราะห์จากชีวมวล สรุปแนวคิดดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แนวคิดของไบโอรีไฟเนอรี

ที่มา: นิรนาม (ม.ป.ป.)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก ไบโอรีไฟเนอรี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในโรงงานผลิตสารเคมี พอลิเมอร์ และเชื้อเพลิง อย่างไรก็ตาม ตลาดยังไม่เปิดกว้างที่จะยอมรับผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จากกระบวนการไบโอรีไฟเนอรี คาดว่าอนาคต ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไบโอรีไฟเนอรี จะได้รับการยอมรับในตลาดการค้า การผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล จะเป็นจุดเริ่มต้นของการอยู่รอดทางเศรษฐกิจของกระบวนการไบโอรีไฟเนอรี ถ้าหากเอทานอลที่กลั่นได้น้ำอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ (Hydrated Ethanol 95%) จะสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงกับเครื่องยนต์สันดาปภายในได้ หากสามารถกลั่นเอทานอลจนบริสุทธิ์ได้ถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 2 รูปแบบ คือ ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินได้แก๊สโซฮอล์ หรือผสมกับน้ำมันดีเซลจะได้ ดีเซลโซฮอล์ หรือใช้เป็นสารเคมีเพิ่มออกเทนให้เครื่องยนต์ได้ (นิรนาม, 2540)

## ชนิดของชีวมวล

การศึกษานี้ได้ศึกษาการใช้ชีวมวล 2 ชนิด คือ ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา

### 1. ยูคาลิปตัส

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Eucalyptus* sp. ชื่อวงศ์คือ Myrtaceae ชื่อสามัญคือ ยูคาลิปตัสชื่อทางการค้าคือ Red gum

ยูคาลิปตัสเป็นพันธุ์ไม้ต่างประเทศ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปออสเตรเลียเป็นส่วนใหญ่ สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกสภาพดิน ตั้งแต่ดินทราย ดินเค็ม ดินเปรี้ยว แต่ไม่ทนดินที่มีหินปูนสูง ทนต่อความแห้งแล้งได้ (ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ, 2550)

ความต้องการเชื้อยูคาลิปตัส มีเพิ่มมากขึ้นในตลาดโลกของเชื้อไม้ไผ่กว้าง โดยจะมีการผลิตรวม 10 ล้านตัน/ปี และทุกปีมีปริมาณการผลิตจะเพิ่มขึ้น 6 เปอร์เซ็นต์ มากเป็นสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไม้ทั่วไป (Patt *et al.*, 2006) โดยองค์ประกอบทางเคมีของยูคาลิปตัสมีดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus*)

| องค์ประกอบ  | ร้อยละ (เทียบกับน้ำหนักแห้งของชีวมวล) |
|-------------|---------------------------------------|
| เซลลูโลส    | 51.3                                  |
| ลิกนิน      | 21.9                                  |
| ไซแทน       | 19.9                                  |
| กลูโคแมนแนน | 1.4                                   |
| สารแทรก     | 2.5                                   |

ที่มา: Patt *et al.* (2006)

ไม้ยูคาลิปตัสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางตรงได้หลายหลายอย่างดังนี้

ทำไม้ใช้สอย เฟอร์นิเจอร์ เครื่องเรือน ทำรั้ว ทำคอกปศุสัตว์ ทำเสา ใช้ในการก่อสร้างต่างๆ ไม้ยูคาลิปตัสสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาคารบ้านเรือนได้ แต่ควรจะได้ทำการอาบน้ำยารักษาเนื้อไม้ไว้ก่อน ก็จะยืดอายุการใช้งานได้นาน

ทำฟืน เผาถ่าน ถ่านไม้ยูคาลิปตัสใช้เป็นเชื้อเพลิงดีไฟได้ดีและมีเขี้ยวเล็กน้อย จากการทดลอง ไม้ฟืนยูคาลิปตัสให้พลังงานความร้อน 4,800 แคลอรี/กรัม ส่วนถ่านไม้ยูคาลิปตัสให้พลังงานความร้อน 7,400 แคลอรี/กรัม ซึ่งให้ความร้อนใกล้เคียงกับถ่านไม้โกงกาง ซึ่งจัดว่าเป็นถ่านไม้ชั้นดีที่สุด

ทำชิ้นไม้สับ ไม้ยูคาลิปตัสเมื่อนำมาแปรรูปและสับทำชิ้นไม้สับ สามารถนำไปผลิตแผ่นชิ้นไม้อัด แผ่นใยไม้อัด และแผ่นไม้อัดซีเมนต์ นอกจากนี้ได้มีโรงงานผลิตชิ้นไม้สับ เพื่อนำส่งไปจำหน่ายให้กับโรงงานเยื่อกระดาษทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น ประเทศเกาหลี ไต้หวัน และญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งมีความต้องการสูงมาก ไม้ท่อนยูคาลิปตัส 2.2 ตัน นำ มาผลิตเป็นชิ้นไม้สับได้ 1 ตัน ราคาชิ้นไม้สับ ประมาณตันละ 3,000 บาท

ทำเชื้อไม้ ไม้ยูคาลิปตัสสามารถแปรรูปทำเชื้อไม้ยูคาลิปตัส ซึ่งมูลค่าผลผลิตเชื้อไม้ราคาตันละ 17,000 บาท โดยไม้ท่อนยูคาลิปตัส 4.5 ตัน ผลิตเชื้อไม้ได้ 1 ตัน เชื้อไม้ให้สารพวกเซลลูโลส ซึ่งนำไปใช้ทำเส้นใยเรยอนและทำผ้าแทนเส้นใยฝ้าย และปุ๋ยนุ่นได้อีกด้วย โดยมูลค่าเพิ่มขึ้นเป็นตันละ 60,000 บาท และเมื่อนำเส้นใยเรยอนมาปั่นเป็นเส้นด้าย และทอเป็นผ้าจะมีมูลค่าสูงถึง ตันละ 75,000 บาท และ 300,000 บาท ตามลำดับ

ทำกระดาษ จากการประเมินเชื้อไม้ยูคาลิปตัส 1 ตัน ผลิตกระดาษได้ประมาณ 1.5 ตัน เชื้อไม้ยูคาลิปตัสมีคุณสมบัติเด่น คือ มีความฟูสูง และมีความทึบแสง ประกอบกับ ไฟเบอร์มีความแข็งแรงเหมาะต่อการใช้ทำกระดาษพิมพ์เขียนประเภทต่าง ๆ ได้ (นิรนาม, ม.ป.ป)

เนื่องจากชีวมวลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส ซึ่งอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อนกับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ส่วนที่นำมาใช้ได้ คือ เซลลูโลสเท่านั้น เมื่อมองโครงสร้างของเซลลูโลสที่มีโครงสร้างแบบหลวม จึงต้องทำการปรับปรุงโครงสร้างของเซลลูโลส โดยการแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เพราะส่วนประกอบทั้งสองและโครงสร้างดังกล่าว ทำให้พื้นที่ผิวในการเกิด

ปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ซึ่งการมีลิกนินปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการไฮโดรลิซิสสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดี และเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ฉะนั้น การพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอลก็เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

## 2. กระถินเทพา

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Acacia mangium* Willd ชื่อวงศ์คือ Leguminosae-Mimosoideae ชื่อสามัญคือ Kra thin te pha (ไทย), Sabah salwood, Tongke hutan หรือ mangge hutan (อินโดนีเซีย) ชื่อทางการค้าคือ Brown salwood (ชื่อทางการค้าของออสเตรเลีย) (ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, ม.ป.ป.)

ไม้กระถินเทพาเป็นพันธุ์ไม้อะเคเซีย ที่มีการปลูกป่าเศรษฐกิจอย่างจริงจัง และเป็นชนิดไม้ที่ปลูกกันมาในต่างประเทศมากที่สุดโดยเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และเวียดนาม (Awang และ Taylor, 1993) สำหรับในประเทศไทยก็มีการปลูกกันมากเช่นเดียวกัน เพราะกระถินเทพามีการเจริญเติบโตเร็ว ลำต้นเปลาตรง ให้ผลผลิตได้สูง (Harwood and Williams, 1992)

ไม้กระถินเทพา ถูกศึกษาถึงปริมาณ และคุณลักษณะทางโครงสร้างของลิกนิน ไซแลนและเซลลูโลส โดย Pinto (2005) แสดงดังตารางที่ 4 สรุปองค์ประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของไม้กระถินเทพา (*Acacia mangium*)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา (*Acacia mangium*)

| องค์ประกอบ                   | 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                    | 1.0                                   |
| - Galactose                  | 0.6                                   |
| - Glucose                    | 48.0                                  |
| Uronic acids                 | 7.6                                   |

ที่มา: Pinto *et al.* (2005)

การใช้ประโยชน์จากส่วนต่าง ๆ ของกระถินเทพา มีดังนี้

เนื้อไม้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ทำไม้แปรรูปเฟอร์นิเจอร์ ไม้โครงสร้างต่าง ๆ หรือใช้ในงานก่อสร้างที่ไม่ต้องรับน้ำหนักมากและไม่เป็นชิ้นส่วนที่ฝังลงในดิน นอกจากนี้ไม้กระถินเทพา ยังสามารถนำมาแปรรูปทำไม้อัด หรือเชื้อกระดาษที่มีคุณภาพดีได้อีกด้วย

ใบ สามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ในยามขาดแคลน และใช้เป็นแหล่งให้น้ำหวานสำหรับการเลี้ยงผึ้งได้เป็นอย่างดี เนื่องจากบริเวณโคนใบของกระถินเทพามีต่อมน้ำหวาน ซึ่งมักพบแมลงต่าง ๆ มารุมตอมหาอาหารอยู่เป็นประจำ

ดอกและเกสร เป็นแหล่งอาหารของผึ้งได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับใบ

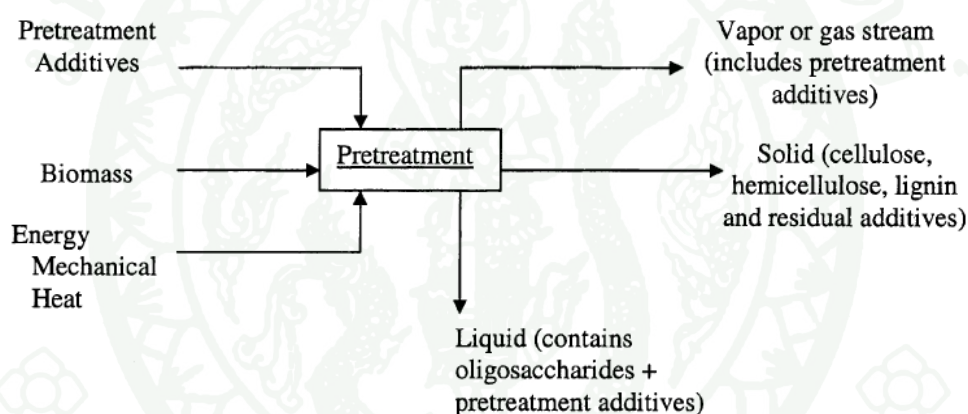
การปรับปรุงดิน เนื่องจากกระถินเทพาเป็นพืชตระกูลถั่ว มีปมรากที่ตรึงธาตุไนโตรเจนมาใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้นจึงมีความสามารถในการปรับปรุงบำรุงดินให้ดีขึ้นได้

ประโยชน์อื่น ๆ นอกจากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ต้นกระถินเทพายังสามารถปลูกเพื่อใช้เป็นร่มเงา เป็นไม้ประดับ เป็นพืชคลุมดิน และแนวกันลมได้อีกด้วย (อำนาจ และ สมศรี, 2550)

ไม้กระถินเทพา มีการนำไปปลูกป่าเพื่อเป็นไม้ใช้สอย ทดแทนไม้จากป่าธรรมชาติที่ลดลง และใช้เพื่อปลูกในพื้นที่เสื่อมโทรม เพื่อพัฒนาสภาพพื้นที่ให้เกิดประโยชน์ และเทคโนโลยีในปัจจุบันก็ทำให้กระถินเทพา สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นเยื่อกระดาษ และอุตสาหกรรม Medium Density Fiberboard (MDF) (วิฑูรย์, ม.ป.ป.)

## การพรีทรีตเมนต์

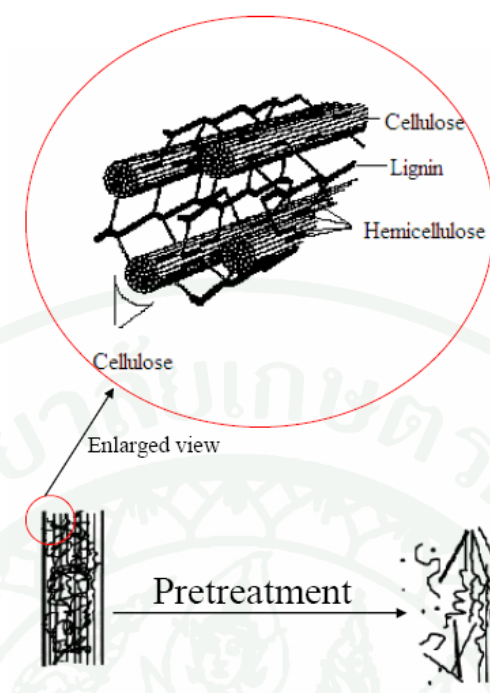
การพรีทรีตเมนต์ ดังภาพที่ 9 เป็นขั้นตอนแรกในการแยกวัตถุดิบชีวมวล ให้เป็นองค์ประกอบหลักต่าง ๆ ของพืช คือลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส วัตถุประสงค์ของการทำพรีทรีตเมนต์คือ เพื่อกำจัดลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสออก ลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบชีวมวล ดังภาพที่ 10 และ 11 ประโยชน์ของการพรีทรีตเมนต์คือ (1) ช่วยปรับปรุงการเกิดน้ำตาล หรือช่วยเพิ่มความสามารถในการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ให้กลายเป็นน้ำตาล (2) ป้องกันการไฮโดรลิซิสหรือสูญเสียของคาร์โบไฮเดรต (3) ป้องกันการเกิดผลพลอยได้ที่ไปยับยั้งขั้น ตอนของการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ และกระบวนการหมัก และ (4) ช่วยลดต้นทุนในกระบวนการหมัก (Sun and Cheng , 2002)



ภาพที่ 9 กระบวนการพรีทรีตเมนต์

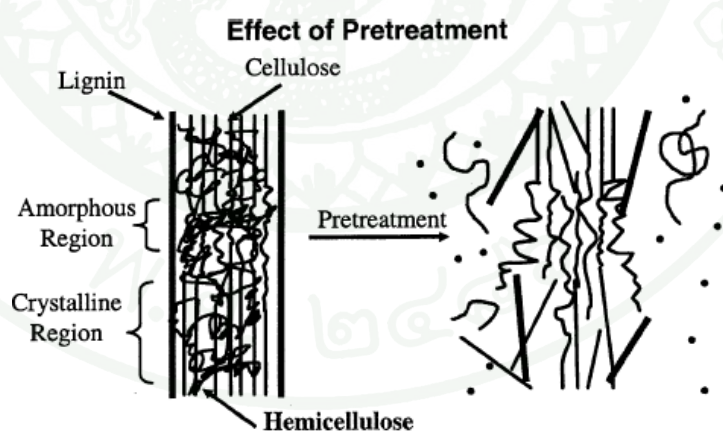
ที่มา: Mosier *et al.* (2005)

วิธีการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลมีมากมาย ดังตัวอย่างตารางที่ 5 ซึ่งสามารถแบ่งจำแนกออกได้ดังนี้ คือกระบวนการทางกายภาพ เคมีกายภาพ เคมี และชีวภาพ



ภาพที่ 10 วัตถุประสงค์ของการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mosier *et al.* (2005)



ภาพที่ 11 วัตถุประสงค์ของการพรีทรีตเมนต์ชีวมวล

ที่มา: Mosier *et al.* (2005)

ตารางที่ 5 ผลของวิธีการพรีทรีตเมนต์ ต่อการไฮโดรลิซิสของชีวมวลแต่ละชนิด

| Pretreatment                                                                          | Biomass         | Pretreatment Agent loading                                                     | Time       | Temperature | Effect on digestibility (%) |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|-----------------------------|
| NH <sub>3</sub>                                                                       | Trembling aspen | 155 psi at 30 °C                                                               | 8.5 h      | 30          | 33-51 <sup>a</sup>          |
| SO <sub>2</sub>                                                                       | aspen           | 30 psi at room temperature                                                     | 2 h        | 120         | 9-63 <sup>b</sup>           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                                        | Poplar          | 0 to 1.5%                                                                      | 3.6-12.7 s | 162 to 222  | 21.4 to 74.9 <sup>c</sup>   |
| NaOH                                                                                  | Trembling aspen | 0.2 g/g dry biomass                                                            | 1 h        | 30          | 11 to 51 <sup>d</sup>       |
| NH <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                       | Hybrid poplar   | NH <sub>3</sub> =20 wt%<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> =0.28 g/g dry biomass | 90 min     | 170         | 90 <sup>e</sup>             |
| Steam explosion (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> ) |                 |                                                                                | 10 min     | 160-260     |                             |
| AFEX                                                                                  |                 | 1-2 g NH <sub>3</sub> /g dry biomass                                           | 30 min     | 90          |                             |
| Lime                                                                                  | Corn Stalks     | 0.12 g Ca(OH) <sub>2</sub> /g dry biomass                                      | 24 h       | RTe         | 55.55-85.59 <sup>f</sup>    |

หมายเหตุ a น้ำหนักแห้งที่ได้จากการไฮโดรลิซิสในหลอด (*in vitro* dry matter digestibility; IVDMD)

b การไฮโดรลิซิสในหลอด (*in vitro* digestibility; IVD)

c ผลได้ของน้ำตาลกลูโคส (Glucose yield)

d ผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar yield)

e RT คือ อุณหภูมิห้อง

f สัมประสิทธิ์การไฮโดรลิซิสเส้นใยหยาบ (Crude fibre digestion coefficient)

ที่มา: Ramirez (2005)

## 1. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางกายภาพ

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบชีวมวล และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าไปไฮโดรไลซ์ทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น และเพื่อลดโครงสร้างของเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างแบบผลึก ถ้าใช้กระบวนการทางกล วัตถุดิบจะถูกบดให้ละเอียด โดยการตัด การบด หรือ การใช้ความร้อน ซึ่งขนาดของวัตถุดิบจะถูกทำให้อยู่ระหว่าง 10-30 มิลลิเมตร หลังจากที่ผ่านมาการ

ตัด จะมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร เมื่อผ่านการบดหรือโม้ โดยเครื่องโม้แบบสั่น จะทำให้การแตกออกของส่วนโครงสร้างแบบผลึก มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในจีนไม้สน spruce และ aspen รวมทั้งยังช่วยปรับปรุงขั้นตอนในการไฮโดรลิซิสของชีวมวล ได้มากกว่าเครื่องบดแบบดั้งเดิม (Millet *et al.*, 1976) โดยพลังงานที่ต้องใช้สำหรับกระบวนการนี้จะมากขึ้นกับขนาดของวัตถุดิบชีวมวล และคุณสมบัติเฉพาะของชีวมวลแต่ละชนิด โดยการเปรียบเทียบตัวอย่างชีวมวลบางชนิด (Sun *et al.*, 2002) แสดงในตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** ปริมาณพลังงานที่ใช้กระบวนการทางกลเพื่อลดขนาดของชีวมวลที่มาจากการเกษตร ที่มีขนาดแตกต่างกัน

| Lignocellulosic material | Final size (mm) | Energy consumption (kWh/ton) |                 |
|--------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
|                          |                 | Knife mill                   | Hammer mill     |
| Hardwood                 | 1.60            | 130                          | 130             |
|                          | 2.54            | 80                           | 120             |
|                          | 3.20            | 50                           | 115             |
|                          | 6.35            | 25                           | 95              |
| Straw                    | 1.60            | 7.5                          | 42              |
|                          | 2.54            | 6.4                          | 29              |
| Corn stover              | 1.60            | NA <sup>a</sup>              | 14              |
|                          | 3.20            | 20                           | 9.6             |
|                          | 6.35            | 15                           | NA <sup>a</sup> |
|                          | 9.50            | 3.2                          | NA <sup>a</sup> |

หมายเหตุ NA<sup>a</sup> คือ ไม่สามารถวัดได้

ที่มา: Sun and Cheng (2002)

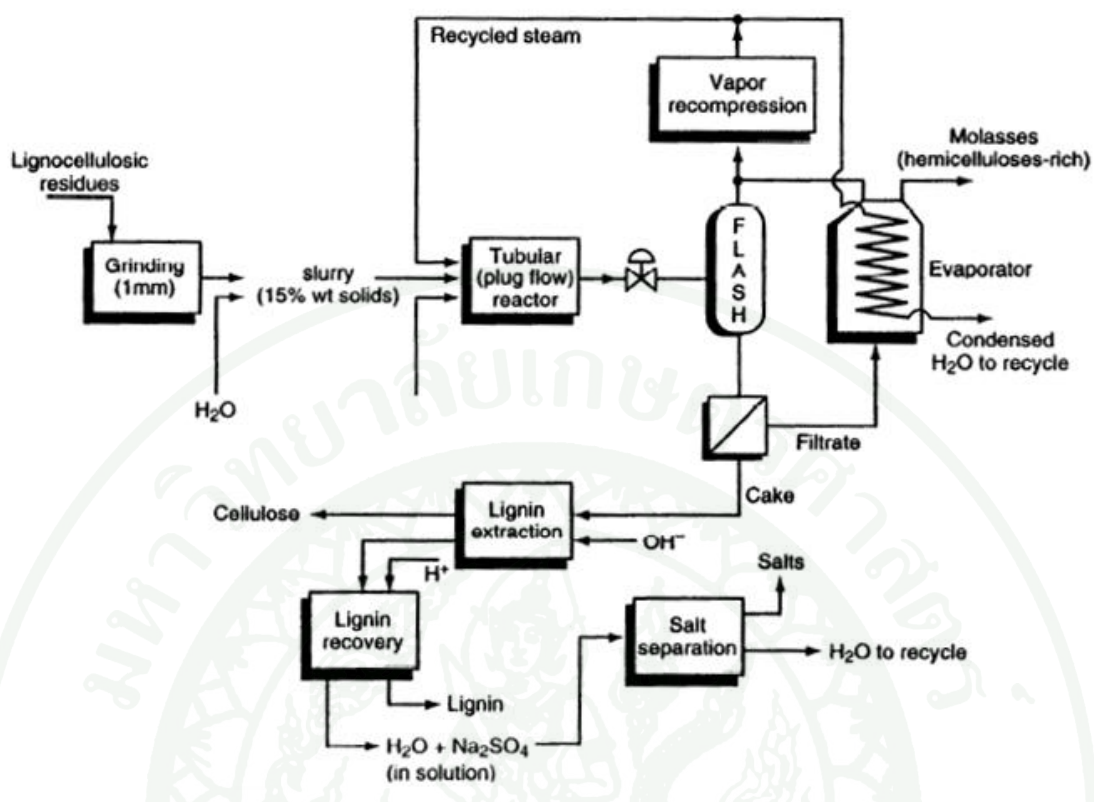
## 2. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ

### 2.1 การระเบิดไอน้ำ (steam explosion หรือ autohydrolysis)

การระเบิดไอน้ำเป็นวิธีการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลเบื้องต้นที่นิยมมากที่สุด ชีวมวลที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ จะถูกพรีทรีตโดยใช้ไอน้ำอัมตวที่ความดันสูง และความดันจะลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้วัตถุดิบระเบิดสลายตัวออกมา การระเบิดไอน้ำจะเริ่มดันที่อุณหภูมิตั้งแต่ 160 ถึง 260 องศาเซลเซียส (เทียบได้กับความดันที่ 0.69 ถึง 4.83 MPa) และใช้เวลาหลายวินาที จนถึงไม่กี่นาที ก่อนที่วัตถุดิบจะถูกทำให้ระเบิดที่ความดันบรรยากาศ กระบวนการนี้เป็นสาเหตุทำให้เฮมิเซลลูโลส ถูกไฮโดรไลซ์และสลายออกมา อีกทั้งทำให้ลิกนินเปลี่ยนสภาพ เนื่องจากอุณหภูมิที่สูง ดังนั้นจึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนของการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (Silverstein, 2004)

ในถึงปฏิกรณ์ไอน้ำที่เกิดภายใต้ความดันสูง จะแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของชีวมวล โดยการแพร่ไอน้ำจะเกาะอยู่ภายใต้ความดันสูง ทำให้วัตถุดิบเปียก โดยชีวมวลมีความชื้นเมื่อผ่านการระเบิดไอน้ำแล้ว จะทำให้กลุ่มแอซิติลของส่วนเฮมิเซลลูโลสเกิดการแตกตัวออกเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแอซิติค และกรดยูโรนิก โดยกรดเหล่านี้สามารถถูกเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับไปเป็นเฮมิเซลลูโลสได้ใหม่ รวมทั้งชีวมวลเมื่อผ่านการระเบิดไอน้ำ จะปลดปล่อยน้ำตาลกลุ่มไซแลน และกลูแคน บางส่วนออกมา ภายใต้สภาวะเป็นไอน้ำ บริเวณโครงสร้างแบบหลวม (amorphous) ของเซลลูโลสจะถูกไฮโดรไลซ์ที่บางอุณหภูมิ ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความดันสูง อย่างไรก็ตาม จะทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสน้ำตาลไซโลสไปเป็น เฟอร์ฟูรอล และกลูโคสถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอลได้ โดยเฟอร์ฟูรอลจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นอุปสรรคในการนำวัตถุดิบไปทำการหมักต่อไป (Jeoh, 1998)

การศึกษาต้นไม้ Poplar ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์โดยการระเบิดไอน้ำ พบว่าการไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ ได้เพียง 15 เปอร์เซ็นต์การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การไฮโดรลิซิสที่สูงนี้แสดงให้เห็นว่า เกิดกลไกการทำลายเซลลูโลสโครงสร้างแบบผลึกขึ้น ระหว่างการระเบิดภายใต้ปฏิกรณ์ (Grous *et al.*, 1986)



ภาพที่ 12 แผนผังแสดงตัวอย่างระบบการเบิดไอน้ำ/สารละลาย

ที่มา: Kokta and Ahmed (1998)

กระบวนการฟิรติเมนต์โดยการระเบิดไอน้ำนี้ สามารถอธิบายได้ว่า มีตัวแปรหลัก อยู่ 2 อย่าง คือ เวลาที่ชีวมวลอยู่ในถังปฏิกรณ์ที่มีไอน้ำ และอุณหภูมิที่ทำให้เกิดไอน้ำ โดยระยะเวลาที่ชีวมวลอยู่ในถังปฏิกรณ์ จะช่วยให้สามารถคาดการณ์ได้ถึงปริมาณที่ เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ออกมาได้ โดยพิจารณาจากกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น การที่เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ก่อนจะทำให้กระบวนการหมักทำได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่นานเกินไป อาจทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสที่ต้องการละลายออกไปด้วย ทำให้เกิดการสูญเสียได้ ฉะนั้นการเตรียมวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อใช้ในการหมัก จะต้องทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสน้อยที่สุด โดยการปรับอุณหภูมิจะควบคุมความดันเพื่อทำให้เกิดไอน้ำภายในถังปฏิกรณ์ ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ความดันสูงขึ้น ทำให้เกิดความแตกต่างกันระหว่างความดันภายในถังปฏิกรณ์และความดันบรรยากาศภายนอกมากขึ้น ความดันที่แตกต่างกันนี้ เมื่อความดันลดลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้ส่วนต่าง ๆ ภายในชีวมวลที่อยู่ภายในถังปฏิกรณ์แยกออกจากกัน (Jeoh, 1998)

ตัวแปรสำคัญของการระเบิดไอน้ำ คือ อุณหภูมิของไอน้ำ และระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด เมื่อทำการรวมตัวแปรทั้งสองให้เป็นตัวแปรเดียวกัน เรียกว่า ค่าแฟกเตอร์ของความรุนแรง (severity factor, Ro) ดังสมการที่ 1 หรือ 2

$$Ro = \int_0^t \exp[(T-100)/14.75] dt \quad --(1)$$

หรือ

$$\log Ro = \log \{ t \exp [(T-100)/14.75] \} \quad --(2)$$

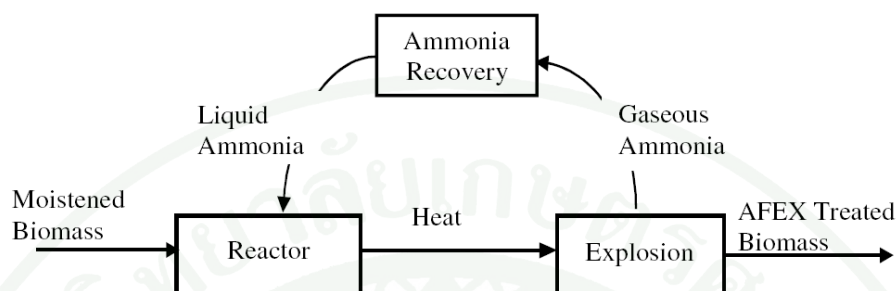
|       |    |     |                                 |
|-------|----|-----|---------------------------------|
| เมื่อ | Ro | คือ | ค่า severity factor             |
|       | t  | คือ | ระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด (นาท) |
|       | T  | คือ | อุณหภูมิของไอน้ำ (องศาเซลเซียส) |

ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยวิธีระเบิดไอน้ำคือ เป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสำหรับไม้ใบกว้างและวัสดุการเกษตร แต่มีประสิทธิภาพน้อยเมื่อใช้กับไม้ใบแคบ (Clark and Mackie, 1987) มีประสิทธิภาพในการไฮโดรลิกซิสเอมิเซลล์ลอส และช่วยส่งเสริมให้ขั้นตอนการกำจัดลิกนินง่ายขึ้น โดยจะช่วยขยายขนาดของรูพรุนภายในผนังเซลล์ ซึ่งจะเป็ผลดีสำหรับการไฮโดรลิกซิสเซลล์ลอสในขั้นตอนถัดไป อีกทั้งไม่มีส่วนเหลือทิ้งที่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้ไม่มีต้นทุนในส่วนการกำจัดหรือทำให้เป็นกลางก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม เหมือนการพรีทรีตเมนต์โดยใช้สารเคมี ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจจะไปเพิ่มค่าองค์ความเป็นผลึกของบริเวณโครงสร้างแบบหลวม (amorphous) ซึ่งจะปลดความสามารถในการไฮโดรลิกซิสเซลล์ลอสลง และยังต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพง นั่นคือถึงปฏิกิริยาที่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (Pauley, 2007)

## 2.2 การระเบิดเยื่อด้วยแอมโมเนีย (Ammonia Fiber Explosion; AFEX)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายแอมโมเนีย ในรูปแบบไหลผ่านตลอดของสารละลายแอมโมเนีย (5-15 เปอร์เซ็นต์) ผ่านถึงปฏิกิริยาแบบคอลัมน์ ซึ่งมีชีวมวลบรรจุอยู่ ภายในถังมีอุณหภูมิประมาณ 160-180 องศาเซลเซียส และของเหลวที่ไหลเข้าไปมีอัตราเร็วอยู่ที่ 1 มิลลิเมตร/ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาท โดยใช้เวลารวมในถัง 14 นาท และลดความดันลงอย่างรวดเร็ว วิธีนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นกระบวนการ ammonia recycled percolation (ARP) ซึ่งแอมโมเนียสามารถถูกแยกออกและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ภายใต้สภาวะเหล่านี้ โดยสารละลายแอมโมเนีย จะทำปฏิกิริยาเริ่มต้น

กับลิกนิน และเป็นเหตุให้เกิดการแตกตัวของพอลิเมอร์ลิกนิน และเกิดการตัดตรงบริเวณที่เชื่อมกันระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต (Mosier *et al.*, 2005)



ภาพที่ 13 กระบวนการ Ammonia Fiber Explosion

ที่มา: Teymouri *et al.* (2005)

ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยวิธีระเบิดด้วยแอมโมเนียคือ เกิดการไฮโดรลิซิสน้ำตาลที่เป็นผลผลิตได้น้อยกว่าการไฮโดรลิซิสโดยใช้กรด ซึ่งจะสูญเสียผลผลิตได้น้อยกว่า โดยน้ำตาลที่ถูกไฮโดรไลซ์จะมีข้อจำกัดทางด้านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนถัดไป ทำการปรับปรุงอัตราการไฮโดรลิซิสของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในไม้ล้มลุกและหญ้า อีกทั้งแอมโมเนียที่หลงเหลืออยู่ในเชื้อชีวมวลยังสามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักต่อไป และแอมโมเนียสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ในรูปของแก๊ส ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องทำให้เป็นกลางต่อไป ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้พลังงานที่สูงมากเพื่อให้ความดันอยู่ในระดับสูงเป็นกระบวนการใหม่ที่ยังไม่มีการพัฒนาต่อ นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพกับไม้ใบกว้างและไม้ใบแคบ และพบว่าประสิทธิภาพของ AFEX ลดลง เมื่อปริมาณลิกนินในชีวมวลเพิ่มขึ้น (Pauley, 2007)

### 3. การพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมี

#### 3.1 การพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรด

กรดซัลฟูริกเจือจางจะผสมเข้ากับชีวมวล เพื่อไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และสลายน้ำตาลไซโลสให้กลายเป็นเฟอร์ฟูรอลต่อ เฟอร์ฟูรอลจะนำกลับคืนมาโดยการกลั่น กรดที่ผสมหรือสัมผัสกับชีวมวลจะคงอยู่ในอุณหภูมิ 160-220 องศาเซลเซียส ใช้ช่วงเวลาจากวินาทีเป็นนาฬิกา โดยกรดซัลฟูริกถูกนำมาใช้ในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส และการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

กระบวนการเกือบทั้งหมดจะคล้ายกับการระเบิดไอน้ำ ส่วนผสมของกรดและชีวมวล ถูกให้ความร้อนโดยตรงโดยผ่านผนังของถังหรือฉนวนไอน้ำร้อนหล่อรอบนอกถัง จากนั้นภายในถังฉีดพ่นกรดเข้าไป ให้ความร้อน และกวนให้กรดสัมผัสชีวมวลทั่วถึง กรดจะซึมเข้าไปในชีวมวล การใช้กรดเจือจางจะมีความสำคัญตรงที่ไม่ค่อยมีการกัดกร่อน เหมาะกับวัสดุในกระบวนการที่มีราคาแพง และเชื้อที่ผ่านกรดต้องผ่านการทำให้เป็นกลาง ก่อนเข้าสู่กระบวนการไฮโดรลิซิสให้เป็นน้ำตาล และก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (Mosier, 2005)

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

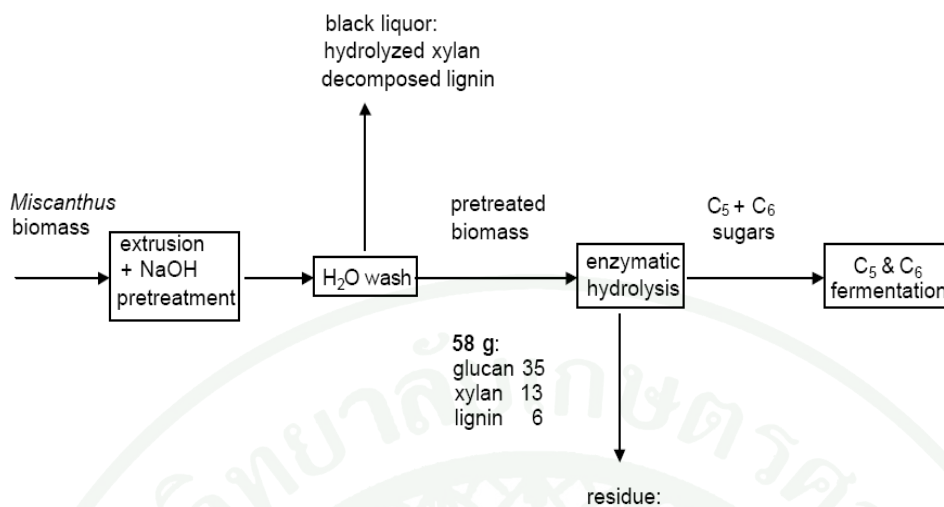
ข้อดีของการพรีทรีตเมนต์โดยใช้กรดคือ ให้ผลได้ของน้ำตาลเฮมิเซลลูโลสสามารถรวมถึงการทำความสามารถในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสสูง โดยการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้มากกว่าเซลลูโลส ทำให้เหมาะสมต่อการไฮโดรลิซิสเอนไซม์ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออกได้ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือจำเป็นต้องมีขั้นตอนการสะเทินกรดให้เป็นกลาง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการไฮโดรลิซิน้ำตาลต่อ ทำให้ผลได้ของน้ำตาลลดลง และได้องค์ประกอบอื่นเกิดขึ้น ได้แก่ กรดแอซิดิก และเฟอร์ฟูรอล เป็นต้น ที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ในขั้น ตอนการหมักได้ วิธีการนี้ยังต้องการอุปกรณ์ที่มีราคาแพง โดยถึงปฏิกิริยาที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อน และแข็งแรงในอุณหภูมิและความดันสูงได้ (Pauley, 2007)

### 3.2 การพรีทรีตเมนต์โดยต่าง

การใช้สารละลายต่าง ในการพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบชีวมวล มีประสิทธิภาพคือขึ้นอยู่กับปริมาณลิกนิน โดยมีกลไกของปฏิกิริยา saponification ของพันธะเชื่อมโยงของเอสเทอร์ภายในโมเลกุลของไซแกลนของเฮมิเซลลูโลส และองค์ประกอบอื่น เช่น ลิกนิน กับด่างแก่ มีรายงานว่ารพูนของวัสดุ lignocelluloses เพิ่มขึ้น โดยการกำจัดพันธะเชื่อมโยง (Silverstein, 2004) การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางทำให้วัสดุเกิดการพองตัวส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น degree of polymerization และความเป็นผลึกลดลง เกิดการแยกตัวของโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางนี้สามารถลดเปอร์เซ็นต์ของลิกนินลงได้ในไม้ใบกว้างและส่งผลดีต่อพืชจำพวกฟางที่มีปริมาณลิกนินต่ำ แต่ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง

ในการพรีทรีตเมนต์ นิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โดยทำวัตถุดิบให้เปียกชุ่มด้วยด่าง ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิวสัมผัสภายใน และลดจำนวนหน่วยมอนอเมอร์เฉลี่ยในโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เรียกว่า ดัชนีของการเกิดพอลิเมอร์ รวมทั้งลดส่วนโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส อีกทั้งยังแยกโครงสร้างที่เชื่อมกันระหว่างลิกนิน และคาร์โบไฮเดรต และทำให้โครงสร้างลิกนินแตกออก (Sun and Cheng, 2002) โดยมีขั้นตอนในกระบวนการพรีทรีตเมนต์ด้วยด่างแสดงดังภาพที่ 14 โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าแต่ใช้เวลานานเป็นชั่วโมงถึงวัน

จากการศึกษาการใช้โซโครไลซ์ไม้ใบกว้างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ประสิทธิภาพการใช้โซโครไลซ์เพิ่มจาก 14 เปอร์เซ็นต์เป็น 55 เปอร์เซ็นต์ และช่วยลดลิกนิน จาก 24–55 เปอร์เซ็นต์ เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ไม่มีผลต่อลิกนินในไม้ใบแคบ ซึ่งให้ประสิทธิภาพไม่มากนัก 26 เปอร์เซ็นต์ (Millet *et al.*, 1976) การพรีทรีตเมนต์โดยใช้ ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิสฟางข้าว ซึ่งมีปริมาณลิกนินที่ต่ำ (10 - 18 เปอร์เซ็นต์) (Bjerre *et al.*, 1996)

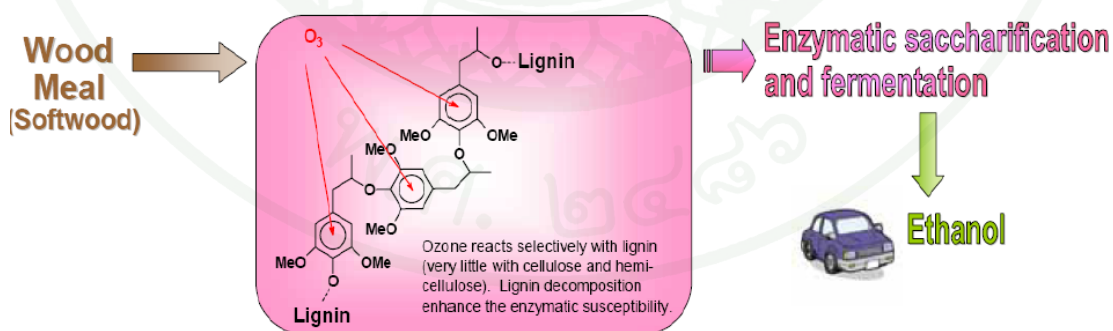


ภาพที่ 14 แผนผังกระบวนการพรีทรีตเมนต์โดยต่าง

ที่มา: de Vrije *et al.* (2002)

### 3.3 การพรีทรีตเมนต์โดยโอโซน (Ozonolysis)

การใช้โอโซนในการพรีทรีตเมนต์เพื่อกำจัดลิกนิน โดยการตัดและทำลายโครงสร้างที่เป็นวงแหวนของลิกนิน ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การพรีทรีตเมนต์ชีวมวลโดยใช้โอโซน สำหรับการผลิตเอทานอล

ที่มา: Pauley (2007)

สามารถใช้โอโซนไฮโดรไลซ์ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในชีวมวลหลายชนิดมีข้อดีคือ (1) ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน (2) ไม่มีผลผลิตที่เป็นพิษเกิดขึ้นตกค้างหลังการฟัรติรติเมนต์ที่จะยับยั้งกระบวนการไฮโดรไลซิสต่อไป สามารถแยกโอโซนออกมาได้ง่ายเป็นออกซิเจนโดยใช้อุณหภูมิสูง และ (3) ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศปกติ แต่มีข้อเสียคือต้องการโอโซนปริมาณมากพอ ที่มีราคาแพง (Sun and Cheng, 2002)

#### 4. การฟัรติรติเมนต์โดยกระบวนการทางชีวภาพ

การฟัรติรติเมนต์ทางชีวภาพ จะใช้เชื้อรา เช่น brown-rot, white-rot และ soft-rot เป็นต้น ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ โดยรากลุ่ม White-rot เป็นกลุ่มราในคลาส Basidiomycetes ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ส่วนการไฮโดรไลซิสลิกนิน ของรากลุ่ม White-rot ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, และ *Trametes versicolor* เกิดด้วยปฏิกริยาออกซิเดชัน ราประกอบด้วยเอนไซม์ลิกนิน เพอร์ออกซิเดส (LiP) แมงกานีส เพอร์ออกซิเดส (MnP) และ แล็กเคส (laccases) (Silverstein, 2004)

ข้อดีของการฟัรติรติเมนต์โดยใช้เชื้อราคือ ไม่ต้องใช้สารเคมีที่มีความรุนแรง และอุณหภูมิที่ใช้ไม่สูง ใช้พลังงานต่ำ เป็นสภาวะที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมที่ใช้สารเคมี และอุณหภูมิสูง ส่วนข้อเสียคือ เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง จึงทำให้ใช้เวลาในการไฮโดรไลซิสลิกนินนานขึ้น เพราะเกิดอัตราการไฮโดรไลซิสชีวมวลต่ำ (Silverstein, 2004)

## กระบวนการไฮโดรลิซิส

### 1. การไฮโดรลิซิสด้วยกรด (acid hydrolysis)

การไฮโดรลิซิสด้วยกรดมี 2 แบบคือ การใช้กรดเจือจาง และกรดเข้มข้น กระบวนการใช้กรดเจือจางจะกระทำภายใต้อุณหภูมิและความดันที่สูง และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาดังแต่วินาทีจนถึงนาที และสามารถใช้กระบวนการแบบต่อเนื่องได้ ส่วนกระบวนการใช้กรดเข้มข้น จะใช้อุณหภูมิต่ำ และความดันต่ำกว่า เนื่องจากกระทำโดยการสูบลำดับจากถังหนึ่งไปยังอีกถังหนึ่ง ทำให้ใช้เวลานานกว่าวิธีการใช้กรดเจือจาง

การไฮโดรลิซิสโดยกรดเจือจาง เป็นเทคโนโลยีเก่าในการเปลี่ยนเซลลูโลสในชีวมวลไปเป็นเอทานอล กระบวนการใช้กรดเจือจางจะใช้กับสารละลายกรดซัลฟริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 215 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสของวิธีนี้อยู่ที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการใช้กรดเจือจางจะขึ้นกับสองขั้นตอนเซลลูโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล และปฏิกิริยาต่อเนื่อง โดยน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารเคมีตัวอื่น เมื่อโมเลกุลของเซลลูโลสแตกออก จะทำให้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากน้ำตาลไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น สารเฟอร์ฟูรอล ฉะนั้นนอกจากจะลดผลได้ของน้ำตาลแล้ว เฟอร์ฟูรอลและผลพลอยได้ที่เกิดขึ้น จะเป็นตัวยับยั้งในกระบวนการหมักต่อไปได้ เนื่องจากน้ำตาลของเฮมิเซลลูโลสที่มี 5 คาร์บอน จะถูกไฮโดรไลซ์ได้รวดเร็วกว่าน้ำตาลของเซลลูโลสที่มี 6 คาร์บอน การแก้ไขการลดการไฮโดรลิสน้ำตาลลง คือใช้กระบวนการสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกกระทำภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง เพื่อให้ให้น้ำตาล 5 คาร์บอนยังคงอยู่ไม่ถูกความร้อนเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น และขั้นตอนที่สองจะกระทำภายใต้สภาวะที่รุนแรงกว่า สารละลายทั้งสองที่ผ่านการไฮโดรลิซิสซึ่งมีน้ำตาลอยู่ จะถูกนำไปหมักเพื่อผลิตเป็นเอทานอลต่อไป ดังจะใช้ปรับกรดที่ตกค้างก่อนที่ จะเข้าสู่ขั้นตอนการหมัก เนื่องจากการไฮโดรลิสน้ำตาลเกิดขึ้นได้ ดังนั้นผลได้ทางทฤษฎีจะอยู่ที่ 80 แกลอนของเอทานอลต่อไม้แห้งหนึ่งตัน โดยเศษเหลือของเซลลูโลสและลิกนินจะถูกใช้เพื่อเชื้อเพลิงสำหรับการผลิตไอน้ำเพื่อใช้ในโรงงาน

การไฮโดรลิซิสโดยกรดเข้มข้น นิยมใช้กรดซัลฟริกเข้มข้น กระบวนการนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล และเฮมิเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาล 5 คาร์บอน อย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว และน้ำตาลจะถูกไฮโดรไลซ์เพียงเล็กน้อย ปัจจัยที่การใช้กระบวนการนี้สามารถอยู่รอดได้ในเชิงเศรษฐกิจ คือ ผลได้ของน้ำตาลที่เหมาะสม และการลดต้นทุนของกรดโดยการนำกรดกลับมา

ใช้ใหม่ได้ ซึ่งกระบวนการใช้กรดเข้มข้นจะใช้สารละลายกรดซัลฟริกเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 2 ถึง 6 ชั่วโมง ในถึงปฏิกิริยาที่ไฮโดรไลซ์เฮมิเซลลูโลส ซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันที่ต่ำ จะทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสน้ำตาลต่อไปน้อยลง โดยการไฮโดรลิซิสในถึงปฏิกิริยา วัตถุประสงค์จะจมอยู่ในน้ำ และระบายออกมาเพื่อเก็บเกี่ยวน้ำตาลที่มี 5 คาร์บอนที่ได้ ขั้นตอนถัดมาเป็นการไฮโดรลิซิสเซลลูโลส โดยของแข็งที่เหลือจากขั้นตอนแรกจะถูกกำจัดน้ำออก และทำให้เปียกในกรดซัลฟริกเข้มข้น 30-40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นขั้นตอนก่อนการไฮโดรลิซิสเซลลูโลส สารละลายที่ได้จะถูกแยกน้ำออกและทำให้แห้ง จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของกรดขึ้นอีกเป็นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเกิดปฏิกิริยาในถึงต่ำไปเป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่ำ จากนั้นแยกน้ำตาลที่ได้ออกจากสารละลายกรด โดยสารละลายกรดที่ได้จากขั้นตอนที่สองนี้ จะถูกนำกลับขึ้นไปใช้ใหม่ในขั้นตอนแรกอีก

ข้อดีของกระบวนการใช้กรดเข้มข้น คือมีประสิทธิภาพของผลได้น้ำตาลสูง ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยการแยกกรดและน้ำตาลออกจากกันจะใช้วิธีการแลกเปลี่ยนประจุ และกรดจะถูกนำกลับมาใช้ใหม่โดยการระเหยที่อุณหภูมิและความดันที่ต่ำ จึงช่วยลดต้นทุนทางด้านวัสดุที่เกี่ยวข้อง เช่น ถังไฟเบอร์กลาส และท่อต่าง ๆ (Anonymous, n.d)

## 2. การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

เอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์เซลลูโลส เป็นเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส (Béguin and Aubert, 1994) การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ เป็นการเพิ่มน้ำตาลรีดิซ และกลูโคส เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ไม่รุนแรง อาทิ pH 4.8 และอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส และไม่มีปัญหาในด้านการกัดกร่อนเหมือนกรด จึงทำให้ต้นทุนของการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ต่ำกว่าการไฮโดรลิซิสด้วยกรด (Duff and Murray, 1996)

เอนไซม์เซลลูเลส เป็นการรวมกันของเอนไซม์หลายตัวที่ทำให้มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์เซลลูโลส โครงสร้างแบบผลึกไปเป็นองค์ประกอบโมเลกุลเดี่ยว ในที่นี้คือ กลูโคส ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสถูกผลิตได้ทั้งใน แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยมีทั้งแบบเอนไซม์ที่ไม่รวมตัว และรวมตัวกันเป็นกลุ่ม (Gilbert and Hazelwood, 1993)

## 2.1 เอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรีย

เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Clostridium thermocellum* จะสร้างเอนไซม์เป็นกลุ่ม โดยโครงสร้างประกอบด้วยเอนไซม์หลากหลายชนิด เรียกว่า เซลลูโลโซมบนพื้นที่ผิวของเซลล์ โดยเซลลูโลโซมจะเกาะกับเซลลูโลส เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเข้าไปใกล้พื้นที่ผิวของเซลลูโลสมากที่สุด (Lamed and Bayer, 1988; Bisaria and Mishra, 1989; Gilbert and Hazelwood, 1993) การที่แบคทีเรียสัมผัสเซลลูโลส ยิ่งสัมผัสใกล้ ยิ่งมีประสิทธิภาพในการไฮโดรลิซิสและปล่อยกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ส่วนใหญ่การไฮโดรลิซิสเซลลูโลสโดยแบคทีเรีย จะเกิดขึ้นบริเวณที่เป็นของเหลว (Murray *et al.*, 1986)

อีกกลุ่ม คือ เอนไซม์ที่ไม่ได้รวมตัวกัน ในระบบนี้ มีเอนไซม์ 3 ชนิดที่ไฮโดรไลซ์เซลลูโลส คือ (1) endocellulase (EG, endo-1,4-D-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.4), (2) exoglucanase หรือ cellobiohydrolase (CBH, 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, E.C.3.2.1.91) และ (3) β-glucosidase (E.C. 3-2.1.21) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้ จะทำงานร่วมกัน แต่ไม่ได้เกาะกลุ่มกันเป็นโครงสร้างซับซ้อน เหมือนกลุ่มแรก โดยจะพบในแบคทีเรียบางชนิด และเชื้อราทุกชนิด ที่สร้างเอนไซม์กลุ่มนี้

มีเอนไซม์เซลลูเลส ที่ผลิตจากแบคทีเรียอีกหลายชนิด ทั้งที่เป็น aerobic หรือ anaerobic, mesophilic หรือ thermophilic โดยแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, และ *Streptomyces* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Bisaria, 1991)

*Cellulomonas fimi* และ *Thermomonospora fusca* ได้ถูกศึกษาอย่างกว้างขวางสำหรับนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แม้ว่า จะมีแบคทีเรียที่สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้หลายชนิด แต่มีแบคทีเรียไฮโดรไลซ์เซลลูโลสชนิด anaerobe สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่จำเพาะสูง เช่น *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens* แต่เนื่องจากชนิด anaerobe มีอัตราการเจริญที่ช้ามาก และต้องการสภาวะที่ไม่มีอากาศในการเจริญ ทำให้การศึกษาเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชิงการค้า ส่วนใหญ่จะผลิตจากเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย (Duff and Murray, 1996)

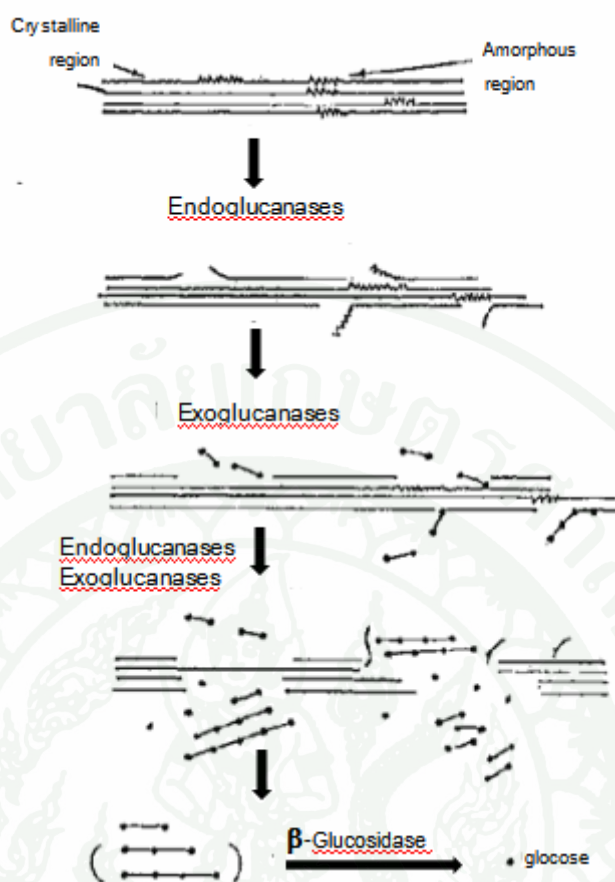
## 2.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา

เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อราชนิด anaerobe พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะที่สูง ซึ่งคล้ายกับแบคทีเรียชนิด anaerobe เนื่องจากข้อจำกัดด้านการเจริญทำให้ผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณที่น้อย (Wood *et al.*, 1988) เชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochete chrysosporium* (syn. Anamorph *Sporotrichum pulverulentum*) และ สายพันธุ์ของ *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* และ *Penicillium* เชื้อราเหล่านี้จะใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งแรก และเป็นที่สนใจในเชิงอุตสาหกรรม ที่สามารถเปลี่ยนวัตถุดิบเหลือทิ้งเซลลูโลสให้กลายเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพได้ ในจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส *Trichoderma reesei* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาศึกษาเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด

## 2.3 ชนิดและการทำงานของกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ที่ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันคือ 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolases (endoglucanases) (EC 3.2.1.21), 1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolases and 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolases (exoglucanases) (EC 3.2.1.91), และ  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolases ( $\beta$ -glucosidases) (EC 3.2.1. 21) (Silverstein, 2004) แสดงการทำงานดังภาพที่ 16 โดย

- 1) Endoglucanases จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะตัดด้านในของสายเซลลูโลสแบบสุ่ม (Random)
- 2) Exoglucanases จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสไปเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปเป็นกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะตัดด้านปลายของสายเซลลูโลส
- 3)  $\beta$ -glucosidases จะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสไปเป็นกลูโคส



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Anonymous (n.d)

การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนใหญ่เกิดช่วง pH ประมาณ 4.8 และอุณหภูมิอยู่ที่ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสนี้ สูงกว่าอุณหภูมิการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมาก ทำให้แหล่งคาร์บอนไม่ถูกแย่งโดยเชื้อปนเปื้อนตัวอื่นที่ไม่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ กระบวนการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสนี้ จะมีการปล่อยเซลโลไบโอสและกลูโคสออกจากสารตั้งต้นไป โดยเป็นทำงานร่วมกันของ endo- และ exocellulases และ  $\beta$ -glucosidase จะไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล (Goyal *et al.* 1991) อัตราการไฮโดรลิซิสช่วงแรกเกิดขึ้นเร็วมาก หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากผลของการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย ทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ การไฮโดรลิซิสแบบกะส่วนใหญ่ใช้เวลา 3-4 วัน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสมากที่สุด ยิ่งใช้เวลานานเท่าไร ยิ่งมีผลทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์

เทียบต่อเวลาลดลง และต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นเพื่อชดเชยให้มีผลได้ และความเข้มข้นน้ำตาล เพิ่มขึ้น (Duff and Murray, 1996)

การไฮโดรลิซิสแบบกะมีข้อจำกัดตรงการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย และเหมาะในการทำระดับห้องปฏิบัติการ ส่วนระบบการไฮโดรลิซิสแบบกึ่งกะ เหมาะในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก ปริมาณของลิกโนเซลลูโลสที่มาก สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่น้อยกว่า ในระบบนี้ น้ำตาลที่ได้จะถูกนำออกจากระบบโดยใช้เทคนิค ultrafiltration หรือ ทำการหมักแบบต่อเนื่อง (Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF) (Duff and Murray, 1996)

ระหว่างการใช้ไฮโดรลิซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปัญหาหลักของการเกิดการยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลส คือการสะสมของกลูโคสและเซลโลไบโอส ทำให้อัตราการไฮโดรลิซิสช้าลง (Adsul *et al.*, 2007)

เอนไซม์ไฮโดรไลซ์เซลลูโลส จะทำงานอย่างเป็นลำดับและทำงานร่วมกันกับเบต้า-กลูโคซิเดส ในการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส กิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase และ exoglucanase มักถูกยับยั้งโดยเซลโลไบโอส ดังนั้นเบต้า-กลูโคซิเดส จึงช่วยลดการยับยั้งของเซลโลไบโอส โดยไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส ทำให้การไฮโดรลิซิสเซลลูโลสมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากกลูโคสไปยับยั้งการทำงานของเบต้า-กลูโคซิเดส ทำให้เบต้า-กลูโคซิเดส เป็นปัจจัยการจำกัดอัตราการไฮโดรลิซิสเซลลูโลส (Saha and Bothast, 1996)

### การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิถูกพัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเป็นเทคนิค หรือกลไกทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ให้ง่าย หรือสะดวกขึ้นการปรับปรุงนี้มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน โดยศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง หรือออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีการทากูชิออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al.*, 1988) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลอง และระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนปัจจัยและระดับของปัจจัยนั้น โดย OA จะมีจำนวนน้อยที่สุดเท่ากับ  $L_4$  (Lochner and Matar, 1990) แสดงตัวอย่าง OA ( $L_4$ ) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 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 และหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ

ทดลอง

- 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

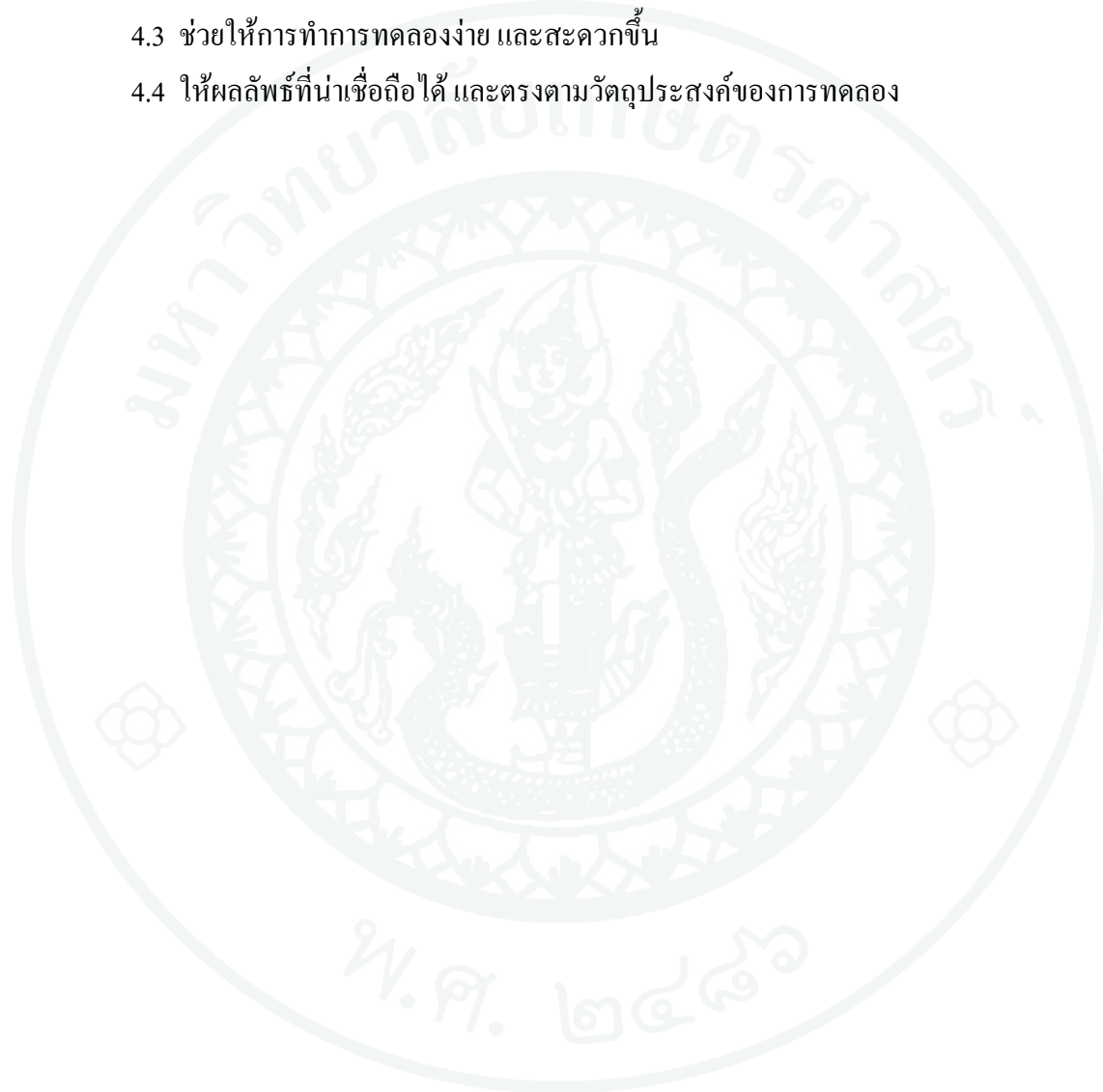
3.2 ยืนยันผลการทำนาย และออกแบบการทดลองต่อไป

การวัดค่าในวิธีการทางสถิติจะแสดงในรูปของอัตราส่วน Signal/Noise (อัตราส่วน S/N) ซึ่งถูกใช้เพื่อวัดอิทธิพลของ noise factor (ตัวแปรที่ไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการ) ที่มีต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการ โดยอาศัยการวัดลักษณะของคุณภาพ (quality characteristic, 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 วิธีการทางสถิติยังนำเอาการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) มาใช้เพื่อพิจารณาอิทธิพลของแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทดลองที่ได้

#### 4. ข้อดีของการออกแบบการทดลองโดยอาศัยวิธีการทางสถิติ

- 4.1 เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และใช้ได้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการสื่อสาร และโทรคมนาคม เป็นต้น
- 4.2 ช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง
- 4.3 ช่วยให้การทำการทดลองง่าย และสะดวกขึ้น
- 4.4 ให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือได้ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง



## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. วัตถุดิบ (ชีวมวล)

1.1 ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla*)

1.2 กระจันเทพา (*Acacia mangium* Willd.)

อายุ 4 ปี นำมาจากศูนย์วิจัยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อ.วังน้ำเขียว  
จ.นครราชสีมา

#### 2. เอนไซม์

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Celluclast 1.5 L (Novo Nordisk, Denmark) ที่ใช้ คือ 15 Filter Paper Units (FPU)/กรัมสับสเตรต และกิจกรรมเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส Novozym 188 (Novo Nordisk, Denmark) ที่ใช้ คือ 15 หน่วย/กรัมสับสเตรต

#### 3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องระเบิดไอน้ำของบริษัท Nitto Koatsu ประเทศญี่ปุ่น ชนิดทำงานเป็น batch ขนาดความจุ 2.5 ลิตร

3.2 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ยี่ห้อ SHIMADZU

3.3 คอลัมน์ (column) ยี่ห้อ Bio-Rad Aminex HPX-87P, 300 mm x 7.8 mm

3.3 เตาอบ (oven) ยี่ห้อ VISION

3.5 เตาเผา (high temperature oven) ยี่ห้อ NEYO 2-525 series II เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo Spectronic

3.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO

3.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave) รุ่น ES-315 ยี่ห้อ TOMY

3.8 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ยี่ห้อ New Brunswick Scientific Edison, N.J., U.S.A

3.9 เครื่องชั่ง (electronic beaker balance) รุ่น Adventurer ยี่ห้อ OHAUS

3.10 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert 29 L

3.11 ตู้ดูดควัน ยี่ห้อ Major

### 3.12 เครื่องเหวี่ยงแยก รุ่น DYNAC II Centrifuge ยี่ห้อ Clay Adams

#### 4. สารเคมี

##### 4.1 สารเคมีในขั้นตอนการสกัดด้วยด่าง คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

##### 4.2 สารเคมีวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีของไม้

###### 4.2.1 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

###### 4.2.2 เบนซีนบริสุทธิ์

###### 4.2.3 สารผสมเอทานอล-เบนซีน (เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กับ เบนซีน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร)

###### 4.2.4 กรดซัลฟูริก 72 เปอร์เซ็นต์

###### 4.2.5 กรดแอสติกเข้มข้น

###### 4.2.6 กรดแอสติก 10 เปอร์เซ็นต์

###### 4.2.7 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์

###### 4.2.8 โซเดียมคลอไรด์

###### 4.2.9 โซเดียมคลอไรด์

###### 4.2.10 แอซีโตน

###### 4.2.11 สารละลายไฮโดรคลอริก 3.85 นอร์มัล

###### 4.2.12 สารละลายออร์ซินอล

###### 4.2.13 โซโลส

##### 4.3 สารเคมีในขั้นตอนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

###### 4.3.1 โซเดียมอะซิเตรต

###### 4.3.2 กรดอะซิติก

###### 4.3.3 โซเดียมเอไซด์

##### 4.4 สารเคมีวิเคราะห์กลูโคสและเซลโลไบโอสโดยวิธี HPLC

###### 4.4.1 สารละลายมาตรฐานกลูโคส และเซลโลไบโอส โดยเตรียมความเข้มข้น 20, 10, 5, 1.25, 0.15625 และ 0.078125 กรัม/ลิตร

###### 4.4.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ได้แก่ น้ำปราศจากไอออน

## วิธีการ

### 1. เยื่อชีวมวล 2 ชนิด คือ ไม้ยูคาลิปตัส และไม้กระถินเทพา

นำชีวมวลคือ ไม้ยูคาลิปตัส (*E. camaldulensis* x *E. urophylla*) และ ไม้กระถินเทพา (*A. mangium* Willd.) ที่ได้มาจากศูนย์วนวัฒนวิจัยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา ชนิดละ 1 ต้น ทำการปลูกปลอกลูกและตัดให้เป็นชิ้นพอดีที่จะเข้าเครื่องทำชิ้นไม้สับ (chip)

### 2. การเตรียมชีวมวล

ลำต้น ไม้กระถินเทพาและยูคาลิปตัสที่มีอายุประมาณ 4 ปี และไม่ได้ใช้การเพาะด้วยเมล็ด แต่เป็นการตัดชำกิ่ง ซึ่งจะทำให้แต่ละต้นมีความเสถียรในแง่องค์ประกอบทางเคมี ส่วนขนาดของวัตถุดิบ ทางผู้วิจัยแปรรูปไม้ที่เป็นส่วนลำต้น ตั้งแต่โคนจนถึงยอด และตัดเป็นท่อน ๆ ลอกเปลือกออก จากนั้นตัดให้เป็นท่อนผอมลงมา และเข้าเครื่องสับให้ได้ชิ้นไม้สับ (chip) นำไปผึ่งแดด 3 วัน ให้แห้งเพื่อป้องกันเชื้อรา และนำมาแยกขนาดด้วยเครื่องร่อน โดยใช้ตะแกรงร่อนเบอร์ 6, 19 และ 25 โดยจะใช้ขนาดที่ 6 และ 19 นำมาคลุกรวมกัน ซึ่งมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.5x0.5 นิ้ว นำบรรจุลงถุง ถุงละ 200 กรัม น้ำหนักแห้ง มัดปากถุงให้สนิทไม่ให้อากาศเข้า เก็บรักษาไว้ที่แห้ง ก่อนเข้าเครื่องระเบิดไอน้ำ ก่อนนำมาใช้ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีก่อนฟรีทรีตเมนต์ชีวมวลต่อไป โดยมีสารแทรก เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI ดังนี้ TAPPI T204 om-88, TAPPI T203 om-88, TAPPI T223 cm-84, TAPPI T222 om-88 และ TAPPI T211 om-85 ตามลำดับ (ดังภาคผนวก ก)

### 3. การหาสถานะที่เหมาะสมในการฟรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดไอน้ำ ไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา

การระเบิดไอน้ำแต่ละครั้งจะใช้ชีวมวลอบแห้งครั้งละ 200 กรัม น้ำหนัก โดยแปรผันสถานะการระเบิดไอน้ำดังตารางที่ 8 และเมื่อระเบิดเสร็จแต่ละสถานะใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่น เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ ก่อนเก็บจะแบ่งมา 20 กรัม นำมาตากแห้ง บดและร่อนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น และอีก 1 กรัม มาหาปริมาณเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI การระเบิดแต่ละสถานะจะทำ

การทดลองสภาวะละ 3 ซ้ำ และแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งประมาณ 1 กรัม ไว้เพื่อหาความชื้นของเยื่อ หลังระเบิดไอน้ำ ก่อนที่จะนำไปการสกัดด้วยน้ำเพื่อหาสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสสูงสุด

**ตารางที่ 8** สภาวะที่ใช้ในการระเบิดไอน้ำของชีวมวล โดยแปรผันความดันและเวลา

| ชนิดชีวมวล | สภาวะการระเบิดไอน้ำ                  |                            |                |
|------------|--------------------------------------|----------------------------|----------------|
|            | ความดัน<br>(กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร) | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | เวลา<br>(นาที) |
| ยูคาลิปตัส | 16 และ 19                            | 200 และ 210                | 2, 4 และ 6     |
| กระถินเทพา | 16 และ 19                            | 200 และ 210                | 2, 4 และ 6     |

ในการสกัดด้วยน้ำ จะนำตัวอย่างเยื่อทั้งหมดหลังจากระเบิดไอน้ำ ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำ กลั่นสัดส่วนเยื่อต่อน้ำเท่ากับ 1:8 (กรัมเยื่อ/มิลลิลิตรน้ำ) ให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที คนโดยใช้แท่งแก้วเป็นครั้งคราว ปลดทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บส่วนที่เป็นเส้นใย ไว้ ล้างด้วยน้ำประปาจนกระทั่งน้ำที่ผ่านออกมาใสไม่มีสี ตั้งทิ้งไว้จนสะเด็ดน้ำ นำเยื่อไปชั่งน้ำหนัก ก่อนเก็บจะแบ่งมา 20 กรัม นำมาตากแห้ง บดและร่อนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น อีก 1 กรัม มาหาปริมาณเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI และแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่งประมาณ 1 กรัม ไว้เพื่อหาความชื้นของเยื่อ จากนั้นนำส่วนที่เหลือใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่น แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไป ใช้สกัด ด้วยสารละลายต่างต่อไป โดยค่าองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากแต่ละสภาวะ แต่ละชนิดของไม้ จะ มาเทียบดูปริมาณเปอร์เซ็นต์ของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่เหลืออยู่ เพื่อเลือกเยื่อที่ได้ จากสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการนำมาศึกษาการสกัดโดยใช้สารละลายต่างต่อไป

#### 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ

##### 4.1 การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ

ออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีทากูชิแบบ Three Level Orthogonal Array (L-9) ออกแบบเพื่อศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของตัวแปร 3 ปัจจัย ซึ่งแต่ละปัจจัยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ โดย

แบ่งออกเป็นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้สกัด ดังนั้นจึงได้การทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ประกอบด้วยจำนวนการทดลองที่ขึ้นอยู่กับระดับของแต่ละปัจจัยที่กำหนดดังแสดงในตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยในการหาสถานะการสกัดด้วยต่าง ของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ

| ปัจจัย                                        | ระดับ |    |    |
|-----------------------------------------------|-------|----|----|
|                                               | 1     | 2  | 3  |
| 1: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) | 15    | 20 | 25 |
| 2: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)                    | 70    | 80 | 90 |
| 3: เวลา (นาที)                                | 30    | 60 | 90 |

**ตารางที่ 10**  $L_9 (3^3)$  Orthogonal Array

| ชุดการทดลอง | ปัจจัย |   |   |
|-------------|--------|---|---|
|             | 1      | 2 | 3 |
| 1           | 1      | 1 | 1 |
| 2           | 1      | 2 | 2 |
| 3           | 1      | 3 | 3 |
| 4           | 2      | 1 | 2 |
| 5           | 2      | 2 | 3 |
| 6           | 2      | 3 | 1 |
| 7           | 3      | 1 | 3 |
| 8           | 3      | 2 | 1 |
| 9           | 3      | 3 | 2 |

ที่มา: Roy (2001)

ตารางที่ 11 ปัจจัยและระดับต่าง ๆ ในการทดลองการหาสภาวะการสกัดด้วยต่าง ของชีวมวลที่ผ่าน ขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ออกแบบโดยวิธีทางสถิติ

| ชุดการทดลอง | ปัจจัยการทดลอง                                |                            |                |
|-------------|-----------------------------------------------|----------------------------|----------------|
|             | ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์<br>(เปอร์เซ็นต์) | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | เวลา<br>(นาที) |
| 1           | 15                                            | 70                         | 30             |
| 2           | 15                                            | 80                         | 60             |
| 3           | 15                                            | 90                         | 90             |
| 4           | 20                                            | 70                         | 60             |
| 5           | 20                                            | 80                         | 90             |
| 6           | 20                                            | 90                         | 30             |
| 7           | 25                                            | 70                         | 90             |
| 8           | 25                                            | 80                         | 30             |
| 9           | 25                                            | 90                         | 60             |

#### 4.2 ขั้นตอนการสกัดด้วยต่าง

นำชีวมวลมาทำการระเบิดไอน้ำที่สภาวะที่เหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำใหม่ ให้เพียงพอต่อการ ศึกษาสภาวะการสกัดด้วยต่าง นำมาคลุกรวมกัน หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเพื่อชั่งเชื้อ หลังระเบิดตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ มา 50 กรัม น้ำหนักแห้ง ทำการแปรผันเปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักต่าง/ปริมาตรสารละลายต่าง) อุณหภูมิและเวลา ดังตารางที่ 11 ทำการทดลอง สภาวะละ 3 ชั่วโมง สัดส่วนเชื้อต่อน้ำต่างเท่ากับ 1:8 (กรัมเชื้อ/มิลลิลิตรน้ำต่าง)

ในการสกัดต่าง ใส่ในบีกเกอร์ คนโดยใช้แท่งแก้วเป็นครั้งคราว ปลอ่ยทิ้งไว้ให้เย็น กรอง ด้วยผ้าขาวบาง เก็บส่วนที่เป็นเส้นใยไว้ ล้างด้วยน้ำประปาจนน้ำที่ผ่านออกมาใสไม่มีสี และจนกว่า น้ำที่ผ่านออกมาจะมีค่า pH เป็นกลาง วัดโดยใช้กระดาษยูนิเวอร์แซลจุ่ม เทียบสี จากนั้นตั้งทิ้งไว้จน สะเด็ดน้ำ รวบรวมใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงด้วยยางรัดให้แน่น แช่ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะ นำไปใช้ โดยจะทำการตากแห้ง บดและร่อนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ TAPPI จากนั้นวิเคราะห์ผลการ ทดลองตามวิธีทางสถิติ เพื่อสรุปผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดด้วยต่างในชีวมวล

แต่ละชนิด เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะดังกล่าว ยืนยันผลการทดลอง และประมาณค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้ เพื่อศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าว

## 5. การไฮโดรลิซิสชีวมวลต่างลักษณะ ด้วยเอนไซม์

นำวัตถุดิบชีวมวลแต่ละชนิด ลักษณะ 3 แบบ (วัตถุดิบชีวมวลเริ่มต้น เยื่อชีวมวลที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และเยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และผ่านการสกัดด้วยสารละลายต่างที่สภาวะเหมาะสม) มาทำการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส Celluclast 1.5 L (NOVO Nordisk, Denmark) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส Novozyme 188 (Novo Nordisk, Denmark) โดยกำหนดกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 15 FPU/กรัมสับสเตรต และ 15 หน่วย/กรัมสับสเตรต ตามลำดับ การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์กระทำในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ของสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ควบคุมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ความเข้มข้นของชีวมวลเริ่มต้นและเยื่อที่ผ่านแต่ละขั้นตอนการฟริตเมนต์เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป แสดงวิธีวิเคราะห์ดังภาคผนวก ก

## 6. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ห้องปฏิบัติการของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวนผลิตภัณฑ์ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์

2553

## ผลและวิจารณ์

### 1. การเตรียมชีวมวล

ตารางที่ 12 สัดส่วนของจีนไม้สับยูคาลิปตัส และกระถินเทพา แต่ละขนาดตะแกรง

| ตะแกรง<br>(เบอร์) | ยูคาลิปตัส            |                          | กระถินเทพา            |                          |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                   | น้ำหนัก<br>(กิโลกรัม) | สัดส่วน<br>(เปอร์เซ็นต์) | น้ำหนัก<br>(กิโลกรัม) | สัดส่วน<br>(เปอร์เซ็นต์) |
| 25 (+25)          | 5.4                   | 19.49                    | 9.1                   | 40.27                    |
| 19 (+19, -25)     | 8.3                   | 29.96                    | 6.0                   | 26.55                    |
| 6 (+6, -19)       | 12.6                  | 45.49                    | 6.4                   | 28.32                    |
| 3 (+3, -6)        | 0.9                   | 3.25                     | 0.6                   | 2.65                     |
| On pan (-3)       | 0.5                   | 1.81                     | 0.5                   | 2.21                     |

หมายเหตุ (+) : จีนไม้สับที่อยู่บนตะแกรงเบอร์นั้น ๆ

(-) : จีนไม้สับที่ผ่านตะแกรงเบอร์นั้น ๆ

จากตารางที่ 12 นำจีนไม้สับบนตะแกรงเบอร์ 19 และ 6 (ประมาณ 0.5 x 0.5 นิ้ว) นำมาคลุก  
รวมกัน เนื่องจากเป็นขนาดที่มีความเหมาะสมและปริมาณมากที่สุด ซึ่งเป็นขนาดที่นิยมใช้ใน  
อุตสาหกรรมเกี่ยวกับเชื้อไม้ และมีขนาดที่พอเหมาะในการเข้าเครื่องระเบิดด้วยไอน้ำ คิดเป็น  
สัดส่วนของน้ำหนักระหว่างตะแกรงเบอร์ 19 และ 6 รวมกัน คือ ไม้ยูคาลิปตัส 75.45 และไม้ กระถิน  
เทพา 54.87 เปอร์เซ็นต์

## 2. การหาสถานะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดไอน้ำ (steam explosion) ของไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมี ไม้ยูคาลิปตัสและไม้กระถินเทพา ก่อนการพรีทรีตเมนต์

| องค์ประกอบทางเคมี<br>(เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) | ยูคาลิปตัส   | กระถินเทพา   |
|-----------------------------------------------|--------------|--------------|
| ความชื้น                                      | 10.55 ± 0.30 | 10.62 ± 0.29 |
| สารแทรก                                       | 5.91 ± 0.18  | 5.54 ± 0.01  |
| ลิกนิน                                        | 24.69 ± 0.47 | 26.44 ± 0.36 |
| เฮมิเซลลูโลส                                  | 19.55 ± 0.90 | 18.28 ± 0.59 |
| เซลลูโลส                                      | 43.75 ± 0.34 | 46.47 ± 0.41 |
| เถ้า                                          | 0.57 ± 0.00  | 0.76 ± 0.02  |

หมายเหตุ ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตามซ้ำการทดลอง

จากผลการทดลองหาองค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลทั้ง 2 ชนิดก่อนพรีทรีตโดยการระเบิดไอน้ำ ได้ผลดังตารางที่ 13

โดยสภาวะการระเบิดไอน้ำ จะแสดงอยู่ในรูปค่า severity factor (logRo) ซึ่งเป็นตัวแปรที่รวมตัวแปรอุณหภูมิและเวลาเป็นตัวแปรเดียวกัน (Heitz *et al.*, 1991) ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า severity factor ที่สัมพันธ์กับอุณหภูมิและเวลาของการระเบิดไอน้ำ

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | logRo |
|-------------------------|-------------|-------|
| 200                     | 2           | 3.24  |
|                         | 4           | 3.55  |
|                         | 6           | 3.72  |
| 210                     | 2           | 3.54  |
|                         | 4           | 3.84  |
|                         | 6           | 4.02  |

#### 2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์โดยการระเบิดไอน้ำไม่ยูคาลิปตัส

นำตัวอย่างไม้ซึ่งแบ่ง อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ทำการระเบิดไอน้ำแต่ละสภาวะสภาวะละ 3 ชั่วโมง แล้วรวบรวมตัวอย่างที่ผ่านการระเบิดลงอุณหภูมิ โดยไม่ผ่านการล้างเชื้อด้วยน้ำ มัดปากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแบ่งเชื้อบางส่วนไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยได้ผลองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 15

จากวัตถุประสงค์ในการพรีทรีตเมนต์โดยการระเบิดไอน้ำ เพื่อทำลายโครงสร้างและกำจัดเฮมิเซลลูโลส พบว่าจากตารางที่ 15 เมื่อสภาวะที่รุนแรงขึ้น จะทำให้สัดส่วนค่าของเฮมิเซลลูโลสมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด และสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีตัวอื่นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำแบ่งออกมา 100 กรัม น้ำหนักแห้ง มาทำการสกัดด้วยน้ำดังสภาวะที่ได้กำหนด แล้วนำตัวอย่างมากรอง เอาแต่เชื้อไว้ และแบ่งเชื้อบางส่วนไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีหลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำแล้ว จะได้ผลองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 16

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อคาลิปดัสหลังระเบิดไอน้ำ

| logRo | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง) |        |              |      |        |
|-------|---------------------------------------------|--------|--------------|------|--------|
|       | เซลลูโลส                                    | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า | อื่น ๆ |
| 3.24  | 42.17                                       | 26.47  | 20.19        | 0.46 | 10.71  |
| 3.54  | 44.36                                       | 28.25  | 14.33        | 0.45 | 12.61  |
| 3.55  | 42.31                                       | 27.59  | 20.91        | 0.40 | 8.79   |
| 3.72  | 44.87                                       | 27.94  | 17.28        | 0.57 | 9.34   |
| 3.84  | 44.86                                       | 29.91  | 15.27        | 0.43 | 9.53   |
| 4.02  | 41.53                                       | 30.91  | 11.69        | 0.56 | 15.31  |

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมี เยื่อคาลิปดัสหลังระเบิดไอน้ำ ตามด้วยการสกัดด้วยน้ำตามลำดับ

| logRo | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง) |                     |                    |                   |        |
|-------|---------------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|--------|
|       | เซลลูโลส                                    | ลิกนิน              | เฮมิเซลลูโลส       | เถ้า              | อื่น ๆ |
| 3.24  | 45.20 <sup>c</sup>                          | 27.93 <sup>c</sup>  | 17.31 <sup>a</sup> | 0.20 <sup>a</sup> | 9.36   |
| 3.54  | 53.08 <sup>a</sup>                          | 32.27 <sup>ab</sup> | 8.69 <sup>b</sup>  | 0.22 <sup>a</sup> | 5.74   |
| 3.55  | 48.83 <sup>b</sup>                          | 31.09 <sup>b</sup>  | 9.59 <sup>b</sup>  | 0.19 <sup>a</sup> | 10.30  |
| 3.72  | 49.07 <sup>b</sup>                          | 32.79 <sup>a</sup>  | 7.80 <sup>b</sup>  | 0.21 <sup>a</sup> | 10.13  |
| 3.84  | 53.94 <sup>a</sup>                          | 33.16 <sup>a</sup>  | 3.64 <sup>c</sup>  | 0.16 <sup>a</sup> | 9.10   |
| 4.02  | 53.34 <sup>a</sup>                          | 33.35 <sup>a</sup>  | 2.62 <sup>c</sup>  | 0.18 <sup>a</sup> | 10.51  |

หมายเหตุ – <sup>a,b,c</sup>: กลุ่มของตัวอย่างทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากตารางที่ 16 จะพบว่า เชื้อหลังการระเบิดไอน้ำสภาวะรุนแรงขึ้น เมื่อผ่านการสกัดด้วย น้ำ มีแนวโน้มสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสที่เหลือน้อยกว่า เมื่อเทียบกับก่อนสกัดด้วย น้ำ ทำให้สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่นเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเลือกสภาวะเหมาะสมของการ ระเบิดไอน้ำ จึงทำการเลือกสภาวะหลังจากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ เนื่องจากเชื้อที่ผ่านการระเบิดไ- น้ำเพียงขั้นตอนเดียว มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอ่อนหรือสารพิษที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของ จุลินทรีย์ เกิดขึ้นระหว่างการระเบิด (Cantarella *et al.*, 2004) เคลือบอยู่ สังเกตได้ว่า เมื่อผ่านการ สกัดด้วยน้ำ ค่าสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสลดลงมาก โดยค่าสูงสุดที่เหลือน้อย คือ 17.31 เปอร์เซ็นต์ และ ต่ำสุดคือ 2.62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสภาวะที่รุนแรงขึ้น

หลังจากคำนวณทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (ภาพผนวกที่ ค1-ค4) จากตารางที่ 16 พบว่า  $\log Ro$  3.84 ให้สัดส่วนเซลลูโลสสูงที่สุด คือ 53.94 เปอร์เซ็นต์ และคงเหลือสัดส่วนเฮมิเซล- ลูโลสน้อย คือ 3.64 เปอร์เซ็นต์ ในแง่สัดส่วนเฮมิเซลลูโลสคงเหลือ มี 2 สภาวะ ที่สัดส่วนเฮมิเซลลู- โลสต่ำสุด ซึ่งจากผลทางสถิติ รวมทั้งปัจจัยทางด้านพลังงาน โดย  $\log Ro$  4.02 ใช้เวลาในการระเบิด นานกว่า จึงสิ้นเปลืองพลังงานในการระเบิด เมื่อเทียบกับสภาวะ  $\log Ro$  3.84 ที่สัดส่วนเฮมิเซลลู- โลสลดลงไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกที่สภาวะ  $\log Ro$  3.84 คือที่อุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส ในไม้มูลาปีตัส

จากผลการทดลองที่ได้จากตารางที่ 17 องค์ประกอบทางเคมีของไม้มูลาปีตัส เมื่อผ่านทุก ขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ โดยสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสลดลง จาก 19.55 เหลือ 3.64 เปอร์เซ็นต์ ทำ ให้เซลลูโลสและลิกนินมีสัดส่วนที่สูงขึ้น เนื่องจากปริมาณเซลลูโลสและลิกนินส่วนใหญ่คงอยู่หลัง ขั้นตอนการระเบิดไอน้ำ ในแต่ละขั้นตอนจะเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจาก เชื้อเพิ่มขึ้น คือ หลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำ ประสิทธิภาพเพิ่มเป็น 21.89 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการ สกัดด้วยน้ำ จะพบว่าประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยเมื่อเทียบกับไม้มูลาปีตัสสายพันธุ์อื่น ศึกษาโดย Robert *et al.* (1987) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดไอน้ำไม้มูลาปีตัส (*Eucalyptus regna*) พบว่าที่ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ละลายออก มาถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ เท่ากับ 81.38 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ไม้มูลา- ปีตัสต่างสายพันธุ์ เนื่องจากการสกัดด้วยน้ำ น้ำร้อนจะช่วยชะล้างและสกัดส่วนของน้ำตาล และ สารที่เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ ในขั้นตอนการระเบิดไอน้ำบางส่วน ที่เคลือบอยู่ที่ผิวเชื้อออกไป

ตารางที่ 17 สรุปสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพการลดลงของเฮมิเซลลูโลส ในแต่ละขั้นตอนของการพรีทรีตเมนต์ ที่สภาวะการระเบิดไอน้ำ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที และการสกัดด้วยน้ำ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เชื้อยูคาลิปตัส

| ขั้นตอน<br>การพรีทรีตเมนต์ | ประสิทธิภาพการลดลง<br>ของเฮมิเซลลูโลส<br>(เปอร์เซ็นต์) | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) |        |              |      |
|----------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------------|------|
|                            |                                                        | เซลลูโลส                                   | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| วัตถุดิบเริ่มต้น           | 0.00                                                   | 43.75                                      | 24.69  | 19.55        | 0.57 |
| การระเบิดไอน้ำ             | 21.89                                                  | 44.86                                      | 29.91  | 15.27        | 0.43 |
| การสกัดด้วยน้ำ             | 81.38                                                  | 53.94                                      | 33.16  | 3.64         | 0.16 |

## 2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดไอน้ำไม้กระถินเทพา

นำตัวอย่างไม้ซังแบ่ง ทุกละ 200 กรัม น้ำหนักแห้ง ทำการระเบิดไอน้ำแต่ละสภาวะ สภาวะละ 3 ชั่วโมง แล้วรวบรวมตัวอย่างที่ผ่านการระเบิดลงถุง โดยไม่ผ่านการล้างเช็ดด้วยน้ำ มัดปาก เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแบ่งเชื้อบางส่วนไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยได้ผลองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 18

จากวัตถุประสงค์การพรีทรีตเมนต์โดยการระเบิดไอน้ำ เพื่อทำลายโครงสร้างและกำจัด เฮมิ-เซลลูโลส พบว่า จากตารางที่ 18 เมื่อสภาวะรุนแรงขึ้น จะทำให้สัดส่วนค่าของเฮมิเซลลูโลสมี แนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด และสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีตัวอื่นค่าแนวโน้มเพิ่มขึ้น เล็กน้อย

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำแบ่งออกมา 100 กรัม น้ำหนักแห้ง มาทำการสกัดด้วยน้ำดัง สภาวะที่ได้กำหนด แล้วนำตัวอย่างมากรอง เอาแต่เชื้อไว้ และแบ่งนำเชื้อบางส่วนไปวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีหลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำแล้ว จะได้ผล องค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 19

ตารางที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อกระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ

| logRo | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง) |        |              |      |        |
|-------|---------------------------------------------|--------|--------------|------|--------|
|       | เซลลูโลส                                    | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า | อื่น ๆ |
| 3.24  | 45.14                                       | 28.44  | 19.32        | 0.76 | 6.34   |
| 3.54  | 44.44                                       | 29.33  | 17.92        | 0.68 | 7.63   |
| 3.55  | 45.15                                       | 29.72  | 16.37        | 0.64 | 8.12   |
| 3.72  | 45.35                                       | 31.03  | 15.49        | 0.71 | 7.42   |
| 3.84  | 43.71                                       | 31.49  | 16.09        | 0.79 | 7.92   |
| 4.02  | 43.20                                       | 32.34  | 13.07        | 0.72 | 10.67  |

ตารางที่ 19 องค์ประกอบทางเคมี เชื้อกระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำตามลำดับ

| logRo | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง) |                     |                    |                   |        |
|-------|---------------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|--------|
|       | เซลลูโลส                                    | ลิกนิน              | เฮมิเซลลูโลส       | เถ้า              | อื่น ๆ |
| 3.24  | 49.27 <sup>c</sup>                          | 31.02 <sup>c</sup>  | 14.26 <sup>a</sup> | 0.53 <sup>a</sup> | 4.92   |
| 3.54  | 51.05 <sup>a</sup>                          | 33.80 <sup>ab</sup> | 8.00 <sup>bc</sup> | 0.40 <sup>a</sup> | 6.75   |
| 3.55  | 51.21 <sup>a</sup>                          | 32.71 <sup>bc</sup> | 11.84 <sup>a</sup> | 0.44 <sup>a</sup> | 3.80   |
| 3.72  | 50.37 <sup>ab</sup>                         | 34.00 <sup>ab</sup> | 9.19 <sup>b</sup>  | 0.43 <sup>a</sup> | 6.01   |
| 3.84  | 50.75 <sup>a</sup>                          | 34.02 <sup>ab</sup> | 8.36 <sup>bc</sup> | 0.57 <sup>a</sup> | 6.30   |
| 4.02  | 49.49 <sup>bc</sup>                         | 35.34 <sup>a</sup>  | 6.01 <sup>c</sup>  | 0.57 <sup>a</sup> | 8.59   |

หมายเหตุ – <sup>a,b,c</sup> : กลุ่มของตัวอย่างทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากตารางที่ 19 พบว่า เชื้อหลังการระเบิดไอน้ำสภาวะรุนแรงขึ้น เมื่อผ่านการสกัดด้วยน้ำ มีแนวโน้มสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสที่เหลือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับก่อนสกัดด้วยน้ำ ทำให้สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่นเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเลือกสภาวะเหมาะสมของการระเบิดไอน้ำ จึงทำการเลือกสภาวะหลังจากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ เนื่องจากเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำเพียงขั้นตอนเดียว อาจยังมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอ่อนหรือสารพิษที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของจุลินทรีย์ เกิดขึ้นระหว่างการระเบิด (Cantarella *et al.*, 2004) เคลือบอยู่ สังเกตได้ว่า เมื่อผ่านการสกัดด้วยน้ำ ค่าสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสลดลงมากขึ้น โดยค่าสูงสุดที่เหลือน้อย คือ 14.26 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุดคือ 6.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสภาวะที่รุนแรงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Heitz *et al.* (1991) เมื่อสภาวะที่รุนแรงขึ้น ทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์เปลี่ยนเป็นน้ำตาล โดยน้ำตาลเพนโตส เปลี่ยนต่อเป็นเฟอร์ฟูรอล และกรดอะซิดิก ส่วนน้ำตาลเฮกโซสเปลี่ยนต่อไปเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรอล (5-HMF) และพบว่าอุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณของสารเหล่านี้เพิ่มขึ้น (Cristóbal *et al.*, 2006)

หลังจากคำนวณทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม (ภาพผนวกที่ ค5-ค8) จากตารางที่ 19 พบว่าในเชิงสถิติ เลือกที่สภาวะ  $\log Ro$  3.54 ให้สัดส่วนเซลลูโลสคงเหลือมาก คือ 51.05 เปอร์เซ็นต์ และคงเหลือสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสน้อย คือเหลือ 8.00 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก ที่สภาวะ  $\log Ro$  4.02 ให้ค่าสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสคงเหลือน้อยที่สุด แต่เมื่อเทียบกับสภาวะ  $\log Ro$  3.54 และ 3.84 ซึ่งในทางสถิติ ถือว่าค่าสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสไม่แตกต่างกัน ( $p \geq 0.05$ ) ดังนั้นจึงตัดสภาวะ  $\log Ro$  4.02 ออกเนื่องจากปัจจัยทางด้านพลังงาน จึงเหลือสภาวะ  $\log Ro$  3.54 และ 3.84 ในการเลือกสภาวะเหมาะสม จึงเลือกที่สภาวะ  $\log Ro$  3.54 คืออุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการกำจัดเฮมิเซลลูโลส ในไม้กระถินเทพา เนื่องจากใช้พลังงานที่ต่ำกว่า (เวลาในการระเบิดสั้นกว่า) และทำให้สัดส่วนเฮมิเซลลูโลสคงเหลือน้อยกว่าที่สภาวะ  $\log Ro$  3.84 คืออุณหภูมิ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที

จากตารางที่ 20 องค์ประกอบทางเคมีของเชื้อกระถินเทพา เมื่อผ่านทุกขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ โดยสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลสลดลงอย่างชัดเจนจาก 18.28 เหลือ 8.00 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลลูโลสและลิกนินมีสัดส่วนเพิ่มขึ้น ตามหลักปริมาณเซลลูโลสและลิกนินส่วนใหญ่ไม่ลดลงหลังขั้นตอนการระเบิดไอน้ำ และในแต่ละขั้นตอนจะเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกจากเชื้อได้เพิ่มขึ้น คือ หลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำประสิทธิภาพเพิ่มเป็น 1.97 เปอร์เซ็นต์ พอนำมาสกัดด้วยน้ำ จะพบว่าประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Heitz *et al.* (1991) ไม้ *Populus* ซึ่งเป็นไม้ใบกว้างเช่นเดียวกับไม้กระถินเทพา ทำการแปรผันสภาวะการระเบิดไอน้ำ  $\log Ro$  2.66- 4.13

(อุณหภูมิ 180-230 องศาเซลเซียส และเวลา 0.7-0.4 นาที) พบว่าหลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำและสกัดด้วยน้ำ สามารถกำจัดเอมิเซลลูโลสออกจากเชื้อได้มากที่สุด 65 เปอร์เซ็นต์ ที่  $\log R_o$  3.83 ซึ่งการศึกษาไม้กระถินเทพาได้สภาวะเหมาะสมคือ  $\log R_o$  3.54 และได้ประสิทธิภาพการกำจัดเอมิเซลลูโลสเท่ากับ 56.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียง เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Heitz *et al.* เนื่องจากน้ำร้อนจะชะล้างและสกัดส่วนของเอมิเซลลูโลสบางส่วนที่ถูกไฮโดรไลซ์ไม่สมบูรณ์ หรือเคลือบอยู่ที่ผิวเชื้อ ที่ได้ภายหลังการระเบิดไอน้ำ ออกไป

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดไอน้ำ ทั้งยูคาลิปตัสและกระถินเทพา พบว่าในส่วนองค์ประกอบทางเคมีที่แท้จริง เมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น ตามหลัก ปริมาณเซลลูโลสและลิกนินมีค่าลดลงเล็กน้อย เนื่องจากการระเบิดไอน้ำไม่มีผลต่อการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสและลิกนิน อีกด้านยังมีเซลลูโลสส่วนที่เป็นโครงสร้างแบบหลวมและลิกนินบางส่วนที่ไม่เสถียร สามารถสลายได้ แต่การระเบิดไอน้ำมีผลต่อโครงสร้างของเอมิเซลลูโลสโดยตรง เกิดการสลายเอมิเซลลูโลสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ อยู่รอบ ๆ เซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวละลายออกมา ขึ้นกับความรุนแรงของสภาวะการระเบิดไอน้ำ (Tina, 1998) เอมิเซลลูโลส ที่เป็นตัวหลักในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการระเบิดไอน้ำ จะพบว่าเมื่อผ่านการฟัรทริตเมนต์ในแต่ละขั้นตอน ที่สภาวะเหมาะสมของชีวมวลทั้ง 2 ชนิด มีค่าเอมิเซลลูโลสลดลงอย่างชัดเจน ส่วนเอมามีค่าต่ำมาก ทำให้ไม่มีผลต่อการเลือกสภาวะ

เมื่อเทียบสภาวะการระเบิดไอน้ำของไม้ทั้ง 2 ชนิด ได้อุณหภูมิเหมาะสมเท่ากันคือ 210 องศาเซลเซียส เวลาเหมาะสมของไม้ยูคาลิปตัส สูงกว่าไม้กระถินเทพา 2 นาที (ยูคาลิปตัสที่ 210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที ส่วนกระถินเทพา 210 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที) ทำให้ผลของสัดส่วนเอมิเซลลูโลสสุดท้ายของยูคาลิปตัสเหลือน้อยกว่ากระถินเทพา แต่ถ้าดูที่เวลาที่สูงขึ้น คือที่ 4 และ 6 นาทีของกระถินเทพา จะพบว่าที่เวลา 2 นาที ให้ผลสัดส่วนเอมิเซลลูโลสคงเหลือไม่แตกต่างกันในเชิงสถิติ คือไม่แตกต่างกันระหว่าง 2, 4 และ 6 นาที ดังนั้นถึงแม้ที่สภาวะเดียวกัน คือที่เหมาะสมของยูคาลิปตัส (210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที) กระถินเทพาก็ยังให้ค่าสัดส่วนเอมิเซลลูโลสคงเหลือที่มากกว่า เนื่องจากโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา มีการจัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นกว่าไม้ยูคาลิปตัส โดยเฉพาะโครงสร้างลิกนิน ความซับซ้อนและแข็งแรงของลิกนินไปขัดขวางการเข้าแทรกตัวของไอน้ำในขั้นตอนการระเบิดไอน้ำ ทำให้เกิดการไฮโดรลิซิสเอมิเซลลูโลสในไม้กระถินเทพาน้อยกว่าไม้ยูคาลิปตัส

**ตารางที่ 20** สรุปสัดส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพการลดลงของเฮมิเซลลูโลสในแต่ละขั้นตอนของการพรีทรีตเมนต์ ที่สภาวะการระเบิดไอน้ำที่เหมาะสม คือ 210 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที และการสกัดด้วยน้ำ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ไม่กระถินเทพา

| ขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ | ประสิทธิภาพการลดลงของเฮมิเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) |        |              |      |        |
|------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------------|------|--------|
|                        |                                                 | เซลลูโลส                                   | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า | อื่น ๆ |
| วัตถุดิบเริ่มต้น       | 0.00                                            | 46.47                                      | 26.44  | 18.28        | 0.76 | 8.05   |
| การระเบิดไอน้ำ         | 1.97                                            | 44.44                                      | 29.33  | 17.92        | 0.68 | 7.63   |
| การสกัดด้วยน้ำ         | 56.24                                           | 51.05                                      | 33.80  | 8.00         | 0.40 | 6.75   |

จากการศึกษาไม้ชนิดอื่น โดยวิทยา และคณะ (2549) ศึกษาสภาวะการระเบิดไอน้ำของชานอ้อยซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้ ลิกนิน 19.9 เปอร์เซ็นต์, เฮมิเซลลูโลส 25.08 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูโลส 45.57 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 218 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ให้ประสิทธิภาพการกำจัดเฮมิเซลลูโลสสูงถึง 87.44 เปอร์เซ็นต์ เหลือเฮมิเซลลูโลสเพียง 3.15 เปอร์เซ็นต์

เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยน้ำตาลหลายตัว ดังนั้นหลังจากเชื่อมผ่านการระเบิดไอน้ำแล้ว จะพบว่าเฮมิเซลลูโลสหายไปอยู่ในส่วนน้ำล้าง ซึ่งในน้ำล้างนี้ มีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากเฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะน้ำตาลไซโลสซึ่งมีอยู่ปริมาณมากที่สุด โดยน้ำตาลไซโลสนี้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารเพิ่มมูลค่าต่าง ๆ ได้มาก เช่น ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอล จุลทรีย์ที่ใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ *Pachysolen tannophilus* หรือ *Pichia stipitis* รวมทั้งสารละลายจากการไฮโดรลิซิสสลายเฮมิเซลลูโลสที่มีน้ำตาลไซโลสอยู่มากนี้ ยังไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล ซึ่งมีประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม โดยกระบวนการหมักด้วยยีสต์ เป็นต้น (สาโรจน์, 2543) การใช้ชีวมวลโดยเฉพาะวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเศษไม้ มาใช้ผลิตสารเพิ่มมูลค่าทั้งในด้านพลังงาน อาหารคนและสัตว์ ฯลฯ เป็นการแนวทางการช่วยลดโลกร้อนได้อีกทางหนึ่ง

### 3. การหาสถานะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธีทาคุชิ

3.1 การหาสถานะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อยูลิปิดส์ที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธีทาคุชิ

หลังจากเชื้อถูกนำมาสกัดด้วยด่าง ณ สถานะต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการทดลองทั้ง 9 ชุด การทดลอง ออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ เมื่อนำเชื้อยูลิปิดส์สกัดด้วยด่างวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้ผลดังตารางที่ 21

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยหลักการวิเคราะห์วิธีทาคุชิ ทั้ง 9 ชุดการทดลอง โดยอาศัยค่าสัดส่วนเซลล์โลส และสัดส่วนลิกนิน เป็นพารามิเตอร์หลัก เนื่องจากวัตถุประสงค์การสกัดด้วยด่างต้องการกำจัดลิกนินออกจากเชื้อ เพื่อให้มีสัดส่วนลิกนินต่ำสุด และเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสสูงสุด ส่วนค่าสัดส่วนเฮมิเซลล์โลสและเถ้า เป็นพารามิเตอร์รอง จึงไม่นำมาวิเคราะห์ร่วม การวิเคราะห์แบ่งออกเป็นหัวข้อหลักได้ ดังนี้ การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนเซลล์โลส และลิกนิน, การหาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง, การประมาณค่าสัดส่วนเซลล์โลส และลิกนินที่ได้จากการสกัดด้วยด่างที่สถานะที่เหมาะสม

ตารางที่ 21 ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้ยูคาลิปตัสที่สกัดด้วยค่า  $\eta$  สภาวะที่แตกต่างกัน

| ชุดการทดลอง | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) |          |        |              |      |
|-------------|---------------------------------|----------|--------|--------------|------|
|             | ไฮโดรเซลลูโลส                   | เซลลูโลส | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| 1           | 79.14                           | 72.33    | 18.74  | 2.29         | 1.11 |
| 2           | 77.72                           | 71.54    | 20.40  | 1.81         | 0.93 |
| 3           | 73.40                           | 70.39    | 22.24  | 1.50         | 1.52 |
| 4           | 80.17                           | 74.70    | 18.32  | 2.15         | 0.96 |
| 5           | 77.76                           | 72.01    | 20.47  | 1.32         | 0.86 |
| 6           | 75.34                           | 70.30    | 22.37  | 1.55         | 1.72 |
| 7           | 81.41                           | 76.84    | 16.79  | 2.11         | 1.24 |
| 8           | 78.50                           | 72.73    | 19.89  | 1.85         | 1.11 |
| 9           | 75.89                           | 71.84    | 21.30  | 1.38         | 1.64 |

หมายเหตุ ระดับของแต่ละปัจจัยของแต่ละชุดการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 11

### 3.1.1 การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนินของเยื่อยูคาลิปตัส

การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนินสามารถหาได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยจะแสดงถึงร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลอง (Percent contribution) ที่มีผลต่อการสกัดด้วยค่า  $\eta$  เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และลดสัดส่วนลิกนิน ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองใดมีผลต่อการสกัดด้วยค่า  $\eta$  และมีอิทธิพลมากหรือน้อย ดังตารางที่ 22 นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนยังสามารถบอกได้ถึงระดับความเชื่อมั่นของปัจจัยการทดลองที่มีต่อการสกัดด้วยค่า  $\eta$  ได้ผลการวิเคราะห์สรุปดังตารางที่ 23 และ 24

**ตารางที่ 22** อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และการลดสัดส่วน  
ลิกนิน เชื้อยูลิปดัสที่สกัดด้วยค่า

| สัดส่วนเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)     |         |         |         |                             |                                   |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------|-----------------------------------|
| ปัจจัย                            | ระดับ   |         |         | ค่าอิทธิพลหลัก <sup>1</sup> | ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก <sup>2</sup> |
|                                   | 1       | 2       | 3       |                             |                                   |
| ความเข้มข้น NaOH<br>(เปอร์เซ็นต์) | 37.075  | 37.182  | 37.355  | 0.281                       | 31.82                             |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)           | 37.454  | 37.156  | 37.002  | 0.451                       | 51.16                             |
| เวลา (นาทีก)                      | 37.118  | 37.227  | 37.268  | 0.150                       | 17.01                             |
| สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)       |         |         |         |                             |                                   |
| ปัจจัย                            | ระดับ   |         |         | ค่าอิทธิพลหลัก <sup>1</sup> | ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก <sup>2</sup> |
|                                   | 1       | 2       | 3       |                             |                                   |
| ความเข้มข้น NaOH<br>(เปอร์เซ็นต์) | -26.201 | -26.159 | -25.682 | 0.519                       | 20.50                             |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)           | -25.075 | -26.132 | -26.836 | 1.761                       | 69.61                             |
| เวลา (นาทีก)                      | -26.142 | -26.008 | -25.892 | 0.250                       | 9.90                              |

หมายเหตุ <sup>1</sup> : เท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

<sup>2</sup> : คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส เชื้อยาลิปดัส

| Factor      | DOF <sup>A</sup> | SS <sup>A</sup> | V <sup>A</sup> | F <sup>A</sup> | S'    | Percent contribution (%) | Confidence <sup>A</sup> (%) | Significant |
|-------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| N           | 2                | 0.118           | 0.059          | 7.186          | 0.102 | 21.05                    | 87.78                       | -           |
| T           | 2                | 0.316           | 0.158          | 19.113         | 0.299 | 61.62                    | 95.03                       | *           |
| t           | 2                | 0.034           | 0.017          | 2.094          | 0.018 | 3.72                     | 67.68                       | -           |
| Other Error | 2                | 0.016           | 0.008          |                |       | 13.61                    |                             |             |
| Total       | 8                | 0.486           |                |                |       | 100                      |                             |             |

หมายเหตุ N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) P<0.05 \*

T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

t: เวลา (นาที)

<sup>A</sup> การคำนวณได้จากภาคผนวก ข

ตารางที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการลดสัดส่วนลิกนิน เชื้อยาลิปดัส

| Factor      | DOF <sup>A</sup> | SS <sup>A</sup> | V <sup>A</sup> | F <sup>A</sup> | S'    | Percent contribution (%) | Confidence <sup>A</sup> (%) | Significant |
|-------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| N           | 2                | 0.498           | 0.249          | 8.186          | 0.437 | 8.15                     | 89.11                       | -           |
| T           | 2                | 4.715           | 2.357          | 77.465         | 4.655 | 86.69                    | 98.73                       | *           |
| t           | 2                | 0.094           | 0.047          | 1.548          | 0.033 | 0.62                     | 60.75                       | -           |
| Other Error | 2                | 0.06            | 0.03           |                |       | 4.54                     |                             |             |
| Total       | 8                | 5.369           |                |                |       | 100                      |                             |             |

หมายเหตุ N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) P<0.05 \*

T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

t: เวลา (นาที)

<sup>A</sup> การคำนวณได้จากภาคผนวก ข

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยในไม้อยู่คาลิปัส ตารางที่ 22 พบว่า ปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และลดสัดส่วนลิกนินสูงที่สุด คือ อุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Silverstein *et al.* (2007) ที่ได้ศึกษาหาสภาวะเหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมีของลำต้นนุ่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรลิซิส พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการพรีทรีตเมนต์โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในการกำจัดลิกนิน เมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์สูง และเวลานานขึ้น ส่วนเวลา มีอิทธิพลน้อยที่สุด โดยมีค่าอิทธิพลต่ำ เท่ากับ 17.01 และ 9.90 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และการลดสัดส่วนลิกนิน ตามลำดับ

เมื่อพิจารณา ร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) แต่ละปัจจัย จากผลการวิเคราะห์ ANOVA ในตาราง ที่ 23 และ 24 จะเห็นว่าพบว่า อุณหภูมิ มีค่าร้อยละอิทธิพลสูงสุด เท่ากับ 61.62 และ 86.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และการลดลงของสัดส่วนลิกนินมากที่สุด และเมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นจะเห็นว่า อุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ปัจจัยรองลงมา คือความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าร้อยละอิทธิพล เท่ากับ 21.05 และ 8.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเวลา เป็นปัจจัยที่มีค่าร้อยละอิทธิพลน้อยที่สุด เท่ากับ 3.72 และ 0.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าเวลา มีอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และการลดลงของสัดส่วนลิกนินน้อยที่สุด และทั้งปัจจัยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลา ไม่มีอิทธิพลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และการลดลงของสัดส่วนลิกนิน ในตารางที่ 22 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

### 3.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง เยื่อคาลิปัส

หลักในการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิแบ่งประเภทของการทดลองออกเป็น 3 ประเภท คือ The Smaller is better, The Nominal is better และ The Bigger is better ซึ่งการทดลองนี้จัดอยู่ในทั้งประเภท The Bigger is better (B) และ The Smaller is better (S) โดยต้องการสัดส่วนเซลล์โลสสูงสุดจึงใช้ประเภท The Bigger is better อีกด้าน ต้องการสัดส่วนลิกนินต่ำสุด จึงใช้ประเภท The Smaller is better การทดลองครั้งนี้สนใจที่ค่าสัดส่วนเซลล์โลสสูงสุด และสัดส่วนลิกนินต่ำสุด จึงต้องหาสภาวะที่ให้ค่าสัดส่วนดังกล่าว

ตารางที่ 25 สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูลอส และลิกนิน จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อเยื่อคาลิปต์ส

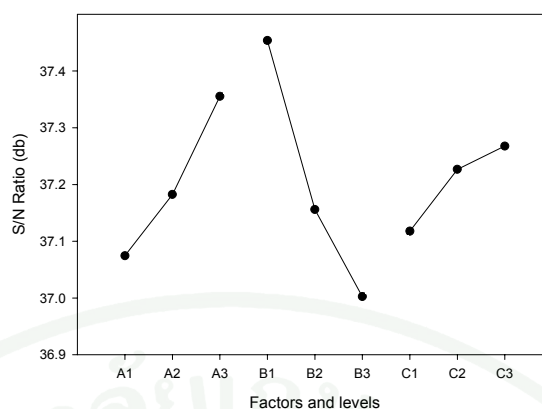
| ชุดการทดลอง | สัดส่วนเซลลูลอส (เปอร์เซ็นต์) |          |          |                  | สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) |          |          |                  |
|-------------|-------------------------------|----------|----------|------------------|-----------------------------|----------|----------|------------------|
|             | ครั้งที่                      | ครั้งที่ | ครั้งที่ | อัตราส่วน        | ครั้งที่                    | ครั้งที่ | ครั้งที่ | อัตราส่วน        |
|             | 1                             | 2        | 3        | S/N<br>(เดซิเบล) | 1                           | 2        | 3        | S/N<br>(เดซิเบล) |
| 1           | 71.86                         | 71.89    | 73.23    | 37.185           | 18.36                       | 18.35    | 19.51    | -25.459          |
| 2           | 72.16                         | 71.17    | 71.29    | 37.090           | 20.55                       | 19.39    | 21.25    | -26.197          |
| 3           | 70.68                         | 69.33    | 71.15    | 36.948           | 22.10                       | 21.64    | 22.99    | -26.947          |
| 4           | 74.84                         | 74.49    | 74.76    | 37.466           | 18.24                       | 18.81    | 17.91    | -25.260          |
| 5           | 72.02                         | 70.63    | 73.39    | 37.145           | 20.11                       | 20.04    | 21.25    | -26.224          |
| 6           | 69.28                         | 69.69    | 71.94    | 36.936           | 22.34                       | 22.71    | 22.06    | -26.994          |
| 7           | 76.92                         | 77.84    | 75.76    | 37.710           | 17.32                       | 16.68    | 16.38    | -24.505          |
| 8           | 73.74                         | 71.82    | 72.62    | 37.232           | 19.33                       | 20.61    | 19.72    | -25.974          |
| 9           | 69.97                         | 72.98    | 72.58    | 37.123           | 21.44                       | 21.15    | 21.31    | -26.568          |

นำค่าสัดส่วนเซลลูลอส และสัดส่วนลิกนิน ของทั้ง 9 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ หาค่าอัตราส่วน Signal-to-Noise (S/N-Ratio) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง สูตรการคำนวณหาค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข และสรุปผลได้ดังตารางที่ 25 โดยนำอัตราส่วน S/N มาคำนวณร้อยละอิทธิพลหลักของปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับการทดลอง ซึ่งสรุปผลดังตารางที่ 22

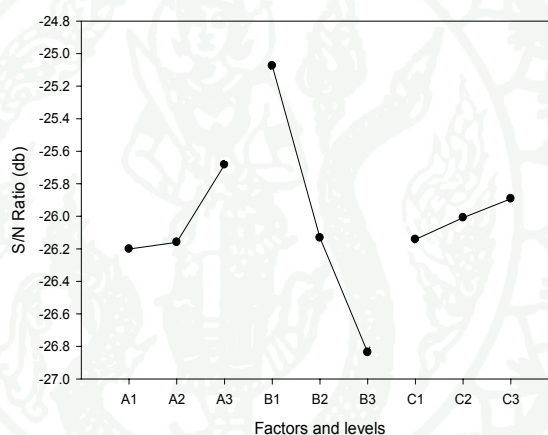
นำอัตราส่วน S/N จากตารางที่ 25 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน S/N กับปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับของปัจจัยของการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยค่า ที่เพิ่มสัดส่วนเซลลูลอส และลดสัดส่วนลิกนินในเยื่อเยื่อคาลิปต์ส โดยอัตราส่วน S/N มีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองใดมีค่าสัดส่วนเซลลูลอสสูง การทดลองนั้นก็จะมีค่าอัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองแบบ QC=B (Bigger is better) ส่วนการทดลองใดที่มีการลดสัดส่วนลิกนินต่ำ การทดลองนั้น ก็จะมีค่า อัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน เนื่องจากการออกแบบการทดลองแบบ QC=S (Smaller is better) ได้ผลดังภาพที่ 17 และ 18

จากภาพที่ 17 และ 18 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่ให้อัตราส่วน S/N สูงสุด ซึ่งสรุปเป็นสถานะที่เหมาะสม 4 สถานะที่แตกต่างกัน คือ สถานะที่ให้ค่าสัดส่วนเชลโลโลสสูงสุด และสถานะที่ให้การลดสัดส่วนลิกนินต่ำสุด แต่เนื่องจากเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำมีการลดสัดส่วนลิกนินสูง ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการสกัดด้วยด่าง เพื่อกำจัดลิกนินและเพิ่มสัดส่วนเชลโลโลสในเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำแล้ว การหาสถานะการสกัดด้วยด่างที่ดีที่สุด จึงควรมีเพียงสถานะเดียว





ภาพที่ 17 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส  
เยื่อเยื่อคาลิปดัส



ภาพที่ 18 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนลิกนิน  
เยื่อเยื่อคาลิปดัส

จากภาพที่ 17 และ 18 พิจารณาปัจจัยของแต่ละระดับที่มีอัตราส่วน S/N สูงสุดในการสกัดต่าง เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และลดสัดส่วนลิกนิน สรุประดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นสภาวะที่เหมาะสมได้ผลดังนี้ อัตราส่วน S/N สูงสุดโดยอาศัยการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและอัตราส่วน S/N ต่ำสุดโดยอาศัยการลดสัดส่วนลิกนิน พบว่าระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย อยู่ในระดับเดียวกัน คือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A) ระดับที่ 3, อุณหภูมิ (B) ระดับที่ 1 เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และเวลา (C) ระดับที่ 3 เท่ากับ 90 นาที สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง ได้ดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 สรุปสถานะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยค่า เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและลดสัดส่วน  
ลิกนิน เชื้อยูลิปัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำโดยการคำนวณวิธี  
ทางสถิติ

| ปัจจัยการทดลอง                                | ระดับการทดลอง | สถานะ |
|-----------------------------------------------|---------------|-------|
| ชุดการทดลอง A                                 |               |       |
| N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) | 3             | 25    |
| T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)                    | 1             | 70    |
| t: เวลา (นาที)                                | 3             | 90    |

หมายเหตุ ชุดการทดลอง A คือ สถานะการสกัดค่าที่ให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุด

จากตารางที่ 26 สรุปสถานะเหมาะสมของการสกัดค่าในไม้น้ำยูลิปัส ที่ได้จากวิธีทางสถิติ  
พิจารณาสถานะที่ให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และให้การลดสัดส่วนลิกนินต่ำสุด เป็นสถานะ  
เดียวกันกับชุดการทดลองที่ 7 ในตารางที่ 21 (ชุดการทดลอง A ในตารางที่ 26) และสามารถนำค่า  
สถานะที่เหมาะสมมาประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุด ของชุดการทดลอง A  
ตามลำดับ

หากพิจารณาจากอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 22) และ การวิเคราะห์ความ  
แปรปรวน (ตารางที่ 23 และ 24) ตามหลักการเลือกอันดับของปัจจัยที่ไม่มีอิทธิพลต่อการสกัดค่า  
อย่างมีนัยสำคัญ อาจเลือกอันดับที่ต่ำที่สุด เนื่องจาก ทุกอันดับของปัจจัยนั้น ๆ ให้ผลการสกัดค่า  
ไม่แตกต่างกัน จากการทดลองนี้ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลา ไม่มีนัยสำคัญ ดังนั้น  
จึงอาจเลือกที่ความเข้มข้น และเวลา ระดับที่ต่ำที่สุด เป็นระดับของปัจจัยที่เหมาะสมของการสกัด  
ค่า เนื่องจากช่วยลดต้นทุน แต่ถ้าพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N ของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและ  
การลดสัดส่วนลิกนิน (ตารางที่ 25) พบว่า ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลา ระดับ  
สูงสุด (ระดับที่ 3) ให้ค่าอัตราส่วน S/N สูงที่สุด ทั้งนี้อาจขึ้นกับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัดค่า  
อย่างมีนัยสำคัญ นั่นคือ อุณหภูมิ โดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส (ระดับที่ 1) และเพิ่มระดับ  
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลา จากนั้นไปหามาก พบว่า ค่าอัตราส่วน S/N มีแนวโน้ม  
เพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มระดับของอุณหภูมิ จากนั้นไปหามาก โดยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ  
เวลาอยู่ระดับที่สูง พบว่า ค่าอัตราส่วน S/N กลับมีแนวโน้มลดลง อาจกล่าวได้ว่า ปัจจัยที่ไม่มี

อิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) ไม่จำเป็นว่าระดับที่ต่ำที่สุด จะดีที่สุด ต้องดูค่า อัตราส่วน S/N ควบคู่

จากคำกล่าวข้างต้น และตารางที่ 25 อธิบายได้ว่า ปัจจัยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ทำหน้าที่กำจัดลิกนิน ซึ่งสัมผัสผิวเนื้อโดยตรง และละลายลิกนินออกมา ทำให้อุณหภูมิสูงระดับหนึ่ง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินมากขึ้น มีผลให้สัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป โดยความร้อนอาจทำให้เกิดการหดตัวของเส้นใย มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง จากโครงสร้างแบบหลวม ให้กลายเป็นโครงสร้างแบบผลึกมากขึ้น ทำให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ไฮโดรไลซ์ลิกนินได้ไม่ดี ส่งผลต่อสัดส่วนเซลลูโลส อีกปัจจัยคือ เวลา ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป และใช้เวลานานเกินไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้มากขึ้น ตรงกันข้าม ถ้าอุณหภูมิสูงระดับหนึ่ง (ในที่นี้คือ 70 องศาเซลเซียส) ปัญหาการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างแบบผลึก อาจเกิดขึ้นได้น้อยกว่า ถ้าเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาให้สูงขึ้น ยังทำให้การไฮโดรลิซิสลิกนินดี และเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสได้มากขึ้น สอดคล้องกับสถานะเหมาะสมที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีทากุชิ ดังตารางที่ 26

3.1.3 การประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลส และสัดส่วนลิกนิน ในเยื่อเยื่อคัลิปดัส ภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม

การวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีทากุชิโดยอาศัยค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N จะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดในเยื่อเยื่อคัลิปดัส จากการศึกษาปัจจัยเบื้องต้นของการสกัด ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และลดสัดส่วนลิกนิน คือ การสกัดด้วยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ (ระดับที่ 3,  $A_3$ ) อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ระดับที่ 1,  $B_1$ ) และเวลา 90 นาที (ระดับที่ 3,  $C_3$ )

นำค่าองค์ประกอบที่ได้จากสภาวะการสกัดที่เหมาะสม ที่คำนวณโดยใช้วิธีทากุชิ มาแสดง โดยไม่ทำการทดลองยืนยันซ้ำ เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสม เป็นสภาวะเดียวกับชุดการทดลองที่ 7 ในตารางที่ 21 และตารางที่ 27 แสดงค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุด จากการทดลองเปรียบเทียบกับค่าประมาณโดยวิธีทากุชิ ที่สภาวะเหมาะสม ซึ่งคำนวณค่าประมาณได้จากสมการที่ 3

ตารางที่ 27 เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลอง และที่ได้จากการประมาณค่าซึ่งคำนวณโดยวิธี  
ทากูชิ ในสภาวะการสกัดที่เหมาะสม ของเยื่อคาลิปต์ส ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮ-  
ดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที

| พารามิเตอร์ | สภาวะเหมาะสมของการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและกำจัดลิกนิน |           |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------|
|             | ชุดการทดลอง A (เปอร์เซ็นต์)                          |           |
|             | ค่าจากการทดลอง                                       | ค่าประมาณ |
| เซลลูโลส    | 76.84                                                | 76.46     |
| ลิกนิน      | 16.79                                                | 17.02     |

$$Y_{opt} = \bar{T} + (A_3 - \bar{T}) + (B_1 - \bar{T}) + (C_3 - \bar{T}) \quad \text{--(3)}$$

เมื่อ  $\bar{T}$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด (ดูการคำนวณเพิ่มเติมใน  
ภาคผนวก ข)

จากตารางที่ 27 สภาวะการสกัดที่ทำให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และการลดสัดส่วน  
ลิกนินต่ำสุด เป็นสภาวะเดียวกัน โดยเปรียบเทียบค่าจากการทดลอง และค่าประมาณจากการ  
คำนวณโดยวิธีทากูชิ ให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด เท่ากับ 76.84 และ 76.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ  
มีค่าต่างกันเพียง 0.38 เปอร์เซ็นต์ และให้การลดสัดส่วนลิกนินต่ำสุด เท่ากับ 16.79 และ 17.02  
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีค่าต่างกันเพียง 0.23 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าที่ใกล้เคียงกันแสดงว่า สภาวะที่ได้  
เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และลดสัดส่วนลิกนิน ในเยื่อคาลิปต์ส

3.1.4 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อคาลิปต์ส ที่ผ่านการฟรียทรีตเมนต์  
สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน

องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อคาลิปต์ส เปรียบเทียบจากวัตถุดิบเริ่มต้น  
จนถึงขั้นตอนการสกัดด้วยสภาวะเหมาะสม ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์โดยวิธีทากูชิ  
จากสัดส่วนเซลลูโลส 43.75 เพิ่มขึ้น 76.84 เปอร์เซ็นต์ และ สัดส่วนลิกนินจาก 24.69 ลดเหลือ  
16.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดเป็นประสิทธิภาพการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนเซลลูโลส เท่ากับ 43.06  
เปอร์เซ็นต์ และประสิทธิภาพการลดลงของสัดส่วนลิกนิน เท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ สรุปสัดส่วน  
องค์ประกอบทางเคมี การฟรียทรีตเมนต์ทุกขั้นตอน ดังตารางที่ 28

การลดลงของลิกนินในเยื่อเกิดจาก ค้างเข้าไปทำการแยกโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต ทำให้วัตถุดิบเกิดช่องว่าง จากนั้นค้างจึงเข้าไปทำลายโครงสร้างลิกนินภายใน ทำให้ลิกนินหลุดออกมากับสารละลายค้างได้ง่าย (Fan *et al.*, 1987) สัดส่วนลิกนินจึงลดลง และสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสถูกทำลายเพิ่ม ส่งผลให้สัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มขึ้น

**ตารางที่ 28** สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อคาลิปดัส ที่ผ่านการฟรียทรีตเมนต์สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน

| ขั้นตอน          | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) |        |              |      |
|------------------|---------------------------------|--------|--------------|------|
|                  | เซลลูโลส                        | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| วัตถุดิบเริ่มต้น | 43.75                           | 24.69  | 19.55        | 0.76 |
| การระเบิดไอน้ำ   | 44.86                           | 29.91  | 15.27        | 0.43 |
| การสกัดด้วยน้ำ   | 53.94                           | 33.16  | 3.64         | 0.16 |
| การสกัดด้วยค้าง  | 76.84                           | 16.79  | 2.11         | 1.24 |

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยค่า  $\alpha$  ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อ  
 ภาระดินเหาที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธีทางสถิติ

หลังจากเชื้อ ถูกนำมาสกัดด้วยค่า  $\alpha$  สภาวะต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการทดลองทั้ง 9 ชุด  
 การทดลอง ซึ่งออกแบบการทดลองโดยวิธีทางสถิติ เมื่อนำเชื้อมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ  
 องค์ประกอบทางเคมี ได้ผลดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีเชื้อภาระดินเหาที่สกัดด้วยค่า  $\alpha$  สภาวะที่แตกต่างกัน

| ชุดการทดลอง | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) |          |        |              |      |
|-------------|---------------------------------|----------|--------|--------------|------|
|             | ไฮโดรเซลลูโลส                   | เซลลูโลส | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| 1           | 67.75                           | 59.12    | 29.59  | 4.36         | 1.58 |
| 2           | 67.79                           | 59.52    | 29.59  | 4.02         | 3.04 |
| 3           | 66.37                           | 59.37    | 30.05  | 3.39         | 2.82 |
| 4           | 68.25                           | 60.61    | 30.04  | 3.65         | 1.88 |
| 5           | 67.39                           | 60.05    | 30.55  | 3.68         | 2.40 |
| 6           | 66.37                           | 58.71    | 30.69  | 3.72         | 2.68 |
| 7           | 68.26                           | 61.45    | 29.86  | 3.77         | 2.15 |
| 8           | 67.76                           | 61.58    | 30.24  | 3.25         | 1.63 |
| 9           | 66.61                           | 59.84    | 30.98  | 3.29         | 3.25 |

หมายเหตุ ระดับของแต่ละปัจจัยของแต่ละชุดการทดลองแสดงในอุปกรณ์และวิธีการ: ตารางที่ 11

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ ทั้ง 9 ชุดการทดลอง โดยอาศัย ค่าสัดส่วนเซลลูโลส  
 และ สัดส่วนลิกนิน เป็นพารามิเตอร์หลัก เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการสกัดด้วยค่า  $\alpha$  ต้องการกำจัด  
 ลิกนิน ออกจากเชื้อเพื่อให้มีสัดส่วนลิกนินต่ำที่สุด และเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสให้สูงที่สุด ส่วนค่า  
 สัดส่วนเฮมิเซลลูโลสและเถ้า เป็นพารามิเตอร์รอง จึงไม่นำมาวิเคราะห์ร่วม โดยการวิเคราะห์แบ่ง  
 ออกเป็นหัวข้อหลักได้ ดังนี้ การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมี การหา  
 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยค่า  $\alpha$  การประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลส และลิกนิน ที่ได้จากการ  
 สกัดด้วยค่า  $\alpha$  ที่เหมาะสม

### 3.2.1 การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อสัดส่วนเซลล์โลสและลิกนินของเยื่อกระดาษ

การหาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าสัดส่วนเซลล์โลส และลิกนินสามารถหาได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยจะแสดงถึงร้อยละอิทธิพลของปัจจัยการทดลอง (Percent contribution) ที่มีผลต่อการสกัดด้วยค่าเพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสและลดสัดส่วนลิกนิน ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบอกได้ว่าปัจจัยที่ใช้ในการทดลองใดมีผลต่อการสกัดด้วยค่า และมีอิทธิพลมากหรือน้อย ดังตารางที่ 30 นอกจากนี้การวิเคราะห์ความแปรปรวนยังสามารถบอกได้ถึงระดับความเชื่อมั่นของปัจจัยการทดลองที่มีต่อการสกัดด้วยค่า ได้ผลการวิเคราะห์สรุปดังตารางที่ 31 และ 32

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัย ในเยื่อกระดาษ ในตารางที่ 30 พบว่า ปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสมากที่สุด คือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีค่าอิทธิพล เท่ากับ 38.34 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Silverstein *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาหาสภาวะเหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์โดยกระบวนการทางเคมีของลำต้นต้นนุ่นเพื่อผลิตเอทานอล พบว่า ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีอิทธิพลต่อการลดลิกนิน สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ส่วนเวลา มีอิทธิพลน้อยที่สุด โดยมีค่าอิทธิพล เท่ากับ 27.18 เปอร์เซ็นต์ ด้านการลดสัดส่วนลิกนินในเยื่อกระดาษ ตารางที่ 30 พบว่า ปัจจัยที่มีค่าอิทธิพลมากที่สุด คือ อุณหภูมิ โดยมีค่าอิทธิพล เท่ากับ 50.97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเวลา มีอิทธิพลน้อยที่สุด โดยมีค่าอิทธิพล เพียง 3.28 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณา ร้อยละอิทธิพล (Percent contribution) แต่ละปัจจัย จากผลการวิเคราะห์ ANOVA ในตาราง ที่ 31 และ 32 พบว่า ปัจจัยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าร้อยละอิทธิพล สูงสุด เท่ากับ 36.23 เปอร์เซ็นต์ ของการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส แสดงว่าความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส ด้านการลดสัดส่วนลิกนิน พบว่า ปัจจัยอุณหภูมิ มีค่าร้อยละอิทธิพลสูงสุด เท่ากับ 36.56 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าอุณหภูมิ มีอิทธิพลต่อการลดสัดส่วนลิกนิน สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยในตารางที่ 30 แต่เมื่อพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นจะเห็นว่า ทั้งสามปัจจัย คือ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลา กลับไม่มีอิทธิพลต่อการสกัดต่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) ทั้งการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสและการลดสัดส่วนลิกนิน

**ตารางที่ 30** อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส และการลดสัดส่วน  
ลิกนิน เชื้อกระถินเทพาที่สกัดด้วยด่าง

| สัดส่วนเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)     |         |         |         |                             |                                   |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------|-----------------------------------|
| ปัจจัย                            | ระดับ   |         |         | ค่าอิทธิพลหลัก <sup>1</sup> | ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก <sup>2</sup> |
|                                   | 1       | 2       | 3       |                             |                                   |
| ความเข้มข้น NaOH<br>(เปอร์เซ็นต์) | 35.464  | 35.542  | 35.614  | 0.150                       | 38.34                             |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)           | 35.601  | 35.554  | 35.466  | 0.135                       | 34.48                             |
| เวลา (นาที)                       | 35.516  | 35.499  | 35.606  | 0.106                       | 27.18                             |
| สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์)       |         |         |         |                             |                                   |
| ปัจจัย                            | ระดับ   |         |         | ค่าอิทธิพลหลัก <sup>1</sup> | ค่าร้อยละอิทธิพลหลัก <sup>2</sup> |
|                                   | 1       | 2       | 3       |                             |                                   |
| ความเข้มข้น NaOH<br>(เปอร์เซ็นต์) | -29.473 | -29.666 | -29.647 | 0.193                       | 45.75                             |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)           | -29.495 | -29.581 | -29.710 | 0.215                       | 50.97                             |
| เวลา (นาที)                       | -29.594 | -29.603 | -29.589 | 0.014                       | 3.28                              |

หมายเหตุ - <sup>1</sup> : เท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

- <sup>2</sup> : คำนวณดังสูตรคำนวณในภาคผนวก ข

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสเยื่อกระถินเทพา

| Factor      | DOF <sup>A</sup> | SS <sup>A</sup> | V <sup>A</sup> | F <sup>A</sup> | S'    | Percent contribution (%) | Confidence <sup>A</sup> (%) | Significant |
|-------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| N           | 2                | 0.085           | 0.042          | 3.359          | 0.059 | 36.23                    | 77.06                       | -           |
| T           | 2                | 0.047           | 0.023          | 1.865          | 0.021 | 13.29                    | 65.10                       | -           |
| t           | 2                | 0.007           | 0.003          | 0.287          | 0     | 0                        | 22.30                       | -           |
| Other Error | 2                | 0.025           | 0.012          |                |       | 50.482                   |                             |             |
| Total       | 8                | 0.165           |                |                |       | 100                      |                             |             |

หมายเหตุ N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) P<0.05 \*

T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

t: เวลา (นาที)

<sup>A</sup> ดูการคำนวณได้จากภาคผนวก ข

ตารางที่ 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การลดสัดส่วนลิกนิน เยื่อกระถินเทพา

| Factor      | DOF <sup>A</sup> | SS <sup>A</sup> | V <sup>A</sup> | F <sup>A</sup> | S'    | Percent contribution (%) | Confidence <sup>A</sup> (%) | Significant |
|-------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-------------|
| N           | 2                | 0.067           | 0.033          | 4.653          | 0.053 | 34.81                    | 82.31                       | -           |
| T           | 2                | 0.07            | 0.035          | 4.837          | 0.055 | 36.56                    | 82.87                       | -           |
| t           | 2                | 0               | 0              | 0.004          | 0     | 0                        | 0.40                        | -           |
| Other Error | 2                | 0.014           | 0.007          |                |       | 26.628                   |                             |             |
| Total       | 8                | 0.152           |                |                |       | 100                      |                             |             |

หมายเหตุ N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) P<0.05 \*

T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

t: เวลา (นาที)

<sup>A</sup> ดูการคำนวณได้จากภาคผนวก ข

### 3.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยด่าง ไม่กระเด็นเทา

หลักในการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทางสถิติแบ่งประเภทของการทดลองออกเป็น 3 ประเภท คือ The Smaller is better, The Nominal is better และ The Bigger is better ซึ่งการทดลองนี้จัดอยู่ในทั้งประเภท The Bigger is better (B) และ The Smaller is better (S) โดยต้องการสัดส่วนเซลล์โลสสูงสุดจึงใช้ประเภท The Bigger is better อีกด้าน ต้องการสัดส่วนลิกนินต่ำสุด จึงใช้ประเภท The Smaller is better การทดลองครั้งนี้สนใจที่ค่าสัดส่วนเซลล์โลสสูงสุด และสัดส่วนลิกนินต่ำสุด จึงต้องหาสภาวะที่ทำให้ได้สัดส่วนดังกล่าว

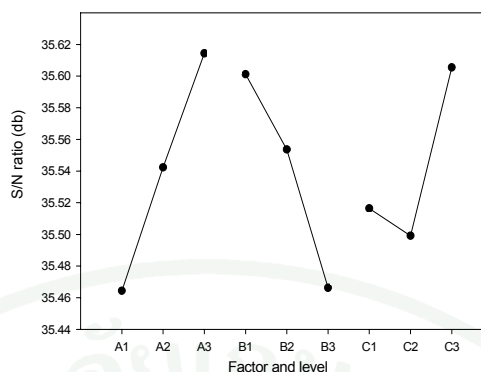
นำค่าสัดส่วนเซลล์โลส และสัดส่วนลิกนิน ของทั้ง 9 ชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ หาค่าอัตราส่วน Signal-to-Noise (S/N-Ratio) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทดลอง ซึ่งสูตรการคำนวณหาค่าอัตราส่วน S/N แสดงในภาคผนวก ข และสรุปผลได้ดังตารางที่ 33 โดยนำอัตราส่วน S/N มาคำนวณร้อยละอิทธิพลหลักของปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับการทดลอง ซึ่งสรุปผลดังตารางที่ 30

ตารางที่ 33 สรุปค่าสัดส่วน S/N ของค่าสัดส่วนเซลลูลอส และลิกนิน จากการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ของเยื่อกระดาษ

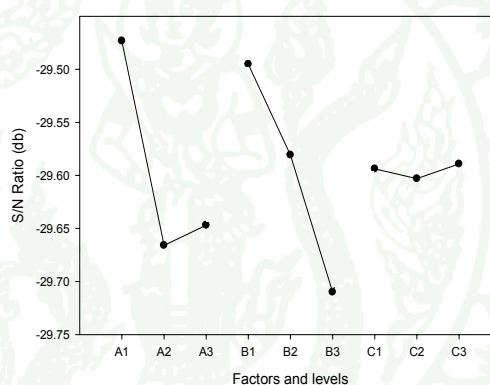
| ชุดการทดลอง | สัดส่วนเซลลูลอส (เปอร์เซ็นต์) |          |          |                  | สัดส่วนลิกนิน (เปอร์เซ็นต์) |          |          |                  |
|-------------|-------------------------------|----------|----------|------------------|-----------------------------|----------|----------|------------------|
|             | ครั้งที่                      | ครั้งที่ | ครั้งที่ | อัตราส่วน        | ครั้งที่                    | ครั้งที่ | ครั้งที่ | อัตราส่วน        |
|             | 1                             | 2        | 3        | S/N<br>(เดซิเบล) | 1                           | 2        | 3        | S/N<br>(เดซิเบล) |
| 1           | 59.82                         | 59.82    | 58.7     | 35.433           | 30.04                       | 28.23    | 30.49    | -29.427          |
| 2           | 57.76                         | 57.76    | 61.60    | 35.484           | 28.45                       | 29.29    | 31.04    | -29.430          |
| 3           | 59.57                         | 59.57    | 59.57    | 35.470           | 29.70                       | 28.80    | 31.65    | -29.563          |
| 4           | 60.49                         | 60.49    | 59.94    | 35.649           | 29.74                       | 30.47    | 29.91    | -29.555          |
| 5           | 60.34                         | 60.34    | 60.11    | 35.570           | 30.58                       | 30.43    | 30.64    | -29.700          |
| 6           | 58.85                         | 58.85    | 59.34    | 35.373           | 29.84                       | 30.90    | 31.34    | -29.742          |
| 7           | 61.68                         | 61.68    | 59.87    | 35.766           | 29.97                       | 30.80    | 28.80    | -29.504          |
| 8           | 60.57                         | 60.57    | 60.65    | 35.782           | 30.53                       | 29.61    | 30.57    | -29.612          |
| 9           | 59.23                         | 59.23    | 59.82    | 35.539           | 29.94                       | 30.78    | 32.21    | -29.824          |

นำอัตราส่วน S/N จากตารางที่ 33 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน S/N กับปัจจัยของการทดลองในแต่ละระดับของปัจจัยของการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดด้วยด่าง เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูลอส และลดสัดส่วนลิกนินในเยื่อกระดาษ โดยอัตราส่วน S/N มีความสัมพันธ์กับผลการทดลองดังนี้ หากการทดลองใดมีค่าสัดส่วนเซลลูลอสสูง การทดลองนั้นก็จะมีย่ออัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการออกแบบการทดลองแบบ QC=B (Bigger is better) ส่วนการทดลองใดที่มีค่าสัดส่วนลิกนินต่ำ การทดลองนั้น ก็จะมีย่ออัตราส่วน S/N สูงขึ้นตามไปด้วยเช่นกัน เนื่องจากการออกแบบการทดลองแบบ QC=S (Smaller is better) ได้ผลดังภาพที่ 19 และ 20

จากภาพที่ 19 และ 20 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่ให้อัตราส่วน S/N สูงสุด ซึ่งสรุปเป็นสภาวะที่เหมาะสม 4 สภาวะที่แตกต่างกัน คือ สภาวะที่ให้ค่าสัดส่วนเซลลูลอสสูงสุด และสภาวะที่ให้ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุด แต่เนื่องจากเยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำยังคงมีค่าสัดส่วนลิกนินที่สูง ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการสกัดด้วยด่าง เพื่อกำจัดลิกนินและเพิ่มสัดส่วนเซลลูลอสในเยื่อ ที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำแล้ว การหาสภาวะการสกัดด้วยด่างที่ดีที่สุด จึงควรมีเพียงสภาวะเดียว



ภาพที่ 19 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์ulos  
เยื่อกระถินเทพา



ภาพที่ 20 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อการลดสัดส่วนลิกนินเยื่อ  
กระถินเทพา

จากภาพที่ 19 และ 20 พิจารณาปัจจัยของแต่ละระดับที่มีอัตราส่วน S/N สูงสุดในการเพิ่มสัดส่วนเซลล์ulos และลดสัดส่วนลิกนิน ในเยื่อกระถินเทพา สรุประดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นสถานะที่เหมาะสมต่อการสกัดได้ผลดังนี้ อัตราส่วน S/N สูงสุดโดยอาศัยการเพิ่มสัดส่วนเซลล์ulos และอาศัยการลดสัดส่วนลิกนิน พบว่า 2 ปัจจัยหลัก มีระดับของปัจจัยอยู่ในระดับเดียวกัน คือ อุณหภูมิ (B) ระดับที่ 1 เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส และเวลา (C) ระดับที่ 3 เท่ากับ 90 นาที ส่วนความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A) ที่เป็นปัจจัยแรก ของทั้งที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์ulos และการลดสัดส่วนลิกนิน มีระดับที่ต่างกัน คือ ระดับที่ 3 และ 1 เท่ากับ 25 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สามารถสรุปสถานะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยต่าง ได้ดังตารางที่ 34

**ตารางที่ 34** สรุปสถานะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยค่า เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสและลดสัดส่วน  
ลิกนินในเยื่อกระดาษที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำโดยการ  
คำนวณวิธีทากูชิ

| ปัจจัยการทดลอง                                | ระดับการทดลอง | สถานะ |
|-----------------------------------------------|---------------|-------|
| <b>ชุดการทดลอง B</b>                          |               |       |
| N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) | 3             | 25    |
| T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)                    | 1             | 70    |
| t: เวลา (นาท)                                 | 3             | 90    |
| <b>ชุดการทดลอง C</b>                          |               |       |
| N: ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เปอร์เซ็นต์) | 1             | 15    |
| T: อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)                    | 1             | 70    |
| t: เวลา (นาท)                                 | 3             | 90    |

**หมายเหตุ** ชุดการทดลอง B คือ สถานะการสกัดที่ทำให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด  
ชุดการทดลอง C คือ สถานะการสกัดที่ทำให้ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุด

จากตารางที่ 34 สรุปสถานะเหมาะสมการสกัดที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีทากูชิ พิจารณา  
สถานะการสกัดที่ทำให้ค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด (ชุดการทดลอง B ในตารางที่ 34) เป็นสถานะ  
เดียวกับชุดการทดลองที่ 7 ในตารางที่ 29 ขณะที่สถานะที่ทำให้ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุด (ชุดการทดลอง C  
ในตารางที่ 34) ไม่ตรงกับชุดการทดลองใด ในตารางที่ 29 ดังนั้น จึงทำการทดลองยืนยันผล ณ  
สถานะเหมาะสมที่ได้ ซึ่งจุดแตกต่างของสถานะทั้งสอง (ชุดการทดลอง B และ C) คือ ความเข้มข้น  
โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยชุดการทดลอง B ใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า  
สัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด ส่วนชุดการทดลอง C ใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้  
ค่าสัดส่วนลิกนินต่ำสุด

เมื่อพิจารณาจาก การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางที่ 31 และ 32) ตามหลักการเลือก  
ระดับของปัจจัยที่ไม่มีอิทธิพลต่อการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ อาจเลือกระดับที่ต่ำที่สุด เนื่องจาก  
ทุกระดับของปัจจัยนั้น ๆ ให้ผลการสกัดต่างกัน ไม่แตกต่างกัน จากการทดลองนี้ ทั้งสามปัจจัย คือ  
ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลา มีผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งการเพิ่ม  
สัดส่วนเซลลูโลส และการลดสัดส่วนลิกนิน ดังนั้นจึงอาจเลือกปัจจัยที่ระดับต่ำที่สุด เป็นระดับของ

ปัจจัยที่เหมาะสมของการสกัดค่า เนื่องจากช่วยลดต้นทุน แต่ถ้าพิจารณาจากค่าอัตราส่วน S/N (ตารางที่ 33) พบว่า ในการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส ชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ระดับสูงสุด (ระดับที่ 3, 25 เปอร์เซ็นต์) ที่ระดับอื่นของอีกสองปัจจัย จะให้ค่าอัตราส่วน S/N มากที่สุด สอดคล้องกับอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 30) โดยความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีอิทธิพลมากที่สุดต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สังเกตจากค่าอัตราส่วน S/N ของสัดส่วนเซลล์โลส มีค่าใกล้เคียงกันมาก (ชุดการทดลองที่ 7-8 ในตารางที่ 33) ด้านการลดสัดส่วนลิกนิน ชุดการทดลองที่ใช้อุณหภูมิระดับต่ำสุด (ระดับที่ 1, 70 องศาเซลเซียส) ที่ระดับอื่น ของอีกสองปัจจัย จะให้ค่าอัตราส่วน S/N มากที่สุด สอดคล้องกับอิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัย (ตารางที่ 30) โดยอุณหภูมิมีอิทธิพลมากที่สุด ต่อการลดสัดส่วนลิกนิน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สังเกตจากค่าอัตราส่วน S/N ของสัดส่วนลิกนิน มีค่าใกล้เคียงกันมาก (ชุดการทดลองที่ 1, 4 และ 7 ในตารางที่ 33) อาจกล่าวได้ว่า ปัจจัยที่ไม่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \geq 0.05$ ) ไม่จำเป็นว่าระดับที่ต่ำที่สุด จะดีที่สุด ต้องดูค่าอัตราส่วน S/N ควบคู่

จากค่ากล่าวข้างต้น และตารางที่ 34 อธิบายได้ว่า ปัจจัยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ทำหน้าที่กำจัดลิกนิน ซึ่งสัมผัสผิวเยื่อโดยตรง และละลายลิกนินออกมา ทำให้อุณหภูมิสูงระดับหนึ่ง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินมากขึ้น มีผลให้สัดส่วนเซลล์โลสเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป โดยความร้อนอาจทำให้เกิดการหดตัวของเส้นใย มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากโครงสร้างแบบหลวม ให้กลายเป็นโครงสร้างแบบผลึกมากขึ้น ทำให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ไฮโดรไลซ์ลิกนินได้ไม่ดี ส่งผลต่อสัดส่วนเซลล์โลส อีกปัจจัยคือ เวลา ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป และใช้เวลานานเกินไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้มากขึ้น ตรงกันข้าม ถ้าอุณหภูมิสูงระดับหนึ่ง (ในที่นี้คือ 70 องศาเซลเซียส) ปัญหาการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างแบบผลึก อาจเกิดขึ้นได้น้อยกว่า ในที่นี้เชื้อกระถินเทพา ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาควบคู่ ยิ่งทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์ลิกนิน และเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสได้มากขึ้น สอดคล้องกับสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการคำนวณโดยวิธีทาคูชิ ดังตารางที่ 34

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยค่า โดยวิธีทาคูชิ (ตารางที่ 34) ปัจจัยที่ให้ระดับเท่ากัน คือ อุณหภูมิ และเวลา ถ้าสังเกตอัตราส่วน S/N (ตารางที่ 33) พบว่า ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงสุด คือ 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าอัตราส่วน S/N ของการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลสมากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ กลับให้ค่าอัตราส่วน S/N มากที่สุด กรณีการลดสัดส่วนลิกนิน ดังนั้นสภาวะเหมาะสมของการเพิ่มสัดส่วนเซลล์โลส และการลดสัดส่วนลิกนิน จึงแตกต่างกัน

### 3.2.3 การประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลส และสัดส่วนลิกนิน ในเยื่อกระดาษ ภายใต้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม

การวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีทาคุชิโดยอาศัยค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N จะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดต่างในเยื่อกระดาษ จากการศึกษาค้นคว้าเบื้องต้นของการสกัดต่างที่มีผลต่อการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส คือ การสกัดต่างที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ (ระดับที่ 3,  $A_3$ ) อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ระดับที่ 1,  $B_1$ ) และเวลา 90 นาที (ระดับที่ 3,  $C_3$ ) ส่วนปัจจัยของการสกัดต่างที่มีผลต่อการลดสัดส่วนลิกนิน คือ การสกัดต่างที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ (ระดับที่ 1,  $A_1$ ) อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ระดับที่ 1,  $B_1$ ) และเวลา 90 นาที (ระดับที่ 3,  $C_3$ )

วิธีทาคุชิ ใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดต่าง และสามารถนำค่าสภาวะที่เหมาะสมมาประมาณค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุด ของชุดการทดลอง B และ C ตามลำดับ ต่อมา นำสภาวะการสกัดต่างที่เหมาะสมที่คำนวณโดยวิธีทาคุชิ ทำการทดลองยืนยันผล เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีจากสภาวะดังกล่าว ดังตารางที่ 35 และจากตารางที่ 36 แสดงค่าสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด และลิกนินต่ำสุด เปรียบเทียบระหว่างค่าจากการทดลอง และค่าจากการประมาณโดยวิธีทาคุชิ ซึ่งคำนวณค่าประมาณได้จากสมการที่ 4 และ 5

การเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส

$$Y_{\text{opt}} = \bar{T} + (A_3 - \bar{T}) + (B_1 - \bar{T}) + (C_3 - \bar{T}) \quad \text{--(4)}$$

การลดสัดส่วนลิกนิน

$$Y_{\text{opt}} = \bar{T} + (A_1 - \bar{T}) + (B_1 - \bar{T}) + (C_3 - \bar{T}) \quad \text{--(5)}$$

เมื่อ  $\bar{T}$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด (ดูการคำนวณเพิ่มเติมในภาคผนวก ข)

ตารางที่ 35 องค์ประกอบทางเคมีของเยื่อกระดาษที่ได้จากการทดลองยืนยันผล ของสภาวะที่เหมาะสมการสกัดที่ได้จากวิธีทางเคมี

| สภาวะ         | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) |        |              |      |
|---------------|---------------------------------|--------|--------------|------|
|               | เซลลูโลส                        | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| ชุดการทดลอง B | 61.45                           | 29.86  | 3.77         | 2.15 |
| ชุดการทดลอง C | 57.77                           | 29.59  | 3.76         | 6.67 |

ตารางที่ 36 เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลอง และจากการประมาณค่าซึ่งคำนวณโดยวิธีทางเคมีในสภาวะการสกัดที่เหมาะสมของเยื่อกระดาษ

| พารามิเตอร์ | สภาวะการเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลส |           | สภาวะการกำจัดลิกนิน         |           |
|-------------|------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
|             | ชุดการทดลอง B (เปอร์เซ็นต์)  |           | ชุดการทดลอง C (เปอร์เซ็นต์) |           |
|             | ค่าจากการทดลอง               | ค่าประมาณ | ค่าจากการทดลอง              | ค่าประมาณ |
| เซลลูโลส    | 61.45                        | 61.57     | 57.77                       | (59.95)   |
| ลิกนิน      | 29.86                        | (29.99)   | 29.59                       | 29.40     |

หมายเหตุ ( ) : ค่าที่ได้จากการประมาณโดยสมการที่สภาวะเหมาะสมในชุดการทดลองนั้น ๆ

จากตารางที่ 35 และ 36 พบว่า ค่าสัดส่วนเซลลูโลสที่ได้จากการทดลองของชุดการทดลอง B เท่ากับ 61.45 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่า ชุดการทดลอง C ที่มีค่าเท่ากับ 57.77 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3.68 เปอร์เซ็นต์ โดยที่การลดสัดส่วนลิกนินของทั้งสองชุดการทดลอง คือ 29.86 และ 29.59 ของชุดการทดลอง B และ C ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันเพียงแค่ 0.27 เปอร์เซ็นต์ จึงพิจารณาที่สัดส่วนเซลลูโลส ดังนั้นจึงเลือกที่ชุดการทดลอง B เป็นสภาวะการสกัดในเยื่อกระดาษ ที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มสัดส่วนเซลลูโลสสูงสุด

### 3.1.4 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อกระดาษที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน

จากตารางที่ 37 องค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้โดยวิธีทางสถิติ จากวัตถุดิบเริ่มต้นมีสัดส่วนเซลลูโลส 46.47 เพิ่มขึ้นเป็น 61.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดเป็นประสิทธิภาพการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนเซลลูโลส เท่ากับ 24.38 เปอร์เซ็นต์ ด้านสัดส่วนลิกนิน ควรมีค่าลดลง เมื่อผ่านการสกัดด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่หาได้โดยวิธีทางสถิติ จากวัตถุดิบเริ่มต้น กลับพบว่ามีค่าสัดส่วนที่เพิ่มขึ้น คือ จาก 26.44 เป็น 29.86 แต่ถ้าเทียบกับหลังการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งพบว่ามีค่าลดลงบ้างเล็กน้อย คือ จาก 33.80 เป็น 29.86 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาของ Silverstein (2004) เปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างการใช้กรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และการพรีทรีตเมนต์โดยโอโซน ต่อการเปลี่ยนแปลงจากลำต้นต้นนุ่น เป็นเอทานอล แปรผันความเข้มข้น (0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อุณหภูมิ (90 และ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 psi) และเวลา (30, 60 และ 90 นาที) สรุปคือ การพรีทรีตเมนต์โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินสูงสุด (63.63 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 121 องศาเซลเซียส/15 psi และ 90 นาที) สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่เลือกใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการกำจัดลิกนินในไม้ไผ่กว้าง (ไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา)

และพบว่า การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เหมาะสำหรับไม้ไผ่กว้าง โดยจากการศึกษาการพรีทรีตเมนต์ไม้ไผ่กว้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์เพิ่มจาก 14 เปอร์เซ็นต์เป็น 55 เปอร์เซ็นต์ และช่วยลดลิกนิน จาก 24-55 เปอร์เซ็นต์ เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ไม่มีผลต่อลิกนินในไม้ไผ่แคบ ซึ่งให้ประสิทธิภาพไม่เกิน 26 เปอร์เซ็นต์ (Millet *et al.*, 1976) แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในฟางข้าว ซึ่งมีปริมาณลิกนินที่ต่ำ (10-18 เปอร์เซ็นต์) (Bjerre *et al.*, 1996)

ตารางที่ 37 สรุปค่าสัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีของไม้กระถินเทพา ที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์  
สภาวะเหมาะสมแต่ละขั้นตอน

| ขั้นตอน          | องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์) |        |              |      |
|------------------|---------------------------------|--------|--------------|------|
|                  | เซลลูโลส                        | ลิกนิน | เฮมิเซลลูโลส | เถ้า |
| การพรีทรีตเมนต์  |                                 |        |              |      |
| วัตถุดิบเริ่มต้น | 46.47                           | 26.44  | 18.28        | 0.76 |
| การระเบิดไอน้ำ   | 44.44                           | 29.33  | 17.92        | 0.68 |
| การสกัดด้วยน้ำ   | 51.05                           | 33.80  | 8.00         | 0.40 |
| การสกัดด้วยด่าง  | 61.45                           | 29.86  | 3.77         | 2.15 |

เมื่อเทียบระหว่างวัตถุดิบเริ่มต้นและเชื้อหลังสกัดด้วยด่าง สัดส่วนลิกนินเพิ่มขึ้น เนื่องจากสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสที่ลดลง หลังระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ซึ่งตามหลักปริมาณลิกนินและเซลลูโลสหลังระเบิดไอน้ำ แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงทำให้สัดส่วนลิกนิน และเซลลูโลสมีค่าเพิ่ม หลังจากสกัดด้วยด่าง โดยด่างจะเข้าไปทำการแยกโครงสร้างระหว่างลิกนิน และคาร์โบไฮเดรต และเข้าไปทำลายโครงสร้างลิกนิน (Fan *et al.*, 1987) ทำให้ลิกนินหลุดออกมากับสารละลายด่างได้ง่าย สัดส่วนลิกนินจึงลดลง

ไม้ต่างสายพันธุ์ มีโครงสร้างลิกนินแตกต่าง ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินแตกต่างกัน โดยขั้นตอนการสกัดด้วยด่าง ไม้ใบกว้างที่เป็นไม้เนื้อแข็ง โดยเฉพาะไม้กระถินเทพา มีโครงสร้างลิกนินที่ความซับซ้อน จึงทำให้ด่างเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยาก เมื่อเทียบกับไม้ใบกว้างชนิดอื่น ไม้ใบแคบ หรือหญ้า สังเกตได้จากลักษณะชั้นเยื่อกระถินเทพาก่อนและหลังสกัดด้วยด่าง พบว่ามีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 21 เมื่อเปรียบเทียบทางกายภาพของเชื้อที่ผ่านการสกัดด้วยด่าง ลักษณะเยื่อกระถินเทพายังคงมีความเป็นชั้นไม้มากกว่า และเยื่อคาลิปดัสเปื่อยยุ่ยและชั้นเล็กมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับสัดส่วนลิกนินของเชื้อไม้ทั้งสองชนิดที่ผ่านการสกัดด้วยด่าง กล่าวคือ เยื่อกระถินเทพามีสัดส่วนลิกนินที่เหลือ มากกว่าเยื่อคาลิปดัส (Richard , 2000)



(A)



(B)



(C)



(D)

ภาพที่ 21 ลักษณะทางกายภาพของเชื้อชีวมวลแต่ละชนิด ก่อนและหลังการสกัดด้วยด่างโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ที่สภาวะเหมาะสม

หมายเหตุ (A) เชื้อยูลิปัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ก่อนการสกัดด้วยด่าง  
 (B) เชื้อยูลิปัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ หลังการสกัดด้วยด่างที่  
 สภาวะเหมาะสม  
 (C) เชื้อกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ก่อนการสกัดด้วยด่าง  
 (D) เชื้อกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ หลังการสกัดด้วยด่าง  
 ที่สภาวะเหมาะสม

#### 4. การไฮโดรลิสซิสชีวมวลลักษณะต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์

##### 4.1 ลักษณะทางกายภาพของซินไม้ และเชื้อชีวมวล ก่อนไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์

จากภาพที่ 22 จะพบว่า วัตถุดิบเริ่มต้นทั้งไม้ยูคาลิปตัสและกระถินเทพา มีลักษณะเป็นซินไม้คงรูป แข็งแรง เนื่องจากโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส และโครงสร้างที่ซับซ้อนของลิกนิน มีลักษณะเหมือนกาวประสาน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส โดยโครงสร้างดังกล่าวทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในการไฮโดรลิสซิสเซลลูโลส

เมื่อผ่านขั้นตอนการพริทด้วยกระบวนการเปิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพามีลักษณะเปื่อยยุ่ย เชื้อแตกแยกจากกัน ไม่เป็นซินไม้เหมือนวัตถุดิบเริ่มต้น เนื่องจากการเปิดไอน้ำ ทำลายโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส โครงสร้างซับซ้อนระหว่างลิกนินกับเฮมิเซลลูโลส (Fan *et al.*, 1987) และเฮมิเซลลูโลสส่วนมากถูกไฮโดรไลซ์ เมื่อทำการสกัดด้วยน้ำ สารที่เกิดขึ้นระหว่างการเปิดไอน้ำที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของเอนไซม์ ถูกกำจัดออกจากเชื้อ ในขั้นตอนนี้ ลิกนินไม่ได้ถูกไฮโดรไลซ์ออกมาเหมือนเฮมิเซลลูโลส จึงทำให้เชื้อยังคงมีความแข็งแรงระดับหนึ่ง โดยเฉพาะไม้กระถินเทพา

หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วยด่าง ขั้นตอนนี้ ช่วยทำลายโครงสร้างลิกนิน และละลายลิกนินออกจากเชื้อ เพิ่มรูพรุนของเชื้อ ทำให้เชื้อมีลักษณะอ่อนนุ่ม และเปื่อยยุ่ยมาก โดยเฉพาะเชื้อยูคาลิปตัส เปรียบเทียบตั้งแต่วัตถุดิบเริ่มต้น การเปิดไอน้ำ และการสกัดด้วยด่าง ลักษณะเชื้อมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนเชื้อกระถินเทพา มีความอ่อนนุ่มขึ้น สามารถบีบขึ้นเชื้อ แต่ลักษณะภายนอก เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อหลังเปิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำยัง คงเป็นซินไม้ไม่แตกต่างกัน



(1) = RE



(2) = RA



(3) = SE



(4) = SA



(5) = AE



(6) = AA

**ภาพที่ 22** ลักษณะทางกายภาพของชีวมวลแต่ละชนิด ก่อนนำมาเป็นสารตั้งต้นในการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์

**หมายเหตุ** (1,2) คือ วัตถุดิบเริ่มต้น ไม้ยูคาลิปตัสและกระถินเทพา (RE, RA) ตามลำดับ

(3,4) คือ เชื้อยูคาลิปตัสและกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ (SE, SA) ตามลำดับ

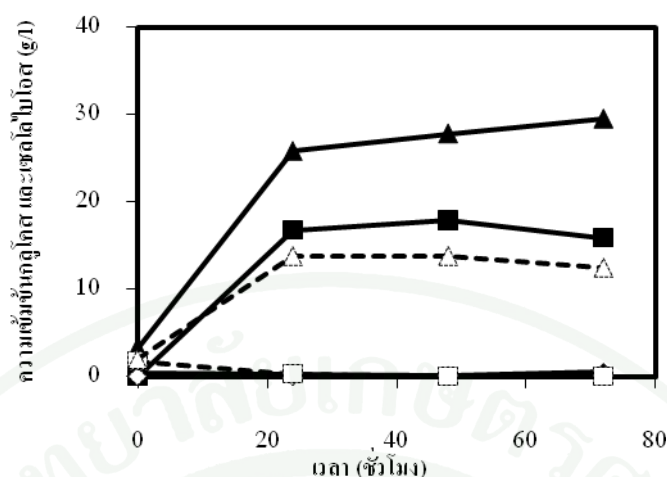
(5,6) คือ เชื้อยูคาลิปตัสและกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ หลังการสกัดด้วยด่างที่สภาวะเหมาะสม (AE, AA) ตามลำดับ

#### 4.2 การไฮโดรลิซิสชีวมวลลักษณะต่าง ๆ ด้วยเอนไซม์

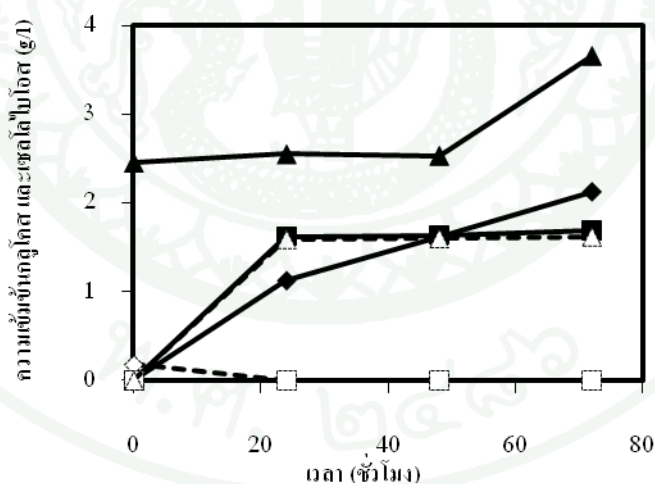
จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลทั้งสองชนิดผสมกัน คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน และดูเวลาที่ใช้ในการแยกสาร (Retention time, นาที) พบว่า พีคของน้ำตาลทั้งสองชนิดมีการแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และสม่ำเสมอทุกความเข้มข้น โดยน้ำตาลเซลโลไบโอส และน้ำตาลกลูโคส มีเวลาการแยกสารอยู่ที่ประมาณ 10.4 และ 12.6 นาที ตามลำดับ ดังตารางผนวกที่ ค1 และภาพผนวกที่ ค9

นำสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ของสารละลายตัวอย่าง ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งสองชนิดในชีวมวลลักษณะต่างกัน ที่ได้ภายหลังจากการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ดังตารางผนวกที่ ค2

จากตารางผนวกที่ ค2 นำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ โดยใช้ชีวมวลลักษณะต่าง ๆ มาสร้างกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสที่เกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 24 และ 25 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป มีการไฮโดรลิซิสและได้น้ำตาลกลูโคสออกมาเพิ่มขึ้น โดยเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อกระดิ่งเทพาแบบที่ผ่านการระเบิดไอน้ำและสกัดด้วยด่าง จะให้ความเข้มข้นน้ำตาลสูงสุด



ภาพที่ 23 ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเฟรคโตไบโอส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิสยูคาลิปตัส 3 แบบ ด้วยเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง (▲, △ : เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำและการสกัดต่างสภาวะเหมาะสม, ■, □ : เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำ และ ◆, ◇ : วัตถุดิบเริ่มต้น โดยสีดำ คือ กลูโคส และสีขาว คือ เฟรคโตไบโอส)



ภาพที่ 24 ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและเฟรคโตไบโอส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิสกระถินเทพา 3 แบบด้วยเอนไซม์ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง (▲, △ : เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำและการสกัดต่างสภาวะเหมาะสม, ■, □ : เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำ และ ◆, ◇ : วัตถุดิบเริ่มต้น โดยสีดำ คือ กลูโคส และสีขาว คือ เฟรคโตไบโอส)



(ก)



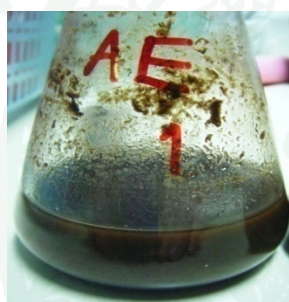
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 25 ลักษณะเชื้อชีวมวลและสีสารละลายที่ได้เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ (ก) ชี้น้ำยูลิปิดัส (วัตถุดิบเริ่มต้น)

(ข) ชี้น้ำยูลิปิดัส (วัตถุดิบเริ่มต้น)

(ค) เชื้อยูลิปิดัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ

(ง) เชื้อยูลิปิดัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ

(จ) เชื้อยูลิปิดัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และผ่านการสกัดด้วย  
ต่าง

(ฉ) เชื้อยูลิปิดัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และผ่านการสกัด  
ด้วยต่าง

#### 4.2.1 การไฮโดรลิซิสวัตถุดิบเริ่มต้นชีวมวล ด้วยเอนไซม์

โดยชีวมวลที่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นไมยคาลิปดัส และไม่กระถินเทพา (RE และ RA) ลักษณะเชื้อหลังจากการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ยังคงเป็นชิ้นไม้ แต่สีของสารละลายเข้มข้น ดังภาพที่ 25(ก) และ 25(ข) แสดงว่า มีน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรลิซิสละลายออกมาเมื่อเวลาผ่านไป

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ พบว่า ไมยคาลิปดัสและไม่กระถินเทพาให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุด ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 0.46 และ 2.13 กรัม/ลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.95 และ 4.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนน้ำตาล เซลโลไบโอส มีปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ ดังภาพที่ 23 และ 24 (ตารางผนวกที่ ค2 และ ค3) และค่าสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ของเชื้อคาลิปดัส และกระถินเทพา (ตารางที่ 38 และ ภาพที่ 26 และ 27) เท่ากับ 0.95 เปอร์เซ็นต์ และ 4.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สังเกตได้ว่า วัตถุดิบเริ่มต้นไม่กระถินเทพา ให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าไมยคาลิปดัส เนื่องมาจากโครงสร้างวัตถุดิบที่ยังไม่ได้ผ่านพริทรีตของไมยคาลิปดัส มีปริมาณองค์ประกอบที่สามารถขัดขวางการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ได้มากกว่ากระถินเทพา อาทิ สารแทรก และ เฮมิเซลลูโลส ซึ่งในไมยคาลิปดัสมีสัดส่วนองค์ประกอบเหล่านี้ที่สูงกว่าไม่กระถินเทพา

#### 4.2.2 การไฮโดรลิซิสเชื้อชีวมวลที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ ด้วยเอนไซม์

ด้านชีวมวลเชื้อคาลิปดัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสม (210 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที เทียบเป็น logRo เท่ากับ 3.84) และเชื้อกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสม (210 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที เทียบเป็น logRo เท่ากับ 3.54) เชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำจะตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ (80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที) (SE และ SA) ภายหลังจากผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 25(ค) และ 25(ง) พบว่าลักษณะเชื้อหลังจากการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ของเชื้อคาลิปดัส เปื่อยยุ่ยจนกลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย ไม่เป็นชิ้นไม้เหมือนวัตถุดิบเริ่มต้น ทางด้านเชื้อกระถินเทพา หลังจากผ่านการ ไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ สีของสารละลายเข้มข้น และเชื้อมีความอ่อนนุ่มขึ้นเมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น แต่เปื่อยยุ่ยไม่เท่าเชื้อคาลิปดัส

ภาพที่ 23 และ 24 (ตารางผนวกที่ ค2 และ ค3) พบว่าเยื่อเยื่อคาลิปต์สให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุด ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 17.91 กรัม/ลิตร ด้านเยื่อกระถินเทพาให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุด ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 1.69 กรัม/ลิตร เยื่อไม้ทั้งสองชนิดไม่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นน้ำตาลเซลโลไบโอสได้ เนื่องจากมีปริมาณต่ำมาก คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคสของเยื่อเยื่อคาลิปต์ส เท่ากับ 29.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเยื่อเยื่อคาลิปต์สได้น้ำตาลกลูโคสเยื่อกระถินเทพา เท่ากับ 2.98 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสของเยื่อเยื่อคาลิปต์ส และกระถินเทพา (ตารางที่ 38 และภาพที่ 26 และ 27) เท่ากับ 29.89 เปอร์เซ็นต์ และ 2.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังตารางผนวกที่ ค3 แสดงให้เห็นว่า เยื่อไม้ที่ผ่านขั้นตอนฟิรทรีดโดยการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสม ตามหลักทำให้โครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลสถูกทำลายบางส่วน รวมทั้งโครงสร้างของลิกนินเกิดการแยกจากกัน ส่วนเฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างที่ถูกทำลายง่าย จึงถูกไฮโดรไลซ์ทำให้เกิดน้ำตาลและสารบางตัวออกมา การสกัดด้วยน้ำเพื่อช่วยชะน้ำตาลส่วนที่ละลายและสารบางตัวออกไปจากเยื่อ จึงทำให้มีสัดส่วนเซลลูโลสเพิ่มสูงขึ้น ถึงแม้โครงสร้างลิกนินจะถูกแยกจากกัน แต่ลิกนินไม่ได้ถูกไฮโดรไลซ์ออกมาในขั้นตอนนี้ ดังนั้นสัดส่วนลิกนินจึงไม่ได้ลดลงเมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ทำให้สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้น และเมื่อเทียบจากชนิดของชีวมวล พบว่า เยื่อเยื่อคาลิปต์สมีเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคสที่สูงกว่าเยื่อกระถินเทพา สังเกตได้จากลักษณะเยื่อหลังไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ (ภาพที่ 25(ค) และ 25(ง)) และในแง่องค์ประกอบทางเคมีหลังผ่านฟิรทรีดขั้นตอนนี้ พบว่าเยื่อเยื่อคาลิปต์สมีสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสคงเหลือเพียงแค่ 3.64 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เยื่อกระถินเทพามีสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสคงเหลือมากกว่า คือ 8.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการคงเหลือของเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระถินเทพาที่มากกว่า ทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ เยื่อกระถินเทพาจึงไม่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ได้ดีเท่าเยื่อเยื่อคาลิปต์ส

4.2.3 การไฮโดรลิซิสเยื่อชีวมวลที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่างที่สภาวะเหมาะสม ด้วยเอนไซม์

ชีวมวลไม้ทั้งสองชนิดที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่างสภาวะเหมาะสม (ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเวลา 90 นาที) โดยชีวมวลทั้งสองชนิดได้สภาวะเหมาะสมของการสกัดด้วยด่างที่สภาวะเดียวกัน (AE และ AA) ภายหลังจากผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 25(จ) และ 25(ฉ) พบว่าลักษณะเยื่อหลังผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ของ

เยื่อยูคาลิปตัส เปื่อยยุ่ยจนกลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายมากกว่าเยื่อหลังระเบิดไอน้ำ และไม่เป็นชิ้นไม้เหมือนวัตถุดิบเริ่มต้น ทางด้านเยื่อกระดาษ หลังจากผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ เยื่อมีความอ่อนนุ่มขึ้น เมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้นและเยื่อหลังระเบิดไอน้ำ แต่เปื่อยยุ่ยไม่ทำเยื่อยูคาลิปตัส

ภาพที่ 23 และ 24 (ตารางผนวกที่ ค2 และ ค3) พบว่าเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อกระดาษให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงสุด ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 29.47 และ 3.66 กรัม/ลิตร ตามลำดับ มีความเข้มข้นน้ำตาลเซลโลไบโอส 12.44 และ 1.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 34.52 และ 5.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลเซลโลไบโอส เท่ากับ 15.38 และ 2.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ของเยื่อยูคาลิปตัส และกระดาษ (ตารางที่ 38 และภาพที่ 26 และ 27) เท่ากับ 49.89 เปอร์เซ็นต์ และ 7.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ดังตารางผนวกที่ ค6 แสดงให้เห็นว่า เยื่อที่ผ่านขั้นตอนฟิสิกส์โดยการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่างที่สภาวะเหมาะสม ตามหลักทำให้โครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลสถูกทำลายเพิ่มขึ้น แต่เซลลูโลสไม่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะขั้นตอนนี้ไปไฮโดรไลซ์โครงสร้างลิกนิน ที่แยกจากกันเป็นโครงสร้างแบบหลวม ให้ละลายออกมาพร้อมกับสารละลายด่างทำให้สัดส่วนเซลลูโลสสูงขึ้น เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ จึงสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคสได้มากขึ้น เมื่อเทียบจากชนิดของชีวมวล พบว่า เยื่อยูคาลิปตัสมีเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคสที่สูงกว่าเยื่อกระดาษมาก ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะเยื่อหลังไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ (ภาพที่ 25(จ) และ 25(ฉ)) ในแง่องค์ประกอบทางเคมีหลังผ่านฟิสิกส์ขั้นตอนนี้ พบว่า เยื่อยูคาลิปตัสมีสัดส่วนลิกนิน คงเหลือเพียงแค่ 16.79 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เยื่อกระดาษมีสัดส่วนลิกนินคงเหลือมากกว่า คือ 29.86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการคงเหลือของลิกนินในเยื่อกระดาษที่มากนัก ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีเท่า เมื่อเทียบกับเยื่อยูคาลิปตัส

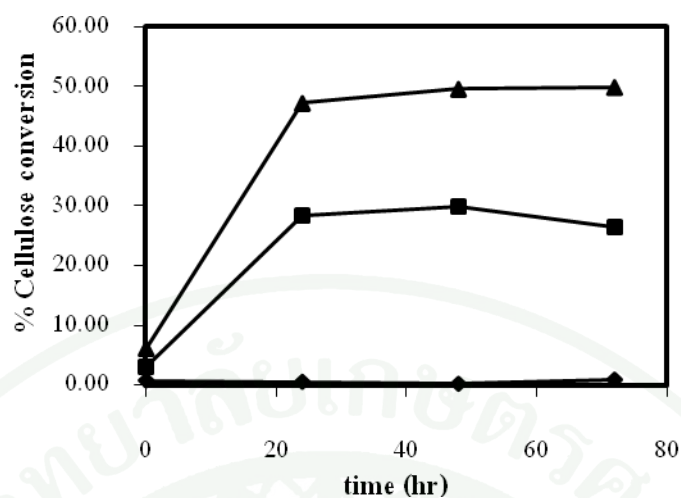
จากการศึกษาของ Silverstein (2004) การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการฟิสิกส์ส่วนลำต้นต้นนุ่น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสสูงสุดถึง 60.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้กรดซัลฟูริก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโอโซน

จากการศึกษาของ Moldes *et al.* (1999) ไม้ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules*) ที่ถูกกำจัดลิกนิน โดยกรดอะซิติก-น้ำ-ไฮโดรคลอริก และตามด้วยการแช่ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอก-

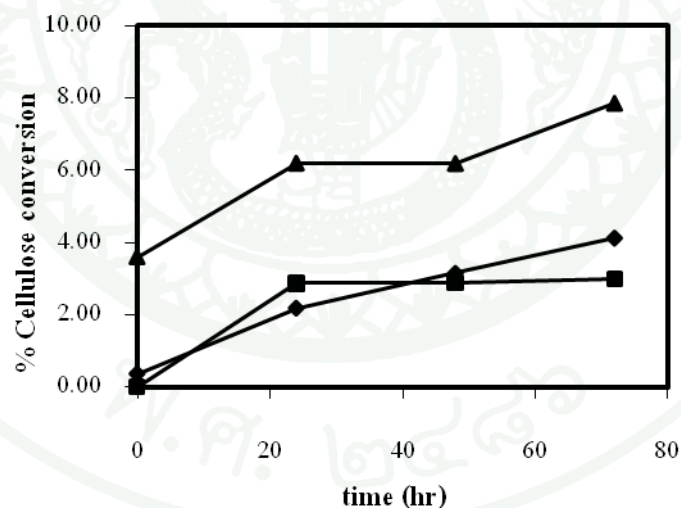
ไฮด์ ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) ภายใต้สภาวะหนึ่ง ๆ จะได้สัดส่วนเซลลูโลสสุดท้าย เท่ากับ 89.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส จะได้รับการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลสสูงสุด เท่ากับ 61.9 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 38 การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง

| เวลา (ชั่วโมง) | การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์) |       |       |      |      |      |
|----------------|--------------------------------------|-------|-------|------|------|------|
|                | RE                                   | SE    | AE    | RA   | SA   | AA   |
| 0              | 0.81                                 | 3.04  | 6.14  | 0.37 | 0.00 | 3.60 |
| 24             | 0.57                                 | 28.40 | 47.22 | 2.19 | 2.86 | 6.20 |
| 48             | 0.21                                 | 29.89 | 49.59 | 3.15 | 2.88 | 6.19 |
| 72             | 0.95                                 | 26.54 | 49.89 | 4.13 | 2.98 | 7.86 |



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิสยูคาลิปตัส (AE) ต่างลักษณะ ด้วย เอนไซม์ ( ▲: เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสถานะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำ และการสกัดต่างสถานะเหมาะสม, ■: เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสถานะเหมาะสมตามด้วยการสกัดน้ำ และ ◆: วัตถุดิบเริ่มต้น)



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ที่ได้จากการไฮโดรลิซิสกระถินเทพา (AA) ต่างลักษณะ ด้วย เอนไซม์ ( ▲: เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสถานะเหมาะสม ตามด้วยการสกัดน้ำ และการสกัดต่างสถานะเหมาะสม, ■: เยื่อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสถานะเหมาะสมตามด้วยการสกัดน้ำ และ ◆: วัตถุดิบเริ่มต้น)

ชีวมวลแต่ละชนิด จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินแตกต่างกัน ขึ้นกับการจัดเรียงโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมี โดยเฉพาะโครงสร้างลิกนิน ถ้ายังมีความซับซ้อน จะทำให้การแทรกซึมของด่าง เข้าได้ไม่เต็มที่ สังเกตได้จากลักษณะเยื่อหลังสกัดด้วยด่าง กระดาษเทพาคงความเป็นชิ้นไม่อย่างเห็นได้ชัดกว่ายูคาลิปตัส ถึงแม้เยื่อกระดาษเทพาที่ได้ มีความอ่อนนุ่ม สามารถบิบเยื่อได้ เนื่องจากด่างเข้าไปทำให้โครงสร้างลิกนินอยู่กันอย่างหลวม แต่ไม่ได้ละลายหรือกำจัดลิกนินออกจากเยื่อได้มาก เมื่อเทียบกับเยื่อยูคาลิปตัส

เมื่อผ่านการสกัดด่าง ทำให้เยื่อกระดาษมีโครงสร้างลิกนินที่อยู่กันอย่างหลวม ๆ ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ง่าย จึงทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าเยื่อกระดาษก่อนสกัดด่าง (หลังระเบิดไอน้ำและตามด้วยสกัดด้วยน้ำ) และวัตถุดิบเริ่มต้นไม่มีกระดาษ

เนื่องจากการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ จะได้น้ำตาลเซลโทไบโอสและกลูโคสออกมาตามลำดับ โดยการเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จะช่วยลดการสะสมของน้ำตาลเซลโทไบโอสในระบบ ไม่ให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส แต่หลังจากนั้น เซลโทไบโอสถูกไฮโดรไลซ์ออกมาเป็นกลูโคสมากขึ้น เกิดการสะสมกลูโคส ทำให้กลับไปยับยั้งการทำงานของเบต้า-กลูโคซิเดสแทน จึงทำให้อัตราการไฮโดรไลซิสช้าลง

เมื่อสังเกตผลการทดลองจากภาพที่ 23 และ 24 (ตารางผนวกที่ ก2) เห็นได้ว่า เยื่อยูคาลิปตัส หลังจากผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วยด่าง เมื่อเวลาผ่านไป จะมีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูง และความเข้มข้นของน้ำตาลเซลโทไบโอสก็สูงเช่นกัน แต่ไม่เท่าน้ำตาลกลูโคส จากผลการทดลองนี้กล่าวได้ว่า ความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องช่วงเวลาแรก เนื่องจากเยื่อที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ขั้นตอนต่าง ๆ นี้ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าไปไฮโดรไลซ์เซลลูโลสได้ง่าย เมื่อความเข้มข้นกลูโคสสูงถึงจุด ๆ หนึ่ง กลูโคสที่ได้จะกลับไปยับยั้งการทำงานของเบต้า-กลูโคซิเดส ทำให้สารตั้งต้นของเบต้า-กลูโคซิเดส คือเซลโทไบโอส เกิดการสะสมขึ้นในระบบ และเซลโทไบโอสก็กลับไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ระบบการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสหยุดนิ่ง ซึ่งถ้าสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้าย อาจทำให้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้ มีค่าสูงกว่านี้

ส่วนผลการทดลองชีวมวลลักษณะอื่น ยกตัวอย่างเช่น วัสดุคิบเริ่มต้นของไม้ทั้ง 2 ชนิด ที่ให้ความเข้มข้นกลูโคสเพียงเล็กน้อย แต่ไม่พบความเข้มข้นเซลโลไบโอสเหลืออยู่ อธิบายได้ว่าเมื่อ เอนไซม์เซลลูเลสไฮโดรไลซ์ชิ้นไม้ซึ่งมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ไฮโดรไลซ์เซลลูโลสเป็นเซลโลไบโอสได้ความเข้มข้นน้อย หลังจากนั้นเบต้า-กลูโคซิเดส ทำการไฮโดรลิซิสเซลโลไบโอสทั้งหมดเป็นน้ำตาลกลูโคสทันที ในที่นี้อุปสรรคในการไฮโดรลิซิสของเอนไซม์เซลลูเลสไม่เกี่ยวกับการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่เกี่ยวกับสภาพหรือลักษณะชีวมวลที่ไม่เหมาะสมต่อการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสนั่นเอง



## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

#### 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ โดยการระเบิดไอน้ำ (steam explosion) ของไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการระเบิดไอน้ำของชีวมวล 2 ชนิด คือ ไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา โดยดูจากวัตถุประสงค์คือการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและปัจจัยทางด้านพลังงาน จะได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการระเบิดไอน้ำของไม้ยูคาลิปตัสคือ อุณหภูมิ 210 °C เวลา 4 นาที จากเริ่มต้นวัตถุดิบที่มีเฮมิเซลลูโลส 19.55 เปอร์เซ็นต์ จะคงเหลือสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสสุดท้าย 3.64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการระเบิดไอน้ำของไม้กระถินเทพา คือ อุณหภูมิ 210 °C เวลา 2 นาที จากเริ่มต้นวัตถุดิบที่มีเฮมิเซลลูโลส 18.28 เปอร์เซ็นต์ จะคงเหลือสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสสุดท้าย 8.00 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพการลดลงของสัดส่วนเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 81.38 และ 52.24 เปอร์เซ็นต์ ของไม้ยูคาลิปตัส และกระถินเทพา ตามลำดับ เมื่อผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำที่เหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ

#### 2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยด่าง (alkaline extraction) ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลที่ผ่านขั้นตอนการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธีทาคุชิ

เยื่อยูคาลิปตัสและกระถินเทพาที่ผ่านการระเบิดไอน้ำที่สภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ นำมาหาสภาวะการสกัดด้วยด่าง โดยใช้วิธีทาคุชิ ได้สภาวะเหมาะสมสำหรับเยื่อไม้ทั้งสองชนิด ดังนี้ ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเวลา 90 นาที โดยได้ค่าสัดส่วนเซลลูโลส และค่าสัดส่วนลิกนิน จากการทดลองจริงของเยื่อยูคาลิปตัส เท่ากับ 76.84 และ 16.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเยื่อกระถินเทพา เท่ากับ 61.54 และ 29.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

### 3. การไฮโดรลิซิสชีวมวลต่างลักษณะ ด้วยเอนไซม์

เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ชีวมวลเยื่อใยคาบิปปัสที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และผ่านการสกัดด้วยด่างสภาวะเหมาะสม (AE) ให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น (RE) และเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ (SE) โดยค่าความเข้มข้นกลูโคสสูงที่สุดที่ได้เท่ากับ 29.47 กรัม/ลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 34.52 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงให้ค่าสูงสุด ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 49.89 เปอร์เซ็นต์

เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ ชีวมวลเยื่อกระดาษที่ผ่านการระเบิดไอน้ำสภาวะเหมาะสมตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ และผ่านการสกัดด้วยด่างสภาวะเหมาะสม (AA) จะให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวัตถุดิบเริ่มต้น (RA) และเชื้อที่ผ่านการระเบิดไอน้ำตามด้วยการสกัดด้วยน้ำ (SA) โดยค่าความเข้มข้นกลูโคสสูงที่สุดที่ได้เท่ากับ 3.66 กรัม/ลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 5.35 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส ให้ค่าสูงสุด ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 7.86 เปอร์เซ็นต์

### ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการระเบิดไอน้ำ ปัจจัยที่มีผลต่อการฟัรทริตเมนต์ขั้นตอนนี้คือ อุณหภูมิ เวลา ขนาดชิ้นวัตถุดิบ และความชื้น เป็นต้น ในที่นี้วัตถุดิบที่เข้าเครื่องระเบิดไอน้ำ เป็นวัตถุดิบแบบแห้ง ถ้าทำให้ชิ้นวัตถุดิบเปียกชุ่มก่อน โดยอาจมีการแช่น้ำข้ามคืน หรือ แช่ค้างอ่อนหรือกรค่อน อาจช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนภายในเนื้อไม้ ทำให้อไอน้ำสามารถแทรกเข้าไปภายในได้ง่าย และทำให้เส้นใยเยื่อแยกออกจากกันได้ง่ายขึ้น

หลังจากขั้นตอนการระเบิดไอน้ำ แล้วทำการสกัดด้วยน้ำ รวมถึงชะล้างน้ำ ทำให้น้ำตาลและสารบางตัวที่เกิดจากเฮมิเซลลูโลสถูกไฮโดรไลซ์ในขั้นตอนการฟัรทริตเมนต์ขั้นตอนนี้ ออกมาในน้ำที่สกัดและล้างนั้นจะมีสารละลายน้ำตาลไซโลสและโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งน้ำตาลไซโลสนี้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ไซลิทอลได้

จากการทดลองนี้ เป็นการไฮโดรลิซิสให้น้ำตาลกลูโคสก่อน แล้วนำน้ำตาลที่ได้ไปหมักเพื่อผลิตเป็นเอทานอลต่อไป ซึ่งอุปสรรคของการไฮโดรลิซิสเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ คือ การยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งคือกลูโคส ทำให้ได้กลูโคสสุดท้ายในระบบน้อยกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นจึงอาจมีการพัฒนาระบบเพื่อลดความเข้มข้นกลูโคสลง ไม่ให้เกิดการยับยั้งการหมักโดยกลูโคสอีก โดยการใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่องหรือ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่างการใช้ไฮโดรลิซิสเซลลูโลส สูงกว่าอุณหภูมิของการหมักเอทานอล อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ SSF จึงอยู่ที่ประมาณกึ่งกลางของทั้งสองจุด แต่ยีสต์หรือแบคทีเรียทั่วไปไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมินี้ จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์หรือแบคทีเรียให้ สามารถทนอุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

เนื่องจากการฟัรทริตเมนต์เพื่อกำจัดลิกนิน โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีผลต่อการกำจัดลิกนินในไม้กระถินเทพา อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ในการศึกษาไม้กระถินเทพาครั้งต่อไป อาจเลือกใช้สารละลาย หรือวิธีฟัรทริตเมนต์อื่นแทน จากการศึกษาของ Shah *et al.* (2008) เพื่อหาผลของการฟัรทริตเมนต์ไม้ใบกว้าง (ชิ้นไม้ aspen) ที่มีต่อการไฮโดรลิซิสและหมักแบบต่อเนื่องในการผลิตอะซิโตนและ บิวทานอล พบว่า การฟัรทริตเมนต์โดยสาร monoethanolamine (MEA) สามารถกำจัดลิกนิน มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และคงเหลือคาร์โบไฮเดรตในเยื่อถึง 83 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Wise *et al.* (1939) ที่ใช้ MEA บริสุทธิ์ ในการกำจัดลิกนินออกจากไม้ aspen ได้ประสิทธิภาพถึง 98.2 เปอร์เซ็นต์

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นิรนาม. 2550. **ชีวมวล**. วิกีพีเดีย สารานุกรมเสรี. แหล่งที่มา: <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%8A%E0%B8%B5%E0%B8%A7%E0%B8%A1%E0%B8%A7%E0%B8%A5>, 29 พฤศจิกายน 2550.

\_\_\_\_\_. ม.ป.ป. **ประโยชน์ของไม้ยูคาลิปตัส**. ยูคาลิปตัส คามาลคูเลนซิส. แหล่งที่มา: <http://www.forest.go.th/private/Document/yuka.htm>, 5 ตุลาคม 2550.

\_\_\_\_\_. ม.ป.ป. **พลังงานชีวภาพ**. แหล่งที่มา: <http://academy.aetf-online.com/images/stories/document/sciences/Bioenergy.ppt#278,22>, อนาคต การพัฒนา และการวิจัยพลังงานชีวภาพรูปแบบต่างๆ, 29 พฤศจิกายน 2550.

\_\_\_\_\_. 2540. **เชื้อเพลิงเอทานอล**. แจ๊สเกิด 8 โรงงานเอทานอล กก.ชงข้อมูลเสนอ กพช.นัดหน้า. แหล่งที่มา: <http://www5.excise.go.th/information/industry.html>, 5 ตุลาคม 2550.

วรณี แผงจันทิก และวิชัย เพ็ชรดี. 2546. **การศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว**. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิทยา ปั่นสุวรรณ. 2541. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ไม่ใช่ไม้สำหรับอุตสาหกรรมเชื้อและกระดาษ, หน้า 271. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 บทคัดย่อ 3 - 5 กุมภาพันธ์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_. พิลาณี ไวนอมสตัย และวิวัฒน์ อรรถพานุรักษ์. 2549. การผลิตเฟอร์ฟูรอลและแอลฟาเซลลูโลสในเวลาเดียวกันจากชานอ้อย, หน้า 11-17. ใน **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาวิทยาศาสตร์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_. วิจัยที่ วรรณพานุรักษ์, พิลานี ไวณอมสัคย์ และนิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์. 2548.  
การแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นปาล์มน้ำมันโดยวิธีการระเบิดไอน้ำ. แหล่งที่มา:  
[http://www.scisoc.or.th/stt/31/sec\\_n/paper/stt31\\_N0022.pdf](http://www.scisoc.or.th/stt/31/sec_n/paper/stt31_N0022.pdf), 5 ตุลาคม 2550.

วิฑูรย์ เหลืองวิริยะแสง. ม.ป.ป. การปรับปรุงพันธุ์ไม้อะเคเซียเพื่อการปลูกป่าเศรษฐกิจ. รายงาน  
การสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา ครั้งที่ 7. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แหล่งที่มา:  
[http://www.forest.go.th/silvic/WP\\_Publications/Paper\\_SVGPub\\_PDF/SilvicSemina7/t1SS.pdf](http://www.forest.go.th/silvic/WP_Publications/Paper_SVGPub_PDF/SilvicSemina7/t1SS.pdf), 7 กันยายน 2550.

ลาโรจน์. 2543. สารให้ความหวานจากฟางข้าว. แหล่งที่มา: [http://www.elib-online.com/doctors/herb\\_straw01.html](http://www.elib-online.com/doctors/herb_straw01.html), 4 มีนาคม 2552.

ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ. 2550. ยูคาลิปตัส. แหล่งที่มา: [http://www.dnp.go.th/EPAC/plant\\_economic/46yucalipus.htm](http://www.dnp.go.th/EPAC/plant_economic/46yucalipus.htm), 16 ตุลาคม 2550.

ศูนย์ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากร  
ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ม.ป.ป. แหล่งที่มา: [http://www.dnp.go.th/EPAC/plant\\_economic/02krathintapa.htm](http://www.dnp.go.th/EPAC/plant_economic/02krathintapa.htm), 16 ตุลาคม 2550.

อำนาจ จันทร์ครุฑ และ สมศรี บุญเรือง. 2550. กองส่งเสริมพืชไร่นา. แหล่งที่มา: <http://www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/kratin/index.htm>, 16 ตุลาคม 2550.

Adsul, M., J. Khire, K. Bastawde and D. Gokhale. 2007. Production of Lactic Acid from  
Cellobiose and Cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc-3. **Appl Environ  
Microbiol.** 73: 5055–5057.

Anonymous. 1996. **Hemicellulose**. Available Source: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/FUNDAMNT/hemicel.htm>. ESB, Porto, Portugal, September 7, 2008.

\_\_\_\_\_. n.d. **Cellulase production**. Available Source: <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm#3.2.1%20cellulase>, September 7, 2007.

\_\_\_\_\_. n.d. Available Source: <http://member.lycos.fr/nico911/formules.htm>, May 6, 2007.

\_\_\_\_\_. n.d. **Appendix B: Overview of Cellulose-Ethanol Production Technology.**

Oregon Cellulose-Ethanol Study. Available Source: <http://www.ethanol-gec.org/information/briefing/20.pdf>, September 4, 2009.

Awang, K. and D. Taylor. 1993. *Acacia mangium* Growing and Utilization, MPTS monograph No.3. Bangkok, Thailand : Winrock International and FAO.

Begu, P. and J.P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbial. Rev.** 13: 25-58.

Berghem, L.E.R., Pettersson, L.G. 1974. Mechanism of enzymatic cellulose

Bharathi, K. and R. Pogaku. 2006. PRETREATMENT STUDIES OF RICEBRAN FOR THE EFFECTIVE PRODUCTION OF CELLULASE. **J. Environ. Agric. Food Chem.** 5(2): 1253-1264.

Bisaria, V.S. and S. Mishra. 1989. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.** 9: 61-103.

Bisaria, V.S. 1991. Bioprocessing of Agro-residues to glucose and chemicals. In: Martin, A.M. (Ed.), Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. **Elsevier**, London, pp. 210-213.

Bjerre, A.B., A.B Olesen and T. Fernqvist. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 49: 568-577.

- Box, G., S. Bisgaard and C. Fung. 1988. An explanation and critique of Taguchi's contributions to quality engineering. **Qual. Reliab. Eng. Int.** 4: 123-131.
- Cantarella, M., L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera and F. Alfani. 2004. Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. **Biotechnol. Prog.** 20: 200-206.
- Clark, T. A. and K. L. Mackie. 1987. Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimisation. **J. Wood Chem. Technol.** 7: 373-403.
- Cristóbal C., R. Encarnación, B. Ignacio, J.N. María and C. Eulogio. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Proc. Biochem.** 41: 423-429.
- de Vrije, T.G.G., G.B. de Haas, E.R.P.K. Tan and P.A.M. Claassen. 2002. Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. **Int. J. Hydrogen Energy** 27: 1381-1390.
- Deswarte, F. n.d. **Dr. Fabien Deswarte**. Green chemistry. Available Source: <http://www.york.ac.uk/res/gcg/GCG/members/academic/fabs/fabs.htm>, November 28, 2007.
- Duff, S.J.B. and W.D. Murray. 1996. Bioconversion of forest products industry waste celluloses to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 55: 1-33.
- Fan, L.T., M.M. Gharpuray, Y.H. Lee. 1987. In: Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs. Springer, Berlin, p. 57.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. **Pure and Appl. Chem.** 59: 257-268.

Gilbert, H.J. and G.P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. **J. Gen. Microbial.** 139: 187-94.

Goldstein, I.S. 1981. **Organics Chemicals from Biomass**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

Grous, W.R., A.O. Converse and H.E. Grethlein. 1986. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme Microb. Technol.** 8: 274-80.

Harwood, C.E. and E.R. Williams. 1992. **A review of provenance variation in growth of Acaci mangium**, pp. 22-30. *In* L.T. Carron and K.M. Aken (eds). **Breeding Technologies for Tropical Acacias**. ACIAR Proceedings No. 37.

Heitz, M., E. Capek-Ménard, P.G. Koeberle, J. Gagné and E. Chornet. 1999. Fractionation of *Populus tremuloides* at the Pilot Plant Scale: Optimization of Steam Pretreatment Conditions using the STAKE II Technology. **Biores. Technol.** 35: 23-32.

Jeoh, T. 1998. **Steam Explosion Pretreatment of Cotton Gin Waste for Fuel Ethanol Production**. M.S. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University.

Kokta, B. and A. Ahmed. 1998. **Steam Explosion Pulping**. ENVIRONMENTALLY FRIENDLY TECHNOLOGIES FOR THE PULP AND PAPER INDUSTRY Available Source: <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/kokta98a.pdf>, November 29, 2007.

Laemsak, N. and M. Okuma. 2000. Development of boards made from oil palm frond. Properties of binderless boards from steam-exploded fibers of oil palm frond. **J. Wood Sci.** 46: 322-326.

Laherrère J.H. 2003. **Oil and Natural Gas Resource Assessment: Production Growth Cycle**

**Models.** Encyclopedia of Energy. Draft 16 July 2003.

Lamed, R. and E.A. Bayer. 1988. The cellulosome of *Clostridium thenocellum*. **Adv. Appl.**

**Microbial.** 33: 1-46.

Lignin Institute. 2002. **Lignin and its properties.** Available Source: <http://www.lignin.info/01augdialogue.html>, October 13, 2007.

Lochner, R. H. and J. E. Matar. 1990. **Designing for Quality.** Chapman and Hall, UK.

Madhav, S. P. 1989. Quality engineering using robust design. **AT&T Bell Laboratories.** 67-68.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.** 31: 426-428.

Millet, M.A., A.J Baker and L.D. Scatter. 1976. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 6: 125-153.

Moldes, A.B., J.L. Alonso and J.C. Parajo. 1999. Cogeneration of Cellobiose and Glucose from Pretreated Wood and Bioconversion to Lactic Acid: A Kinetic Study. **J. Biosci. Bioeng.** 6: 787-792.

Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladish. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biores. Technol.** 96: 673-686.

Murray, W.D., L.C. Sowden and J.R. Colvin. 1986. Localization of the cellulase activity of *Bacteroides cellulosolvens*. Lett. **Appl. Microbial.** 3: 69-72.

Patt, R., O. Kordsachia and J. Fehr, 2006. European hardwoods versus *Eucalyptus globulus* as a raw material for pulping. **Wood Sci. Technol.** 40: 39-48.

Pauley, K. 2007. **Cellulosic Biomass Chemical Pretreatment Technologies**. MATRIC.

Available Source: <http://www.wvdo.org/community/Pauley.pdf>, November 29, 2007.

Pinto, C.P., D.V. Evtuguin and C.P. Neto. 2005. Chemical composition and structural features of the macromolecular components of plantation *Acacia mangium* wood. **J Agric Food Chem.** 53: 7856-7862.

Ramirez, R.S. 2005. **Long-Term Lime Pretreatment of Poplar Wood**. M.S. Thesis, Texas A&M University.

Richard, H. 2000. **Lignin**. Wood Chemistry, Products and Processes. Available Source:

<http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869E/CHEM869ELinks/www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/notes1/lignin.html>, November 29, 2007.

Robert, F.H.D., H. Karageorge and A.F.A. Wallis. 1987. Pretreatment of Hardwood (*Eucalyptus Regnans*) Sawdust by Autohydrolysis Explosion and Its Saccharification by Trichoderma Cellulases. **Biocat. Biotransfor.** 1:47-61.

Roy, R. K. 2001. Design of experiments using the Taguchi approach. John Wiley & Sons, Inc.

Saha B.C. and R.I. Bothast. 1996. Glucose Tolerant and Thermophilic  $\beta$ -glucosidase from Yeasts. **Biotechnol. Letters.** 18: 155-158.

Shah, M.M., S.K. Song, Y.Y. Lee and R. Torget. 2008. Effect of pretreatment on simultaneous saccharification and fermentation of hardwood into Acetone/Butanol. **Appl Biochem Biotechnol.** 28-29: 99-109

Silverstein, R.A. 2004. **A Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Converting Cotton Stalks to Ethanol**. M.S. Thesis, North Carolina State University.

\_\_\_\_\_, R.A., Y. Chen, R.R. Sharma-Shivappa, M.D. Boyette and J. Osborne. 2007. A Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Improving Saccharification of Cotton Stalks. **Biores. Technol.** 98: 3000-3011.

Sjostrom, E. 1981. **Wood chemistry fundamentals and applications**. Academic press Inc., London, p 51-70.

Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Biores. Technol.** 83: 1-11.

Teymouri, F., L. Laureano-Perez, H. Alizadeh and B.E. Dale. 2005. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Biores. Technol.** 96: 2014-2018.

Vanderghem, C., P. Boquel, C. Blecker and M. Paquot. 2009. A Multistage Process to Enhance Cellobiose Production from Cellulosic Materials. **Appl Biochem Biotechnol.** 160: 2300-2307.





## 1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไม้ (วิทยา, 2541)

สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบที่เตรียมไว้มา 10 ถัง นำวัตถุดิบแต่ละชนิดมาบดไฮโดรไลซ์ให้มีขนาดเล็กลงอีกด้วยเครื่องทำผงไม้ แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh จากนั้นเก็บผงวัตถุดิบแต่ละชนิดไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงมิดชิด นำผงวัตถุดิบที่เตรียมไว้ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาค่าต่าง ๆ ได้แก่ การหาปริมาณความชื้น ปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณไฮโดรเซลลูโลส ปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส ปริมาณเพนโทแซน และปริมาณเถ้า

### 1.1 การสุ่มและการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ ตามมาตรฐาน TAPPI T257 cm-85 มาตรฐาน TAPPI T264 om-88

การร่อน นำผงวัตถุดิบร่อนผ่านตะแกรงขนาดหมายเลข 40 mesh และตะแกรงขนาดหมายเลข 60 mesh เอาผงวัตถุดิบส่วนที่ผ่านตะแกรงหมายเลข 40 mesh และค้างอยู่บนตะแกรงหมายเลข 60 mesh ไว้เพื่อการวิเคราะห์

การหาปริมาณความชื้น ในผงตัวอย่างเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากการคำนวณปริมาณของสารแทรกในผงตัวอย่างคิดเป็นร้อยละของวัตถุดิบในสภาพอบแห้ง (Dry basis)

#### วิธีการ

1. ทำความสะอาด Platinum crucible แล้วอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้ทราบแน่นอน
2. ชั่งผงตัวอย่างใส่ Platinum crucible ตัวอย่างละ  $2 \pm 0.1$  กรัม แล้วนำเข้าเตาอบ (Oven) ที่อุณหภูมิ  $100 \pm 5$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. นำออกจากเตาอบใส่ในโถดูดความชื้น เปิดดูดความชื้นชั่วขณะหนึ่งเพื่อให้อากาศอุ่นระบายออกแล้วปิดไว้เหมือนเดิม ทิ้งไว้ให้ Platinum crucible เย็น และชั่งน้ำหนัก
4. ทำซ้ำเช่นนี้อีก จนน้ำหนักตัวอย่างอบแห้งคงที่ ชั่งน้ำหนักคำนวณปริมาณความชื้นที่ได้จาก

$$\% \text{ ปริมาณความชื้น} = 100 (W1 - W2) / W2 \quad \text{--(6)}$$

$W1$  = น้ำหนักผงตัวอย่างสด (กรัม)

$W2$  = น้ำหนักผงตัวอย่างอบแห้ง (กรัม)

## 1.2 การเตรียมวัตถุดิบที่ปราศจากสารแทรก ตามมาตรฐาน TAPPI T264 om-88 และมาตรฐาน TAPPI T264 cm-97

### อุปกรณ์และสารเคมี

1. ถ้วยกรอง (Extraction thimble)
2. เครื่องมือสกัดสารแทรก (Soxhlet extraction apparatus)
3. ขวดซั้ง
4. Filtering flask
5. Buchner funnel
6. ตู้อุคควัน
7. เอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 95 โดยปริมาตร
8. เบนซีนบริสุทธิ์ ( $C_6H_6$ )
9. สารผสมเอทานอล-เบนซีน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอทานอลร้อยละ 95 กับเบนซีนเท่ากับ 1:2 โดยปริมาตร
10. ผงตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 20 กรัม โดยน้ำหนักอบแห้ง

### วิธีการ

1. ทำความสะอาดถ้วยแก้วสกัดสารแทรกและอบแห้ง ชั่งน้ำหนักให้แน่นอน
2. ชั่งผงตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักอบแห้งหนัก 20 กรัม โดยเทียบน้ำหนักอบแห้งแล้วใส่ลงในถ้วยกรองพร้อมครอบด้วยตะแกรงละเอียดรูปกรวยแก้ว บรรจุใส่ในเครื่องมือสกัดสารแทรก
3. ติดตั้งเครื่องสกัดสารแทรก สกัดด้วยสารผสมเอทานอล-เบนซีน จำนวน 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 – 8 ชั่วโมง โดยรักษาระดับการชะล้างไม่น้อยกว่าชั่วโมงละ 4 ครั้ง
4. กรองผงตัวอย่างโดยเทลงใน Buchner funnel เพื่อดูดตัวทำละลายออก ล้างถ้วยกรองและผงตัวอย่างด้วยเอทานอลเพื่อไล่เบนซีนออก
5. ใส่ผงดังกล่าวลงในถ้วยกรองอีก บรรจุใส่ในเครื่องมือสกัดสารแทรก
6. ติดตั้งเครื่องสกัดสารแทรก สกัดด้วยเอทานอล เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งเอทานอลไม่มีสี
7. ถ่ายตัวอย่างลงใน Buchner funnel เพื่อดูดตัวทำละลายออก ล้างถ้วยกรองและตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นเพื่อไล่เอทานอลออก

8. ถ่ายตัวอย่างลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่กำลังเดือด 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่พลาสติกเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในอ่างน้ำร้อน รักษาอุณหภูมิที่จุดเดือด และพลาสติกอยู่ในอ่างน้ำเดือดด้วย กรองตัวอย่างด้วย Buchner funnel และล้างด้วยน้ำกลั่นที่เดือด จำนวน 500 มิลลิลิตร ผึ่งตัวอย่างทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง

9. คลุกเคล้าตัวอย่างและเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดมิดชิด หาค่าปริมาณความชื้นของวัตถุดิบที่ปราศจากสารแทรก และนำตัวอย่างที่เตรียมได้นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

$$\% \text{ ปริมาณสารแทรก} = [(W_c - W_p) / W_p] \times 100 \quad \text{--(7)}$$

$W_c$  = น้ำหนักอบแห้งสารสกัด (กรัม)

$W_p$  = น้ำหนักอบแห้งของตัวอย่าง (กรัม)

$W_b$  = น้ำหนักอบแห้งสารที่เหลืออยู่จากการทดลองโดยไม่มีตัวอย่าง (กรัม)

### 1.3 การหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรดในวัตถุดิบและเยื่อ ตามมาตรฐาน TAPPI

T222 om-98

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องกรองลิกนินประกอบด้วย Filtering flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร และเครื่องทำสุญญากาศ
2. ถ้วยกรองเบอร์ 4 อบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักก่อนใช้
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยให้มีอุณหภูมิอยู่ที่  $20 \pm 1$  องศาเซลเซียส Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งแสดงเครื่องหมายการเติมสารละลาย สำหรับผงตัวอย่างวัตถุดิบที่ปริมาตรเท่ากับ 575 มิลลิลิตร และสำหรับผงตัวอย่างเยื่อที่ระดับปริมาตรเท่ากับ 1,540 มิลลิลิตร โดยใช้ Erlenmeyer flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร
4. Reflux condenser จะต้องสวมอยู่บน flask โดยมี Rubber stopper ยึดติดกันแน่น
5. ตู้อบ โดยให้มีอุณหภูมิอยู่ที่  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส
6. ตะเกียงเบนเซน แผ่นตะแกรง และฐานรองมีสามขา
7. Buret ขนาด 50 มิลลิลิตร
8. Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. แท่งแก้วคน

10. ตะแกรงขนาด 10 หรือ 20 mesh
11. กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ซึ่งจะเป็นสารละลายมีความเข้มข้น  $24 \pm 0.1$
12. นอร์มัล และมีความถ่วงจำเพาะ 1.6338 ที่อุณหภูมิ  $20 \pm 4$  องศาเซลเซียส เตรียมได้โดยเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น (95.5 – 96.5 %, ความถ่วงจำเพาะ 1.84) จำนวน 665 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง ทิ้งไว้ให้ของผสมเย็นลงเท่าอุณหภูมิปกติ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ของผสมมีปริมาตรทั้งหมด 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น
13. สารผสมเอทานอล-เบนซีน โดยมีอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร
14. ผงตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง จากวัตถุดิบต้องปราศจากสารแทรกจำนวน 5 กรัม โดยเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง จากเชื้อ 10 กรัม โดยเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักอบแห้ง ยกเว้นถ้าเชื้อเปียกอยู่ทำให้แห้งโดยการผึ่งในบรรยากาศ หรืออบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 10–20 mesh แต่เชื้อไม้บดจะมีขังน้ำมันอยู่มาก ต้องสกัดด้วยเอทานอล-เบนซีน แล้วล้างด้วยเอทานอล น้ำร้อน และทำให้แห้งโดยการผึ่ง

#### วิธีการ

1. ชั่งผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรก สำหรับวัตถุดิบ  $1 \pm 0.1$  กรัม สำหรับเชื้อ  $2 \pm 0.1$  กรัม โดยเทียบเป็นน้ำหนักอบแห้ง ถ่ายลงใน Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. วาง Beaker ลงในอ่างน้ำแข็งแล้วค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ที่แช่เย็น (10 – 15 องศาเซลเซียส) ไว้ในตู้เย็นลงไป 15 มิลลิลิตร พร้อมคนให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ (ด้วยแท่งแก้ว) โดยอุณหภูมิอยู่ที่  $2 \pm 1$  องศาเซลเซียส จนกระทั่งผงตัวอย่างละลายหมด
3. เมื่อผงตัวอย่างกระจายดีแล้วปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา นำมาตั้งทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $20 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมคนสารละลายอย่างสม่ำเสมอ ทุก ๆ 15 นาที จนแน่ใจว่ามีการละลายสมบูรณ์
4. เติมน้ำกลั่น 300 – 400 มิลลิลิตร ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเทสารละลายในบีกเกอร์ลงใน Erlenmeyer flask ด้วย และให้เติมน้ำกลั่นลงไปอีกเพื่อให้กรดมีความเจือจางลดลงจนเหลือความเข้มข้นร้อยละ 3 จนถึงระดับ 575 มิลลิลิตร ที่ได้ทำเครื่องหมายไว้สำหรับผงตัวอย่างวัตถุดิบ และระดับ 1,540 มิลลิลิตรที่ได้ทำเครื่องหมายไว้สำหรับผงตัวอย่างเชื้อ
5. Reflux สารละลายเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการรักษาปริมาตรสารละลายใน flask ให้คงที่
6. ปล่อยให้ตะกอนนอนก้น 1 คืน นำมากรองผ่านถ้วยกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว โดยกรองน้ำใสก่อนแล้วจึงกรองตะกอนลิกนิน

7. ล้างลิกนินให้ปราศจากกรดด้วยน้ำร้อน

8. นำถ้วยกรองที่มีลิกนินอยู่ใส่ในตู้อบอุณหภูมิ  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ โดยทิ้งไว้ในโถดูดความชื้นให้เย็นและชั่ง แล้วคำนวณหาปริมาณลิกนินเป็นร้อยละ

$$\% \text{ปริมาณลิกนิน} = 100 (W1/W2)$$

--(8)

W1 = น้ำหนักของลิกนินอบแห้ง (กรัม)

W2 = น้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

#### 1.4 การหาปริมาณไฮโดรคลอไรต์โดยวิธี Acid chlorite ของ Browing (วิทยา, 2541)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรกและทราบน้ำหนักแห้งแล้ว
2. อ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ  $70 - 80$  องศาเซลเซียส
3. กระดาษฟอยล์
4. โถดูดความชื้น
5. ขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. ถ้วยกรองเบอร์ 2
7. เครื่องปั่นลม พร้อมชุดแยกน้ำจากลม
8. กรดแอซิดิก
9. โซเดียมคลอไรด์
10. น้ำแข็ง

วิธีการ

1. ชั่งผงตัวอย่างลงในกระดาษฟอยล์ที่ปราศจากสารแทรกโดยน้ำหนักแห้ง 3 กรัม ถ่ายผงเยื่อใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นลงในขวดรูปกรวย 160 มิลลิลิตร และกรดแอซิดิกเข้มข้นจำนวน

0.5 มิลลิลิตรกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 กรัม ลงไปด้วยตามลำดับ แล้วใช้ขวดรูปกรวยขนาดเล็กคว่ำเอาทางหัวลงปิดปากขวดรูปกรวยที่ใส่ผงตัวอย่างนั้น นำไปตั้งในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 70 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลองในตู้ดูดควันพิษ มีการเขย่าเป็นระยะจะได้ก๊าซคลอรีนไฮดรอกไซด์ ( $\text{ClO}_2$ ) เกิดขึ้น และมีการทำปฏิกิริยากับลิกลินในผงตัวอย่าง

3. เมื่อครบ 1 ชั่วโมง จะต้องเติมกรดแอสติกเข้มข้นจำนวน 0.5 มิลลิลิตรกับโซเดียมคลอไรด์ 1.5 กรัมตามลำดับ ลงในขวดรูปกรวย ยังคงเขย่าขวดเป็นระยะ ทำเช่นนี้นาน 1 ชั่วโมง และให้ทำในทำนองนี้ต่อไปอีกชั่วโมงที่ 2, 3 และ 4 หรือจนกว่าผงตัวอย่างจะมีสีขาว

4. เมื่อครบกำหนดเวลา นำขวดรูปกรวยไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้ก๊าซพิษลดการฟุ้งกระจายลงเป็นเวลา  $\frac{1}{2}$  ชั่วโมง

5. กรองผงเชื้อด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2 ที่ทราบน้ำหนักแห้งละเอียดถึง 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องกรองที่มีแรงดูดจากการไหลผ่านของน้ำที่ปั๊มมาจากเครื่องปั๊มลมครบชุด ทำให้ก๊าซพิษที่ฟุ้งกระจายออกจากสารละลายจะได้ถูกดูดและละลายไปกับน้ำ

6. ล้างผงไฮโดรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมีสีขาว จึงล้างด้วยเอซีโตน และดูดออกมาให้มากที่สุด

7. นำไฮโดรเซลลูโลสไปผึ่งให้แห้งในบรรยากาศและทำให้แห้งในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักและเก็บผงตัวอย่างไว้วิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสต่อไป

8. นำถ้วยกรองพร้อมไฮโดรเซลลูโลสบางส่วนไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

9. นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไฮโดรเซลลูโลสเป็นร้อยละ

$$\% \text{ ปริมาณไฮโดรเซลลูโลส} = 100 (W1/W2) \quad \text{--(9)}$$

$W1$  = น้ำหนักอบแห้งของไฮโดรเซลลูโลส (กรัม)

$W2$  = น้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

## 1.5 การหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลสของวัตถุดิบตามมาตรฐาน TAPPI T203 om-88

อุปกรณ์สารเคมี

1. เครื่องกระจายผงตัวอย่าง

2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.2$  องศาเซลเซียส
3. นาฬิกาจับเวลา
4. บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
5. แท่งแก้วคน
6. Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร
7. บีกเกอร์ทรงสูง ขนาด 300 มิลลิลิตร
8. Filter crucible Por.2
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 87.5 กรัม ละลายในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่น จำนวน 300 มิลลิลิตร ซึ่งแช่อยู่ในอ่างน้ำแข็งทำให้มีอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อละลายสมบูรณ์แล้วถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่นและเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร
10. กรดแอสซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 10

#### วิธีการ

1. ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว จำนวน  $2 \pm 0.1$  กรัมที่เตรียมได้จากข้อ 1.4 โดยน้ำหนักอบแห้งใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 300 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 จำนวน 75 มิลลิลิตร ลงไป และปรับอุณหภูมิของสารละลายโดยนำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.2$  องศาเซลเซียส
3. คนสารละลายด้วยเครื่องกระจายจนเกิดการกระจายอย่างสมบูรณ์ โดยมีให้เกิดฟองอากาศ 5 นาที
4. ล้างเครื่องกระจายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 17.5 จำนวน 25 มิลลิลิตร
5. คนสารละลายด้วยแท่งแก้วและนำไปแช่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายจำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วคนด้วยแท่งแก้วทิ้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีก 30 นาที
7. กรองสารละลายด้วยถ้วยกรองเบอร์ 2
8. ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีความเย็น 20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเป็นกลาง
9. ล้างตะกอนต่อไปอีกด้วยกรดแอสซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยแช่อยู่นาน 5 นาที จำนวน 40 มิลลิลิตร

10. ล้างตะกอนครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ล้างนั้นไม่มีสภาพเป็นกรด
11. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น และทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างที่ นำผลมาคำนวณหาปริมาณแอลฟาเซลลูโลส

$$\% \text{ ปริมาณแอลฟาเซลลูโลส} = 100(W1/W2) \quad \text{--(10)}$$

W1 = น้ำหนักแอลฟาเซลลูโลสอบแห้ง (กรัม)

W2 = น้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

## 1.6 การหาปริมาณเพนโตแซน ตามมาตรฐาน TAPPI T23 cm-84

### อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือกลั่น ประกอบด้วย Boiling flask, Graduated separatory funnel, A Graham-type condenser, Volumetric flask และ Two and three ways connecting tubes.
2. เตาไฟฟ้าที่ปรับอุณหภูมิได้
3. อ่างน้ำแข็ง
4. เครื่อง Spectrophotometer ใช้วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และ Glass cuvettes
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 0.1$  องศาเซลเซียส
6. นาฬิกาจับเวลา
7. Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร
8. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
9. ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร
10. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 13.15 โดยน้ำหนัก ( $3.85 \pm 0.05$  นอร์มัล) นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยความถ่วงจำเพาะ 1.18 – 1.19 จำนวน 315 มิลลิลิตร ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นใน Volumetric flask จนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และตรวจสอบความเข้มข้น
11. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 นอร์มัล นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจำนวน 915 มิลลิลิตร ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นใน Volumetric flask จนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
12. Orcinol reagent โดยละลาย Orcine monohydrate ( $C_7H_8O_2 \cdot H_2O$ ) จำนวน 0.4 กรัม

กับ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 0.5 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 11 นอร์มัล แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นไม่น้อยกว่าสองอาทิตย์

13. ผลึกโซเดียมคลอไรด์
14. แอลกอฮอล์ ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95
15. โซโลส ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ )
16. น้ำแข็ง

#### วิธีการ

1. ใส่ผงตัวอย่างที่ปราศจากสารแทรกสำหรับเนื้อไม้ใบกว้าง 0.3 กรัม เนื้อไม้ใบแคบ 0.7 กรัม เชื้อไม้ฟอกจากไม้ใบกว้าง 1 กรัม จากเนื้อไม้ใบแคบ 2 กรัม หรือเชื้อฟอกจากเนื้อไม้ใบกว้าง 3 กรัม และจากเนื้อไม้ใบแคบ 5 กรัม ใน Boiling flask และใส่ผลึกโซเดียมคลอไรด์ จำนวน 20 กรัม กับสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มัล จำนวน 100 มิลลิลิตร พร้อมด้วยลูกแก้ว (Boiling stone) 2 – 3 เม็ด
2. ติดตั้ง Boiling flask เข้ากับเครื่องกลั่น และทำเครื่องหมายระดับของสารละลายกรดไว้ เติมสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มัล จำนวน 250 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก
3. ให้ความร้อนด้วยตะเกียงเบนเซนหรือเตาไฟฟ้าที่ทำให้กรดกลั่นตัวในอัตราเร็วสม่ำเสมอ นาฬิกา 2.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่กลั่นได้ซึ่งมี Furfural ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่วางอยู่ในอ่างน้ำแข็ง
4. ในระหว่างการกลั่น จะต้องรักษาระดับของสารละลายกรดใน Boiling flask ให้คงที่ โดยการหมั่นเติมสารละลายกรด HCl จากกรวยแยก หรือ เติมสารละลายกรดจากกรวยแยกทุก 10 นาที จำนวนครั้งละ 25 มิลลิลิตร กลั่นต่อไปจนครบเวลา  $90 \pm 5$  นาที จะได้ปริมาณของสารละลายที่กลั่นได้  $225 \pm 10$  มิลลิลิตร
5. ปรับระดับอุณหภูมิของสารละลายที่กลั่นได้เป็น 20 องศาเซลเซียส เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3.85 นอร์มัล ให้ครบปริมาตร 250 องศาเซลเซียสของ Volumetric flask ที่เหมาะสมไว้ก่อน และผสมให้เข้ากันโดยตลอด
6. ดูดสารละลายที่กลั่นได้ด้วย Pipet ขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Orcinol จำนวน 25 มิลลิลิตร เขย่าและวาง flask ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $60 \pm 5$  นาที
7. เติมเอทานอลให้ครบระดับที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่าและนำไปไว้ในอ่าง

ควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 1$  องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา  $60 \pm 5$  นาที

8. นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ใน Cuvettes ที่มีฝาปิดป้องกันการระเหยของกรดที่จะกัดกร่อนเครื่องมือ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

9. อ่านค่าไซโลสในตัวอย่างจากกราฟ Calibration ที่เตรียมไว้เป็นมิลลิกรัม แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเพนโตแซนเป็นร้อยละ

$$\% \text{ เพนโตแซน} = W1/10W2 \quad \text{--(11)}$$

$W1$  = น้ำหนักไซโลสในผงตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

$W2$  = น้ำหนักแห้งของผงตัวอย่าง (กรัม)

#### 10. การเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลส

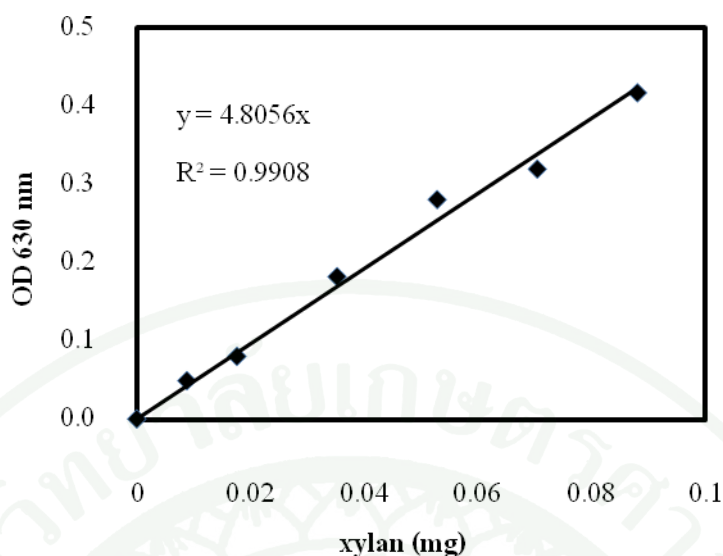
10.1 อบไซโลสให้แห้งในตู้อบสุญญากาศ (Vacuum oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งไซโลสที่อบแห้งหนัก 10, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัม จำนวนรวม 5 ชุด

10.2 ใส่ไซโลสแต่ละชุดที่เตรียมไว้ลงใน Boiling flask และดำเนินการกลั่นในทำนองเดียวกับผงตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่กลั่นได้แต่ละน้ำหนักที่ต่างกันของไซโลสที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และให้ใช้ Blank เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3.85 นอร์มัล จำนวน 5 มิลลิตร เป็นสารละลายอ้างอิง

10.3 คำนวณไซแลนในตัวอย่างเป็นมิลลิกรัมจาก

$$\text{Xylan (มิลลิกรัม)} = \text{Xylose} \times 0.88 \quad \text{--(12)}$$

10.4 เขียนกราฟระหว่างปริมาณไซโลสและค่าดูดกลืนแสง หาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นจากกราฟที่ได้เพื่อไว้คำนวณหาปริมาณเพนโตแซนในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ก1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไซโลสและค่าดูดกลืนแสง

### 1.7 การหาปริมาณเส้นใยในเนื้อไม้ โดยการเผาที่อุณหภูมิ 525 องศาเซลเซียส ตามมาตรฐาน TAPPI T211 om-93

#### อุปกรณ์และสารเคมี

1. ผงตัวอย่างอย่างน้อย 2 กรัมโดยน้ำหนักอบแห้ง
2. ถ้วยกระเบื้องซิลิกาพร้อมฝาปิด
3. เครื่องชั่ง ชั่งน้ำหนักได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม
4. เตาเผาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ  $525 \pm 25$  องศาเซลเซียส

#### วิธีการ

1. ล้างถ้วยกระเบื้องให้สะอาด นำมาอบในตู้อบอุณหภูมิ  $100 \pm 3$  องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที
2. นำถ้วยกระเบื้องมาอบอีกที่อุณหภูมิ  $525 \pm 25$  องศาเซลเซียสในเตาเผา เป็นเวลา 30-60 นาที จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม
3. ชั่งผงเชื้อที่ไม่ต้องกำจัดสารแทรก ประมาณ 1 กรัมลงในกระตังยกระดาชฟอยล์

แล้วนำไปอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 3$  องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ จึงชั่งน้ำหนักกองแห้งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

4. เพลงเยื่อใส่ถ้วยกระเบื้อง แล้วชั่งน้ำหนักกระทงกระดาษฟอยล์

5. นำถ้วยกระเบื้องพร้อมพลงเยื่อไปเผาโดยตรงด้วยเปลวไฟอ่อนจากตะเกียงเบนเซน โดยเปิดฝาแง้มไว้ แล้วใส่ในเตาเผาพร้อมนำฝาปิดออก โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 100 องศาเซลเซียส และทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น  $525 \pm 25$  องศาเซลเซียส อย่างช้า ๆ จนกระทั่งตัวอย่างเป็นเถ้าปราศจากเปลวไฟ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง

6. เมื่อครบเวลาและตัวอย่างเผาไหม้สมบูรณ์โดยปราศจากเศษเหลือที่มีสีดำแล้ว นำมาใส่โถดูดความชื้นอะลูมิเนียม ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้าให้ได้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

7. เถ้าซ้ำและชั่งซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักของเถ้าคงที่ ไม่แตกต่างกันเกิน 0.2 มิลลิกรัม แล้วนำข้อมูลมาหาปริมาณเถ้าเป็นร้อยละ

$$\% \text{ปริมาณเถ้า} = 100(W1/W2) \quad \text{--(13)}$$

$W1$  = น้ำหนักเถ้าหลังเผา (กรัม)

$W2$  = น้ำหนักแห้งของผงตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

## 2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (Ghose, 1987)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
3. กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร (ประมาณ 50 มิลลิกรัม)
4. 0.05 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 เตรียมจาก 1 โมลาร์ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 โดยชั่งกรดซิดริกโมโนไฮเดรต ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 210 กรัม ในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 50-60 กรัมจนมีค่าพีเอช 4.3 ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250

มิลลิลิตร เติมน้ำตาลละลายต่างที่ละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

6. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1.0 - 3.35 มิลลิกรัม/ 0.5 มิลลิลิตร

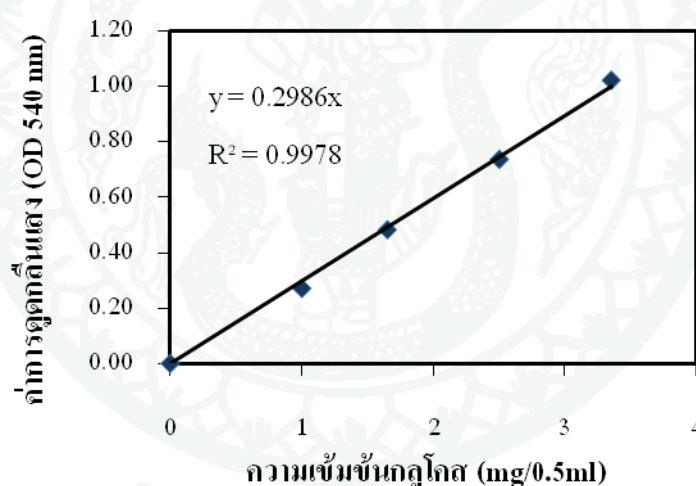
#### วิธีการ

1. ดูด 0.05 M โซเดียมซัลเฟต พีเอช 4.8 ปริมาณ 1.0 มิลลิกรัมลงในหลอดทดลอง
2. เติมน้ำเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (โดยเจือจางความเข้มข้นเอนไซม์ให้สามารถผลิตกลูโคสในช่วงมากกว่า และน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมเล็กน้อย)
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใส่แผ่นกระดาษกรอง 1 แผ่น ผสมให้สารละลายซึมเข้าในสับสเทรทอย่างทั่วถึง (อย่าให้กระดาษอยู่บนผิวหน้าของของเหลว)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
5. เติมน้ำ DNS 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. ต้มในน้ำเดือดทันทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา
7. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้จนตะกอนนอนก้นประมาณ 20 นาที แล้วนำส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
8. เตรียม Blank โดยเติมซัลเฟตบัฟเฟอร์ 1.5 มิลลิลิตร โดยไม่ใส่น้ำเอนไซม์ และกระดาษกรองและใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนข้างต้น
9. เตรียม control โดยเติมซัลเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร โดยไม่ใส่น้ำเอนไซม์ และใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนข้างต้น
10. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส ดังนี้

ตารางผนวกที่ ก1 ค่าการทำกราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลล์ูลเอส

| หลอดที่ | สารละลายกลูโคส<br>(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)<br>(มิลลิลิตร) | 0.05 M ซีเทรทบัฟเฟอร์<br>(มิลลิลิตร) | สารละลายกลูโคส<br>มาตรฐาน<br>(มิลลิกรัม/0.5 มิลลิลิตร) |
|---------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 1       | 1.0                                                       | 4.0                                  | 1.0                                                    |
| 2       | 1.0                                                       | 2.0                                  | 1.65                                                   |
| 3       | 1.0                                                       | 1.0                                  | 2.5                                                    |
| 4       | 1.0                                                       | 0.5                                  | 3.35                                                   |

11. ใส่สารละลายกลูโคสตั้งแต่ 1.0-3.35 มิลลิกรัม/ 0.5 มิลลิลิตรแทนตัวอย่างเอนไซม์ และไม่ใช่กระดาศกรอง ทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนเหมือนการวิเคราะห์ตัวอย่างเอนไซม์



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานกลูโคสเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลล์ูลเอส

การคำนวณ

- สร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสโดยใช้ความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัม/0.5 มิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- ใช้กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเป็นกลูโคส (มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยระหว่างปฏิกิริยา)

3. เปลี่ยนอัตราการเจือจางของตัวอย่างเป็นความเข้มข้นเอนไซม์  
ความเข้มข้น = 1/อัตราการเจือจาง (= ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเจือจาง/ ปริมาตรทั้งหมด)
4. คำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกลูโคสออกมา 2 มิลลิกรัมโดยใช้  
ความสัมพันธ์ของกลูโคสกับความเข้มข้นเอนไซม์ (ลอการิทึม)
5. คำนวณ FPU

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกลูโคสออกมา 2 มิลลิกรัม}} \quad (\text{FPU/ml}) \quad \text{--(14)}$$

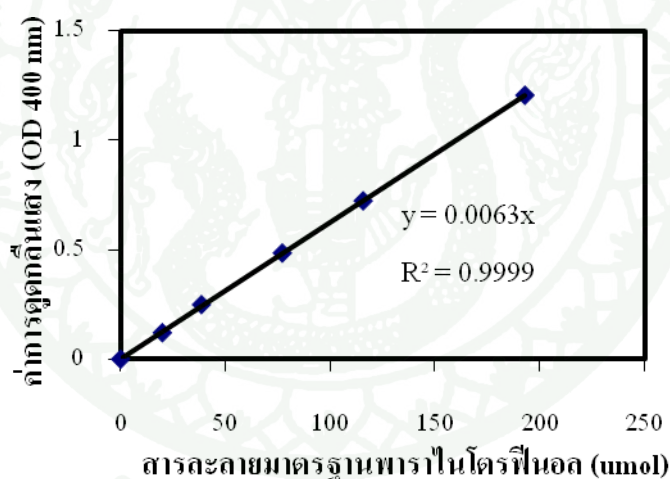
### 3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (Bergham และ Pettersson, 1974)

#### อุปกรณ์และสารเคมี

1. หลอดทดลองขนาด 13 x 78 มิลลิเมตร
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
3. โซเดียมอะซิเทรต 1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเทรตไตรไฮเดรต ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 8.204 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร
4. กรดอะซิตรีก 1 โมลาร์ เตรียมโดยดูดกรดอะซิติก 1.7 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร
5. โซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เตรียมโดยผสมโซเดียมอะซิเทรต 1 โมลาร์ กับกรดอะซิตรีก 1 โมลาร์ ค่อย ๆ ปรับพีเอชด้วยกรดอะซิตรีก 1 โมลาร์ จนมีค่า 4.8 แล้วดูดโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
6. พาราไนโตรฟีนิล เบต้า-ดี-กลูโคพาราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside; *p*NPG) 3.3 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง *p*NPG 0.09 กรัมละลายด้วยโซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยบัฟเฟอร์เป็น 100 มิลลิลิตร
7. โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 105.99 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
8. การเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราไนโตรฟีโนล (*p*-nitrophenol) 0.1927 มิลลิโมลเตรียมโดยชั่งพาราไนโตรฟีโนล 0.0268 กรัมละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางความเข้มข้นดังนี้

ตารางผนวกที่ ก2 ค่าการทำกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์  
เบต้า-กลูโคซิเดส

| สารละลาย<br>พาราไนโตรฟีนอล<br>(0.1927 มิลลิโมล) | น้ำกลั่น<br>(มิลลิลิตร) | สารละลาย<br>พาราไนโตรฟีนอลมาตรฐาน<br>(ไมโครโมล) |
|-------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| 0                                               | 5                       | 0                                               |
| 0.5                                             | 4.5                     | 19.27                                           |
| 1                                               | 4                       | 38.53                                           |
| 2                                               | 3                       | 77.07                                           |
| 3                                               | 2                       | 115.60                                          |
| 4                                               | 0                       | 192.68                                          |



ภาพผนวกที่ ก3 กราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอลเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

วิธีการ

1. ใส่พาราไนโตรฟีนอล เบต้า-ดี-กลูโคพาราไนไซด์ 3.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์เจือจาง 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง
2. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
3. เติมนิโคตินิกแอซิด 1 โมลาร์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตรและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400

นาโนเมตรของพาราไนโตรฟินอลที่ถูกปลดปล่อยออกมา

$$\text{ความเข้มข้นพาราไนโตรฟินอล} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})} \quad --(15)$$

$$\text{กิจกรรมของเบต้า-กลูโคซิเดส (IU/ml)} = \frac{(\text{ความเข้มข้นของพาราไนโตรฟินอล})}{10 \times 0.1 \times 1000} \quad --(16)$$

กิจกรรมของเบต้า-กลูโคซิเดส คือ ปริมาณ PNP (p-nitrophenol) ที่ถูกปลดปล่อยออกมา 1 ไมโครโมล/นาที่ภายใต้สภาวะที่กำหนด

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

##### 4.1 การเตรียมสารเคมี

##### 4.1.1 สารละลายมาตรฐานกลูโคส และเซลโลไบโอส

เตรียมโดยชั่งกลูโคสและเซลโลไบโอส ที่อบแห้งแล้วอย่างละ 0.2 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร กรองสารละลายมาตรฐานที่ได้ผ่านกระดาษกรอง (cellulose nitrate filter, Sartorius) เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.2 ไมครอน จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนที่กรองผ่านกระดาษกรอง (cellulose acetate filter, Sartorius) ขนาดรู 0.45 ไมครอน แล้วให้ได้ความเข้มข้นกลูโคสและเซลโลไบโอส เป็น 20, 10, 5, 1.25, 0.15625 และ 0.078125 กรัม/ลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าความชันของกราฟเส้นตรงสำหรับใช้คำนวณหาความเข้มข้นกลูโคสดังกล่าว

##### 4.1.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)

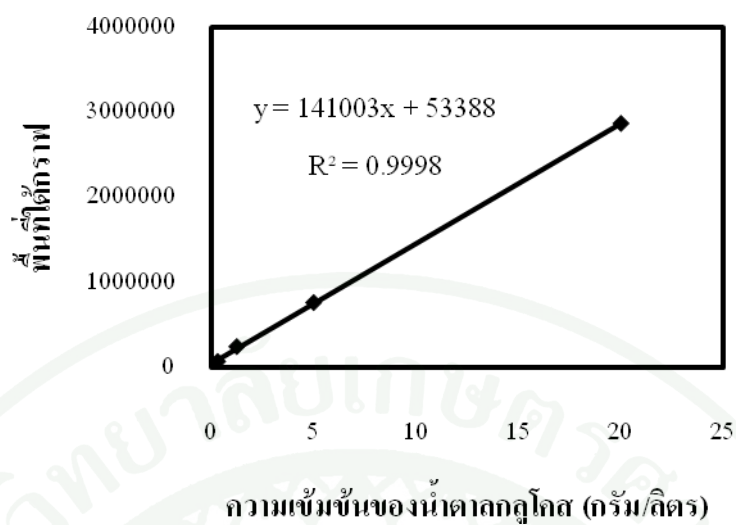
น้ำปราศจากไอออน กรองผ่านกระดาษกรอง (PTFE filter, Sartorius) เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมครอน

## 4.2 วิธีการ

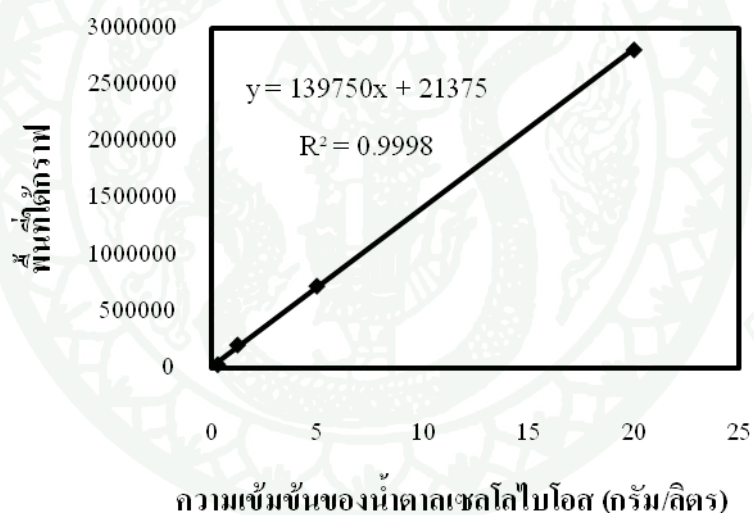
วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ใช้คอลัมน์ชนิด AMINEX HPX-87P ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างโดยใช้ดีเทกเตอร์ชนิด Refraction Index (RI detector) และควบคุมการทำงานของเครื่องโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ ที่ต่อพ่วงกับเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้วิเคราะห์มีดังนี้ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ น้ำปราศจากไอออน ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตร/นาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร การฉีดสารละลายมาตรฐานหรือตัวอย่างเป็น 60 -100 ไมโครลิตร และระยะเวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง (run time) เท่ากับ 50 นาที

วิเคราะห์ตัวอย่าง แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม นำพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารแต่ละชนิดในตัวอย่างจากการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกหน่วง (Retention time) กับสารมาตรฐาน มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารในตัวอย่างโดยอาศัยสมการค่าความเป็นเส้นตรงของกราฟ (linearity) มาตรฐานของกลูโคสและเซลโลไบโอส ดังภาพผนวกที่ ก4 และ ก5 ตามลำดับ



ภาพผนวกที่ ก4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC



ภาพผนวกที่ ก5 กราฟมาตรฐานน้ำตาลเซลโลไบโอส ที่ได้ภายหลังจากฉีด HPLC



## 1. การคำนวณค่า severity factor (logRo)

$$\log Ro = \log \{t \exp [(T-100)/14.75] \} \quad --(17)$$

เมื่อ  $t$  คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการระเบิด (นาทีก)  
 $T$  คือ อุณหภูมิของไอน้ำ (องศาเซลเซียส)

## 2. การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทาคุชิ (Roy, 2001)

### 1.1 อัตราส่วน S/N

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log (\text{MSD}) \quad --(18)$$

### 1.2 ค่ากลางเบี่ยงเบนมาตรฐาน (MSD)

Bigger is better ;  $\text{MSD} = (\sum (1 / y)^2) / N \quad --(19)$

Smaller is better;  $\text{MSD} = (\sum (y)^2) / N \quad --(20)$

Nominal is bestter ;  $\text{MSD} = (\sum (y - y_0)^2) / N \quad --(21)$

หมายเหตุ  $y$ ,  $y_0$  และ  $N$  หมายถึง ผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และจำนวนการทดลองตามลำดับ

### 1.3 เปอร์เซ็นอิทธิพลหลัก (% main effect)

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพลหลัก} = \left( \frac{\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด}}{\text{ค่าอิทธิพลหลักรวม}} \right) \times 100 \quad --(22)$$

1.4 ค่า Factor sum of square ( $SS_{\text{Factor}}$ )

$$SS_{\text{Factor}} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^L (\bar{y}_k - \bar{y})^2$$

--(23)

1.5 ค่า Error sum of square ( $SS_{\text{Error}}$ )

$$SS_{\text{Error}} = \sum (SD)^2 \times (r-1)$$

--(24)

1.6 ค่าองศาอิสระของปัจจัย ( $DOF_{\text{Factor}}$ )

$$DOF_{\text{Factor}} = L-1$$

--(25)

1.7 ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด ( $DOF_{\text{Error}}$ )

$$DOF_{\text{Error}} = N(r-1)$$

--(26)

1.8 ค่าองศาอิสระรวม ( $DOF_{\text{Total}}$ )

$$DOF_{\text{Total}} = (N \times r) - 1$$

--(27)

1.9 ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$Var = \frac{SS}{DOF}$$

--(28)

1.10 ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, Fratio)

$$F_{\text{ratio}} = \frac{Var}{Var_{\text{Error}}}$$

--(29)

### 1.11 ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$\text{Confidence} = 100 - F_{\text{DIST}}(F_{\text{ratio}}, \text{DOF}_{\text{Factor}}, \text{DOF}_{\text{Error}}) \times 100 \quad \text{--(30)}$$

### 1.12 การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (result expected at optimum condition, $Y_{\text{opt}}$ )

$$Y_{\text{opt}} = \bar{T} + (\bar{A}_2 \cdot \bar{T}) + (\bar{B}_2 \cdot \bar{T}) + (\bar{C}_3 \cdot \bar{T}) + (\bar{D}_3 \cdot \bar{T}) \quad \text{--(31)}$$

$\bar{T}$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด

$\bar{A}_2$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย A ระดับที่สอง (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย A)

$\bar{B}_2$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย B ระดับที่สอง (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย B)

$\bar{C}_3$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย C ระดับที่สาม (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย C)

$\bar{D}_3$  คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย D ระดับที่สาม (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย D)

หมายเหตุ FDIST เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปในโปรแกรม excel โดยเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่า Fratio, DOFFactor, DOFError โดย y, y , N, r, L, k และ T หมายถึง ผลการทดลอง ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของปัจจัย ระดับของปัจจัย และค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองทั้งหมด ตามลำดับ และ  $A_2$  ,  $B_2$  ,  $C_3$  และ  $D_3$  , หมายถึง ค่าเฉลี่ยของผลรวมของผลการทดลองของแต่ละระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่ได้

3. การคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้น้ำตาลกลูโคส, เซลโลไบโอส และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง  
เซลลูโลส (Vanderghem *et al.*, 2009)

$$\text{ผลได้กลูโคส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคสที่ถูกปล่อยออกมา(กรัม/กรัม)} \times 0.9}{\text{ปริมาณเซลลูโลสในวัตถุดิบเริ่มต้น(กรัม/กรัม)}} \times 100 \quad --(32)$$

$$\text{ผลได้เซลโลไบโอส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณเซลโลไบโอสที่ถูกปล่อยออกมา(กรัม/กรัม)} \times 0.95}{\text{ปริมาณเซลลูโลสในวัตถุดิบเริ่มต้น(กรัม/กรัม)}} \times 100 \quad --(33)$$

$$\text{สัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเซลลูโลส (\%CCR)} = \text{เปอร์เซ็นต์ผลได้กลูโคส} - \text{เปอร์เซ็นต์ผลได้เซลโลไบโอส} \quad --(34)$$



**Cellulose WE; Eucalyptus**

## Class Level Information

| Class | Levels | Values      |
|-------|--------|-------------|
| a     | 6      | 1 2 3 4 5 6 |

Number of observations 18

Dependent Variable: cellulose

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 5  | 177.7653333    | 35.5530667  | 21.37   | <.0001 |
| Error           | 12 | 19.9598667     | 1.6633222   |         |        |
| Corrected Total | 17 | 197.7252000    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | alpha Mean |
|----------|-----------|----------|------------|
| 0.899052 | 2.550828  | 1.289699 | 50.56000   |

| Source | DF | Anova SS    | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| a      | 5  | 177.7653333 | 35.5530667  | 21.37   | <.0001 |

## t Tests (LSD) for cellulose

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Alpha                        | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom     | 12       |
| Error Mean Square            | 1.663322 |
| Critical Value of t          | 2.17881  |
| Least Significant Difference | 2.2944   |

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ค1 ผลลัพธ์ ANOVA ของเซลลูโลส ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ  
โดย SAS

| t Grouping | Mean   | N | a |
|------------|--------|---|---|
| A          | 53.940 | 3 | 5 |
| A          | 53.273 | 3 | 6 |
| A          | 53.087 | 3 | 2 |
| B          | 49.073 | 3 | 4 |
| B          | 48.787 | 3 | 3 |
| C          | 45.200 | 3 | 1 |

ภาพผนวกที่ ค1 (ต่อ)

| <u>Hemicellulose WE; Eucalyptus</u> |           |             |             |         |        |     |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|--------|-----|
| Class Level Information             |           |             |             |         |        |     |
| Class                               | Levels    | Values      |             |         |        |     |
| a                                   | 6         | 1           | 2           | 3       | 4      | 5 6 |
| Number of Observations Read         |           |             |             |         | 18     |     |
| Number of Observations Used         |           |             |             |         | 18     |     |
| Dependent Variable: hemicellulose   |           |             |             |         |        |     |
| Sum of                              |           |             |             |         |        |     |
| Source                              | DF        | Squares     | Mean Square | F Value | Pr > F |     |
| Model                               | 5         | 412.0804278 | 82.4160856  | 30.08   | <.0001 |     |
| Error                               | 12        | 32.8774000  | 2.7397833   |         |        |     |
| Corrected Total                     | 17        | 444.9578278 |             |         |        |     |
|                                     |           |             |             |         |        |     |
| R-Square                            | Coeff Var | Root MSE    | alpha Mean  |         |        |     |
| 0.926111                            | 20.00545  | 1.655229    | 8.273889    |         |        |     |

ภาพผนวกที่ ค2 ผลลัพธ์ ANOVA ของเฮมิเซลลูโลส ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS

| Source | DF | Anova SS    | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| a      | 5  | 412.0804278 | 82.4160856  | 30.08   | <.0001 |

t Tests (LSD) for hemicellulose

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Alpha                        | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom     | 12       |
| Error Mean Square            | 2.739783 |
| Critical Value of t          | 2.17881  |
| Least Significant Difference | 2.9446   |

Means with the same letter are not significantly different.

| t Grouping | Mean   | N | a |
|------------|--------|---|---|
| A          | 17.313 | 3 | 1 |
| B          | 9.600  | 3 | 3 |
| B          | 8.670  | 3 | 2 |
| B          | 7.807  | 3 | 4 |
| C          | 3.640  | 3 | 5 |
| C          | 2.613  | 3 | 6 |

ภาพผนวกที่ ค2 (ต่อ)

**Lignin WE; Eucalyptus**

## Class Level Information

|       |        |             |
|-------|--------|-------------|
| Class | Levels | Values      |
| trt   | 6      | a b c d e f |

Number of observations 18

Dependent Variable: lignin

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 5  | 62.80451111    | 12.56090222 | 21.49   | <.0001 |
| Error           | 12 | 7.01313333     | 0.58442778  |         |        |
| Corrected Total | 17 | 69.81764444    |             |         |        |

|          |           |          |          |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | y Mean   |
| 0.899551 | 2.406712  | 0.764479 | 31.76444 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| trt    | 5  | 62.80451111 | 12.56090222 | 21.49   | <.0001 |

## Duncan's Multiple Range Test for lignin

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Alpha                    | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom | 12       |
| Error Mean Square        | 0.584428 |

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ค3 ผลลัพธ์ ANOVA ของลิกนิน ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ  
โดย SAS

| Duncan Grouping | Mean    | N | trt |
|-----------------|---------|---|-----|
| A               | 33.3467 | 3 | f   |
| A               | 33.1567 | 3 | e   |
| A               | 32.7933 | 3 | d   |
| B A             | 32.2700 | 3 | b   |
| B               | 31.0933 | 3 | c   |
| C               | 27.9267 | 3 | a   |

ภาพผนวกที่ ค3 (ต่อ)

| <u>Ash WE; Eucalyptus</u>                        |        |            |             |          |        |
|--------------------------------------------------|--------|------------|-------------|----------|--------|
| Class Level Information                          |        |            |             |          |        |
| Class                                            | Levels | Values     |             |          |        |
| trt                                              | 6      | a          | b           | c        | d e f  |
| Number of observations                           |        | 18         |             |          |        |
| Dependent Variable: ash                          |        |            |             |          |        |
| Sum of                                           |        |            |             |          |        |
| Source                                           | DF     | Squares    | Mean Square | F Value  | Pr > F |
| Model                                            | 5      | 0.00751667 | 0.00150333  | 0.41     | 0.8299 |
| Error                                            | 12     | 0.04353333 | 0.00362778  |          |        |
| Corrected Total                                  | 17     | 0.05105000 |             |          |        |
| R-Square Coeff Var Root MSE y Mean               |        |            |             |          |        |
| 0.147241                                         |        | 30.88771   | 0.060231    | 0.195000 |        |
| Source DF Type III SS Mean Square F Value Pr > F |        |            |             |          |        |
| trt                                              | 5      | 0.00751667 | 0.00150333  | 0.41     | 0.8299 |

ภาพผนวกที่ ค4 ผลลัพธ์ ANOVA ของเจ้า ยูคาลิปตัสหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS

## Duncan's Multiple Range Test for ash

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Alpha                    | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom | 12       |
| Error Mean Square        | 0.003628 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean    | N | trt |
|-----------------|---------|---|-----|
| A               | 0.22333 | 3 | b   |
| A               | 0.21333 | 3 | d   |
| A               | 0.19667 | 3 | a   |
| A               | 0.19333 | 3 | c   |
| A               | 0.18333 | 3 | f   |
| A               | 0.16000 | 3 | e   |

ภาพผนวกที่ ค4 (ต่อ)

**Cellulose WE; Acacia**

## Class Level Information

|                        |        |             |
|------------------------|--------|-------------|
| Class                  | Levels | Values      |
| trt                    | 6      | a b c d e f |
| Number of observations |        | 18          |

Dependent Variable: cellulose

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 5  | 70.5335778     | 14.1067156  | 0.82    | 0.5599 |
| Error           | 12 | 207.0762000    | 17.2563500  |         |        |
| Corrected Total | 17 | 277.6097778    |             |         |        |

|          |           |          |          |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | y Mean   |
| 0.254075 | 11.20637  | 4.154076 | 37.06889 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| trt    | 5  | 70.53357778 | 14.10671556 | 0.82    | 0.5599 |

## Duncan's Multiple Range Test for cellulose

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Alpha                    | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom | 12       |
| Error Mean Square        | 17.25635 |

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ค5 ผลลัพธ์ ANOVA ของเซลลูโลส กระดาษเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ  
โดย SAS

| Duncan Grouping | Mean   | N | trt |
|-----------------|--------|---|-----|
| A               | 40.033 | 3 | b   |
| A               | 38.430 | 3 | a   |
| A               | 38.287 | 3 | d   |
| A               | 36.080 | 3 | c   |
| A               | 34.930 | 3 | f   |
| A               | 34.653 | 3 | e   |

ภาพผนวกที่ ค5 (ต่อ)

| <u>Hemicellulose WE; Acacia</u>   |        |             |             |         |        |
|-----------------------------------|--------|-------------|-------------|---------|--------|
| Class Level Information           |        |             |             |         |        |
| Class                             | Levels | Values      |             |         |        |
| trt                               | 6      | a           | b           | c       | d e f  |
| Number of observations            |        | 18          |             |         |        |
| Dependent Variable: hemicellulose |        |             |             |         |        |
| Sum of                            |        |             |             |         |        |
| Source                            | DF     | Squares     | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Model                             | 5      | 84.6994278  | 16.9398856  | 8.31    | 0.0013 |
| Error                             | 12     | 24.4474000  | 2.0372833   |         |        |
| Corrected Total                   | 17     | 109.1468278 |             |         |        |
| R-Square                          |        |             |             |         |        |
| Coeff Var                         |        |             |             |         |        |
| Root MSE                          |        |             |             |         |        |
| y Mean                            |        |             |             |         |        |
| 0.776014                          |        |             |             |         |        |
| 20.03589                          |        |             |             |         |        |
| 1.427334                          |        |             |             |         |        |
| 7.123889                          |        |             |             |         |        |

ภาพผนวกที่ ค6 ผลลัพธ์ ANOVA ของเฮมิเซลลูโลส ไม้กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ โดย SAS

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| trt    | 5  | 84.69942778 | 16.93988556 | 8.31    | 0.0013 |

Duncan's Multiple Range Test for hemicellulose

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Alpha                    | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom | 12       |
| Error Mean Square        | 2.037283 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean   | N | trt |
|-----------------|--------|---|-----|
| A               | 11.093 | 3 | a   |
| B               | 8.400  | 3 | c   |
| C B             | 6.950  | 3 | d   |
| C B             | 6.283  | 3 | b   |
| C B             | 5.770  | 3 | e   |
| C               | 4.247  | 3 | f   |

ภาพผนวกที่ ค6 (ต่อ)

**Lignin WE; Acacia**

## Class Level Information

| Class | Levels | Values      |
|-------|--------|-------------|
| trt   | 6      | a b c d e f |

Number of observations 18

Dependent Variable: lignin

| Source          | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model           | 5  | 30.5851778     | 6.1170356   | 0.79    | 0.5748 |
| Error           | 12 | 92.5691333     | 7.7140944   |         |        |
| Corrected Total | 17 | 123.1543111    |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | y Mean   |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.248348 | 11.28016  | 2.777426 | 24.62222 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| trt    | 5  | 30.58517778 | 6.11703556  | 0.79    | 0.5748 |

## Duncan's Multiple Range Test for lignin

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Alpha                    | 0.05     |
| Error Degrees of Freedom | 12       |
| Error Mean Square        | 7.714094 |

Means with the same letter are not significantly different.

ภาพผนวกที่ ๗ ผลลัพธ์ ANOVA ของลิกนิน กระดาษเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ  
โดย SAS

| Duncan Grouping | Mean   | N | trt |
|-----------------|--------|---|-----|
| A               | 26.587 | 3 | b   |
| A               | 25.813 | 3 | d   |
| A               | 24.937 | 3 | f   |
| A               | 24.193 | 3 | a   |
| A               | 23.173 | 3 | e   |
| A               | 23.030 | 3 | c   |

ภาพผนวกที่ ค7 (ต่อ)

Ash WE; Acacia

Class Level Information

| Class | Levels | Values      |
|-------|--------|-------------|
| trt   | 6      | a b c d e f |

Number of observations 18

Dependent Variable: ash

|                 |    | Sum of     |             |         |        |
|-----------------|----|------------|-------------|---------|--------|
| Source          | DF | Squares    | Mean Square | F Value | Pr > F |
| Model           | 5  | 0.02971111 | 0.00594222  | 0.79    | 0.5785 |
| Error           | 12 | 0.09060000 | 0.00755000  |         |        |
| Corrected Total | 17 | 0.12031111 |             |         |        |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | y Mean   |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.246952 | 23.98824  | 0.086891 | 0.362222 |

ภาพผนวกที่ ค8 ผลลัพธ์ ANOVA ของถ้ำไม้กระถินเทพาหลังระเบิดไอน้ำ และสกัดด้วยน้ำ  
โดย SAS

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|--------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| trt    | 5  | 0.02971111  | 0.00594222  | 0.79    | 0.5785 |

Duncan's Multiple Range Test for ash

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Alpha                    | 0.05    |
| Error Degrees of Freedom | 12      |
| Error Mean Square        | 0.00755 |

Means with the same letter are not significantly different.

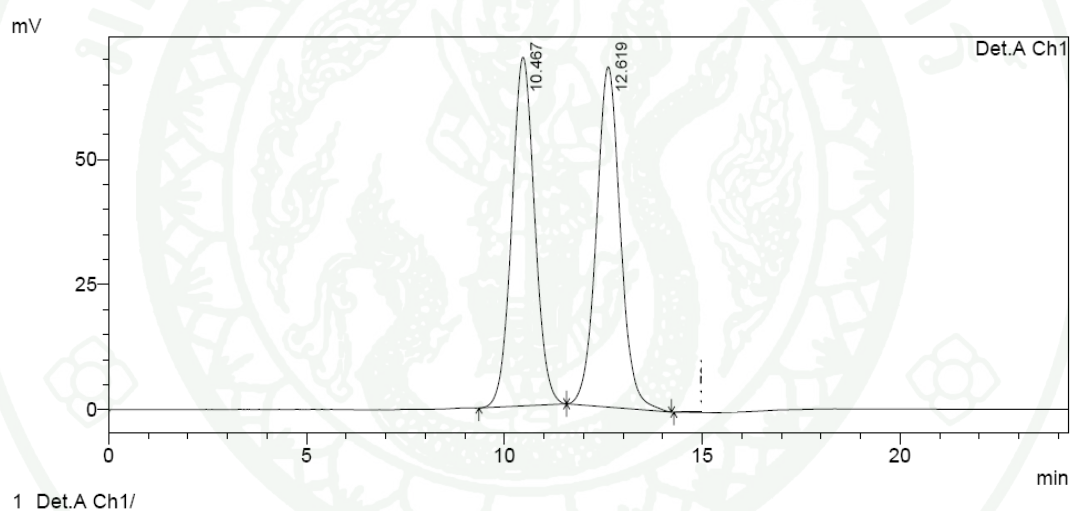
| Duncan Grouping | Mean    | N | trt |
|-----------------|---------|---|-----|
| A               | 0.41333 | 3 | a   |
| A               | 0.40333 | 3 | f   |
| A               | 0.38667 | 3 | e   |
| A               | 0.34000 | 3 | d   |
| A               | 0.32000 | 3 | b   |
| A               | 0.31000 | 3 | c   |

ภาพผนวกที่ ค8 (ต่อ)

**ตารางผนวกที่ ค1** ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัม/ลิตร) พื้นที่ใต้กราฟ และแสดงเวลาที่ใช้ในการแยกสาร (นาที) วิเคราะห์โดย HPLC

| ความเข้มข้น<br>น้ำตาล (กรัม/ลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟ<br>น้ำตาลกลูโคส | เวลา<br>(นาที) | พื้นที่ใต้กราฟ<br>น้ำตาลเซลโลไบโอส | เวลา<br>(นาที) |
|-----------------------------------|--------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| 20.000                            | 2870790                        | 12.619         | 2812728                            | 10.467         |
| 5.000                             | 765835                         | 12.614         | 731991                             | 10.462         |
| 1.250                             | 248440                         | 12.625         | 213130                             | 10.472         |
| 0.3125                            | 73888                          | 12.616         | 39750                              | 10.458         |

**<Chromatogram>**



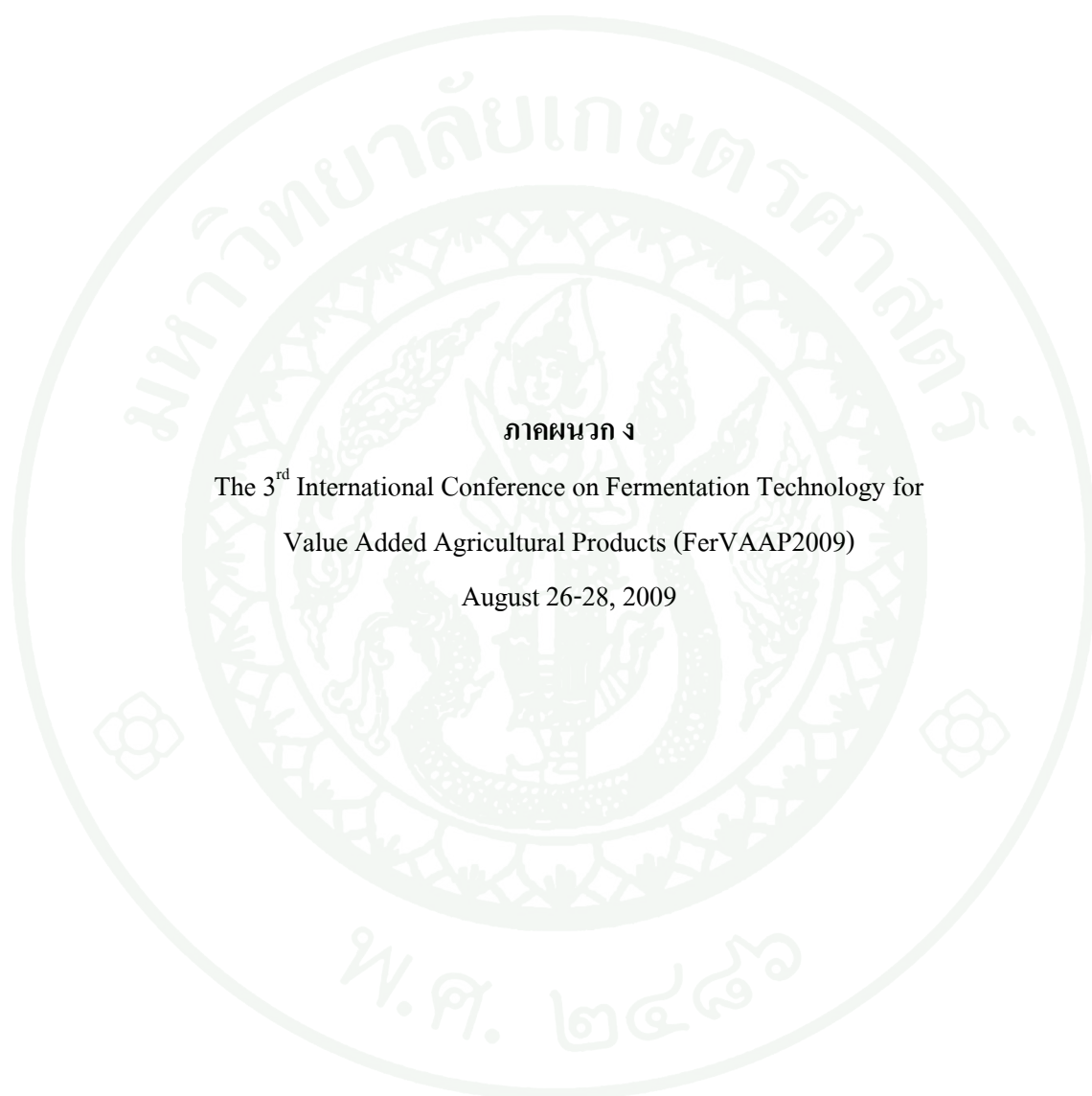
**ภาพผนวกที่ ค9** โครมาโตแกรม HPLC ของน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสที่ความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร

ตารางผนวกที่ ค2 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส (กรัม/ลิตร) ที่เวลาต่าง ๆ  
วิเคราะห์โดย HPLC

| ชีว-<br>มวล | ความเข้มข้นกลูโคส (กรัม/ลิตร) |         |         |         | ความเข้มข้นเซลโลไบโอส (กรัม/ลิตร) |         |         |         |
|-------------|-------------------------------|---------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|---------|
|             | ชั่วโมง                       | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง                           | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง |
|             | 0                             | 24      | 48      | 72      | 0                                 | 24      | 48      | 72      |
| RE          | 0.3932                        | 0.2766  | 0.0997  | 0.4631  | 0.0000                            | 0.0000  | 0.0000  | 0.0000  |
| SE          | 0.0000                        | 16.7870 | 17.9112 | 15.9077 | 1.7233                            | 0.2245  | 0.0000  | 0.0000  |
| AE          | 3.2078                        | 25.7726 | 27.7763 | 29.4692 | 1.9285                            | 13.7793 | 13.7943 | 12.4388 |
| RA          | 0.0000                        | 1.1291  | 1.6279  | 2.1309  | 0.1817                            | 0.0000  | 0.0000  | 0.0000  |
| SA          | 0.0000                        | 1.6229  | 1.6353  | 1.6897  | 0.0000                            | 0.0000  | 0.0000  | 0.0000  |
| AA          | 2.4595                        | 2.5533  | 2.5373  | 3.6560  | 0.0000                            | 1.5918  | 1.6023  | 1.6208  |

ตารางผนวกที่ ค3 เปอร์เซ็นต์ผลได้ของน้ำตาลกลูโคส และเซลโลไบโอส เมื่อชีวมวลลักษณะต่างๆ  
ผ่านการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

| ชีวมวล | เปอร์เซ็นต์ผลได้กลูโคส |         |         |         | เปอร์เซ็นต์ผลได้เซลโลไบโอส |         |         |         |
|--------|------------------------|---------|---------|---------|----------------------------|---------|---------|---------|
|        | ชั่วโมง                | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง                    | ชั่วโมง | ชั่วโมง | ชั่วโมง |
|        | 0                      | 24      | 48      | 72      | 0                          | 24      | 48      | 72      |
| RE     | 0.81                   | 0.57    | 0.21    | 0.95    | 0.00                       | 0.00    | 0.00    | 0.00    |
| SE     | 0.00                   | 28.01   | 29.89   | 26.54   | 3.04                       | 0.40    | 0.00    | 0.00    |
| AE     | 3.76                   | 30.19   | 32.53   | 34.52   | 2.38                       | 17.04   | 17.05   | 15.38   |
| RA     | 0.00                   | 2.19    | 3.15    | 4.13    | 0.37                       | 0.00    | 0.00    | 0.00    |
| SA     | 0.00                   | 2.86    | 2.88    | 2.98    | 0.00                       | 0.00    | 0.00    | 0.00    |
| AA     | 3.60                   | 3.74    | 3.72    | 5.35    | 0.00                       | 2.46    | 2.48    | 2.51    |



ภาคผนวก ง

The 3<sup>rd</sup> International Conference on Fermentation Technology for  
Value Added Agricultural Products (FerVAAP2009)

August 26-28, 2009

## Effect of Steam Explosion on Chemical Compositions of Biomass from Eucalyptus and Acacia

Nichchima Supantamart<sup>1,2</sup>, Nikhom Laemsak<sup>3</sup>, Sarote Sirisansaneeyakul<sup>2</sup>,  
Wirat Vanichsriratana<sup>2</sup> and Pramuk Parakulsuksatid<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Graduate School, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup> Department of Wood Technology, 10900, Thailand

### Abstract

Eucalyptus and Acacia chip have been pretreated by steam explosion under different experimental conditions of temperature between 200 and 210°C and operating time from 2-6 minutes. The explosion chips were then washed with hot water. The effects of steam explosion conditions have been assessed by measuring chemical compositions (cellulose, hemicelluloses and lignin) in solid. Steam explosion pretreatment removes the major part of the hemicelluloses, and makes the high ratio cellulose in the solid material for further enzyme hydrolysis. At log(Ro) 3.84 (210°C, 4 min), the Eucalyptus fibers contained the significant lowest hemicelluloses and the highest of celluloses at 3.64 %DW and 53.94 %DW, respectively. The Acacia fiber at log(Ro) 3.54 (210°C, 2 min) contained the significant lowest hemicelluloses and high celluloses at 8.00 %DW and 51.05 %DW, respectively. Their pretreatment efficiencies of hemicelluloses removal were 81.38 % and 56.24 %, respectively. Since Acacia chips have higher lignin content than Eucalyptus chips, lignin structure might be factoring that resistant hemicelluloses degradation by steam explosion pretreatment. Therefore, steam explosion of lignocellulosic materials to remove hemicelluloses might significantly enhance the efficiency of cellulose hydrolysis.

**Key Words:** *Eucalyptus, Acacia, Steam explosion, Chemical compositions, enzyme hydrolysis*

### Introduction

The most widely used biofuel at present is anhydrous ethanol. Most of the ethanol currently produced is by fermentation of the sugar and starch contents of agricultural raw materials. Current research and development is being directed at the substitution of low cost lignocellulosic biomass for the higher-cost sugar and starch feedstocks as a way of reducing the cost of ethanol. Cellulose, hemicellulose and lignin are major structure of lignocellulosic biomass (Schultz *et al.* 1983 p.344). Hemicelluloses and lignin, make the access of cellulase enzymes to cellulose difficult because complex structure of hemicelluloses and lignin prevented, thus reducing the efficiency of the enzymatic hydrolysis (Mussatto *et al.* 2008, p.124 – 125). The efficient bioconversion of lignocellulosic biomass to ethanol required for some form of pretreatment. Pretreatment enables more efficient enzymatic hydrolysis of the

cellulose by removal of the surrounding hemicellulose and/or lignin along with modification of the cellulose microfibril structure (Knauf & Moniruzzaman 2004, pp. 148). Pretreatment has several methods such as physical (mechanical), physico-chemical, chemical and biological pretreatment.

One of the most promising pretreatments appears to be steam explosion that is physico-chemical pretreatment (Spalt 1977, p.193). This process was originally developed by Mason in 1925 and has been extensively used in the manufacture of hardboard (Spalt 1977, p.193). Steam explosion is the most commonly used method for pretreatment of lignocellulosic materials (McMillan 1994, p. 3). The advantages of steam explosion pretreatment include the low energy requirement compared to mechanical comminution and no recycling or environmental costs. (Sun & Cheng 2002, p.3). Steam explosion is recognized as one of the most cost effective pretreatment processes for hardwoods and agricultural residues, but it is less effective for softwoods (Clark & Mackie 1987, p. 3).

In this method, chipped biomass is treated with high-pressure saturated steam and then the pressure is rapidly reduced, which makes the materials undergo an explosive decompression. Steam explosion is typically initiated at a temperature of 160 - 260 °C (corresponding pressure 0.69 - 4.83 MPa) for several seconds to a few minutes before the material is exposed to atmospheric pressure. The steam explosion also results in substantial breakdown of the lignocellulosic structure, hydrolysis of the hemicellulosic fraction, depolymerization of the lignin components and defibration (Cara *et al.* 2006, p. 424). The aim of this work was to determine the optimum conditions for steam explosion pretreatment of Eucalyptus and Acacia chips to prepare the exploded fibers for enzymatic hydrolysis.

## **Materials and Methods**

### **Raw Material**

Eucalyptus (*Eucalyptus spp.*) and Acacia (*Acacia mangium* Willd.) wood were obtained from North-eastern Silvicultural Research, Wangnamkheo, Nakorn Ratchasima, Thailand. Biomass was coarsely chopped by a laboratory hammer mill (Retsch, GmbH 5657 HAAN, Germany), thoroughly mixed and stored at room temperature until used. Moisture content of the Eucalyptus and Acacia chips were 10.55 and 10.62 %, respectively.

### **Steam explosion pretreatment**

The steam-explosion treatments were carried out in 2 - L pilot scale steam explosion unit (Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute (KAPI), Kasetsart University, Thailand). All experiments were carried out using 200 g dry weight of both biomasses. Heating was accomplished by direct steam injection into the digester. Explosive discharge of the digester contents into a collecting tank was actuated by rapidly opening a valve. The biomass was steamed for different times and temperatures. The experimental conditions used in the present study for the biomass chips were between 200 and 210 °C and 2-6 minutes, corresponding to values of  $\log R_0$  3.24 - 4.02, (Table 1). In addition, the severity of the treatment was designated by a single factor, termed  $R_0$  (Heitz *et al.*, 1991, p. 24) which associates the effect of residence time ( $t$ , min) and temperature of reaction ( $T$ ,

°C):  $R_0 = t e^{(T-100/14.75)}$ . The log value of the reaction ordinate gives the severity factor that is used to map the effects of steam explosion pretreatment on biomass.

$$\text{Severity factor} = \log(R_0) \quad \text{-- (1)}$$

The steam explosion fibers (SEF) were packed into a plastic bag and stored in a cold room. After taking out from the cold room, the solids content of each fibers sample was determined. Based on the solids content, 100 g dry weight of SEF was put into a 2 L beaker. Then, water was added to bring the total solid: liquid ratio to 1: 8 and the mixture was stirred with a stirring rod. The mixture was heated to 80 °C and maintained for 30 minutes. The fibers were filtered, dried at room temperature for analysis of chemical compositions.

### **Chemical compositions analysis**

The chemical composition of raw material (% dry weight) was determined using the *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (TAPPI) for biomass analysis. First, the biomass sample chipped was extracted with ethanol–benzene, according to TAPPI, T264 om-97. Then, the chemical analyses in the residue after the extraction were conducted. The acid insoluble lignin (known as “Klason lignin”) was determined, extracting the residue in a sulfuric acid of 72% by TAPPI T-222. The holocellulose was determined according to acid chlorite method of Browning (Browning & Bubnitz 1983). The pentosan content was determined by TAPPI T223 om-84. The alpha-cellulose was determined by TAPPI T-203 om-93 and the ash was determined by TAPPI T211 om-85.

## **Results & Discussion**

### **Raw material composition**

Wood chips of both Eucalyptus and Acacia were initially characterized with regard to their chemical compositions (Table 2). Although both the hardwood species had similar extractives and ash contents, their hemicellulose contents were slightly different, with Eucalyptus having a lower cellulose and lignin content than Acacia.

### **Composition of steam exploded Eucalyptus fibers**

The chemical compositions of Eucalyptus fibers were summarized in Tables 3. The hemicellulose content in the fiber after steam explosion from all samples decreased with the increase in severity factor. At the log(Ro) 3.84 and 4.02, The Eucalyptus fibers had a lowest hemicellulose content ( $p < 0.05$ ) and these fibers had similar highest cellulose content. However, the optimum condition of steam explosion was log(Ro) 3.84 because the energy consumption at log(Ro) 3.84 was less than that at log(Ro) 4.02.

The efficiencies of hemicelluloses removal of steam exploded Eucalyptus fibers at the severity factor (log(Ro) 3.84) were shown in Table 4. All steps of pretreatment, the efficiencies of hemicelluloses removal increased from 0.00 % to 81.38 %. Most of hemicelluloses were hydrolyzed into sugars and some metabolites such as furfural, HMF and acetic acid, which might have coated around fiber skin. In water extraction step, these sugars and metabolites would have been washed.

### **Composition of steam exploded Acacia fibers**

The chemical compositions of Acacia fibers were summarized in Table 5. At log(Ro) 3.54, 3.84 and 4.02, the lowest hemicellulose contents were the same amount ( $p > 0.05$ ). The high amount of cellulose between log(Ro) 3.54 and 3.84 was not different ( $p > 0.05$ ). However, log(Ro) 3.54 was selected because it took less exploded time (2min) than log(Ro) 3.84 (4min).

The efficiencies of hemicelluloses removal of steam exploded Acacia fibers at the severity factor (log(Ro) 3.54) were given in Table 6. All steps of pretreatment, the efficiencies of hemicelluloses removal increased from 0.00 % to 56.24%. The same reason was described in the above section. However, the efficiencies of hemicelluloses removal of Acacia fiber was less than that of Eucalyptus fiber because the exploded time of Eucalyptus was higher than that of Acacia. Therefore, the decrease in hemicelluloses of Eucalyptus fiber was higher than that of Acacia.

### **Conclusion**

From the above results, the optimum condition of steam exploded Eucalyptus fiber was log(Ro) 3.84 (210 °C, 4 min) and the optimum condition of steam exploded Acacia fiber was log(Ro) 3.54 (210 °C, 2 min). The efficiencies of hemicelluloses removal from Eucalyptus fiber higher than Acacia fiber. Since Acacia has higher lignin content than Eucalyptus's, lignin structure might be factoring that resistant hemicelluloses degradation by steam explosion pretreatment.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the research financial supports from the Thailand Research Fund (TRF).

### **References**

- Browning, B L and Bubnitz, LO 1983, 'The Isolation of Holocellulose from Wood. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, vol. 36, pp. 452.
- Cara, C, Ruiz, E, Ballesteros I, Negro, MJ, Castro, E 2006 'Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification' *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 423 - 429.
- Clark, TA, Mackie, KL, 1987, 'Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization', In: Sun, Y & Cheng, J 2002, 'Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review' *Bioresource Technology*, vol. 83, pp. 1 - 11.
- Heitz, M, Capek-Ménard, E, Koeberle, P, Cagné, J and Chornet, E 1991, 'Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the Stake II technology', *Bioresource Technology*, vol. 35, pp. 23 - 32.
- Knauf, M and Moniruzzaman, M 2004, 'Lignocellulosic biomass processing: A perspective' *International Sugar Journal*, vol. 106, no. 1263, pp.147 - 150.
- McMillan, JD, 1994, 'Pretreatment of lignocellulosic biomass', In: Mosier, N, Wyman, C,

- Dale, B, Elander, R, Lee, YY, Holtzapple, M & Ladisch, M 2005, 'Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass' *Bioresource Technology*, vol. 96, pp. 673 - 686.
- Mussatto, SI, Fernandes, M, Milagres, AMF, Roberto, IC 2008, 'Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain' *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 43, pp. 124 - 129.
- Schultz, TP, Blermann, CJ and McGinnis, GD 1983, 'Steam Explosion of Mixed Hardwood Chips as a Biomass Pretreatment' *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, vol. 22, pp. 344 - 348.
- Spait, HA, *American Chemical Society Ser.* 1977, no. 43, pp. 193.
- Sun, Y & Cheng, J 2002, 'Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review' *Bioresource Technology*, vol. 83, pp. 1 - 11.
- TAPPI Standard T 223 om-84, 1984, 'Pentosan in wood and pulp'.
- TAPPI Standard T 203 om-93, 1988, 'Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp and wood'.
- TAPPI Standard T 264 om-97, 1997, 'Preparation of wood for chemical analysis'.
- TAPPI T 211 om-85. 1985, 'Ash in wood and pulp'.
- TAPPI Standard T 222 om-98, 1998, 'Acid insoluble lignin in wood and pulp'.
- Von Sivers, M, Zacchi, G, Olsson, L & Hahn-Haergerdal, B 1994, 'Cost Analysis of Ethanol Production from Willow using Recombinant *Escherichia coli*', *Biotechnology Progress*. vol. 10, pp. 555 - 560.

**Table 1 Experimental condition for steam-treated Eucalyptus and Acacia**

| Biomass    | Treatment Condition |            |                           |
|------------|---------------------|------------|---------------------------|
|            | Temperature (°C)    | Time (min) | Severity factor (log(Ro)) |
| Eucalyptus | 200                 | 2          | 3.24                      |
|            |                     | 4          | 3.55                      |
|            |                     | 6          | 3.72                      |
|            | 210                 | 2          | 3.54                      |
|            |                     | 4          | 3.84                      |
|            |                     | 6          | 4.02                      |
| Acacia     | 200                 | 2          | 3.24                      |
|            |                     | 4          | 3.55                      |
|            |                     | 6          | 3.72                      |
|            | 210                 | 2          | 3.54                      |
|            |                     | 4          | 3.84                      |
|            |                     | 6          | 4.02                      |

**Table 2 Chemical composition of Eucalyptus (*Eucalyptus spp.*) and Acacia (*Acacia mangium* Willd) chips.**

| Chemical composition | Dry weight (%)        |                       |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                      | <i>Eucalyptus spp</i> | <i>Acacia mangium</i> |
| Moisture content     | 10.55                 | 10.62                 |
| Extractive           | 5.91                  | 5.54                  |
| Lignin               | 24.69                 | 26.44                 |
| Hemicellulose        | 19.55                 | 18.28                 |
| Cellulose            | 43.75                 | 46.47                 |
| Ash                  | 0.57                  | 0.76                  |

**Table 3 Composition of steam exploded Eucalyptus fibers**

| Severity factor<br>(log(Ro)) | Chemical compositions (% DW) |                     |                    |                   |
|------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
|                              | alpha-cellulose              | lignin              | hemicellulose      | ash               |
| 3.24                         | 45.20 <sup>c</sup>           | 27.93 <sup>c</sup>  | 17.31 <sup>a</sup> | 0.20 <sup>a</sup> |
| 3.54                         | 53.08 <sup>a</sup>           | 32.27 <sup>ab</sup> | 8.69 <sup>b</sup>  | 0.22 <sup>a</sup> |
| 3.55                         | 48.83 <sup>b</sup>           | 31.09 <sup>b</sup>  | 9.59 <sup>b</sup>  | 0.19 <sup>a</sup> |
| 3.72                         | 49.07 <sup>b</sup>           | 32.79 <sup>a</sup>  | 7.80 <sup>b</sup>  | 0.21 <sup>a</sup> |
| 3.84                         | 53.94 <sup>a</sup>           | 33.16 <sup>a</sup>  | 3.64 <sup>c</sup>  | 0.16 <sup>a</sup> |
| 4.02                         | 53.34 <sup>a</sup>           | 33.35 <sup>a</sup>  | 2.62 <sup>c</sup>  | 0.18 <sup>a</sup> |

**Table 4 Efficiencies of hemicelluloses removal of steam exploded Eucalyptus fibers**

| Pretreatment step | Efficiencies of hemicelluloses removal | Chemical compositions (% DW) |        |               |      |
|-------------------|----------------------------------------|------------------------------|--------|---------------|------|
|                   |                                        | alpha-cellulose              | lignin | hemicellulose | ash  |
| Raw material      | 0.00                                   | 43.75                        | 24.69  | 19.55         | 0.57 |
| Steam explosion   | 21.89                                  | 44.86                        | 29.91  | 15.27         | 0.43 |
| Water extraction  | 81.38                                  | 53.94                        | 33.16  | 3.64          | 0.16 |

**Table 5 Composition of steam exploded Acacia fibers**

| Severity factor<br>(log(Ro)) | Chemical compositions (% DW) |                     |                    |                   |
|------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
|                              | alpha-cellulose              | lignin              | hemicellulose      | ash               |
| 3.24                         | 49.27 <sup>c</sup>           | 31.02 <sup>c</sup>  | 14.26 <sup>a</sup> | 0.53 <sup>a</sup> |
| 3.54                         | 51.05 <sup>a</sup>           | 33.80 <sup>ab</sup> | 8.00 <sup>bc</sup> | 0.40 <sup>a</sup> |
| 3.55                         | 51.21 <sup>a</sup>           | 32.71 <sup>bc</sup> | 11.84 <sup>a</sup> | 0.44 <sup>a</sup> |
| 3.72                         | 50.37 <sup>ab</sup>          | 34.00 <sup>ab</sup> | 9.19 <sup>b</sup>  | 0.43 <sup>a</sup> |
| 3.84                         | 50.75 <sup>a</sup>           | 34.02 <sup>ab</sup> | 8.36 <sup>bc</sup> | 0.57 <sup>a</sup> |
| 4.02                         | 49.49 <sup>bc</sup>          | 35.34 <sup>a</sup>  | 6.01 <sup>c</sup>  | 0.57 <sup>a</sup> |

**Table 6 Composition of steam exploded Acacia fibers**

| Pretreatment step | Efficiencies of<br>hemicelluloses removal | Chemical compositions (% DW) |        |               |      |
|-------------------|-------------------------------------------|------------------------------|--------|---------------|------|
|                   |                                           | alpha-cellulose              | lignin | hemicellulose | ash  |
| Raw material      | 0.00                                      | 46.47                        | 26.44  | 18.28         | 0.76 |
| Steam explosion   | 1.97                                      | 44.44                        | 29.33  | 17.92         | 0.68 |
| Water extraction  | 56.24                                     | 51.05                        | 33.80  | 8.00          | 0.40 |

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล นางสาวนิชฌิมา สุพันธุ์มัตย์  
 วัน เดือน ปี ที่เกิด วันที่ 4 มีนาคม 2526  
 สถานที่เกิด อำเภอสว่างแดนดิน จังหวัดสกลนคร  
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
 ตำแหน่งปัจจุบัน -  
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน -  
 ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -  
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนสนับสนุน จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ส.ก.ว)  
 ฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5)