อักษรหนังสือ

สัญญาเลขที่ R2559C144

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ประจำปี 2559

ชื่อโครงการวิจัย

การพรีทรีตเมนต์ชีวมวลของวัชพืชด้วย sodium hydroxide

(Pretreatment of weed biomass with sodium hydroxide)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 30 ก.ย. 2564
เลขทะเบียน 10806071
เลขเรียกหนังสือ จ TP
ผ.4
P55
ต้นฉบับ
2559

	คณะผู้วิจัย	สังกัด
1.	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต	คณะวิทยาศาสตร์
2.	รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต	คณะเกษตรศาสตร์ฯ

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายได้ กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2559 สัญญาเลขที่ R2559C144

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลของวัชพืช 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*), หญ้ารังนก (*Chloris barbata*) (วัชพืชพวกหญ้า),กระถิน (*Leucaena leucocephala*), หญ้าขัดใบยาว (*Sida acuta*) (วัชพืชพวกมีเนื้อไม้) และธูปฤาษี (*Typha angustifolia*) (วัชพืชน้ำ) การพรีทรีตเมนต์ได้ถูกดำเนินการภายแรงดันไอน้ำ (15 psi) ที่อุณหภูมิ 105, 110, 115 and 120°C และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1, 2 และ 3% (w/v) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ทั้งลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจะถูกขจัดออกไปได้มากที่สุด เมื่อพรีทรีตเมนต์ที่อุณหภูมิ 120°C แต่ทว่าของแข็งที่เหลืออยู่ (solid residue) ของตัวอย่างที่นำมาทำการทดลองพรีทรีตเหลืออยู่ไม่สูงมาก ประสิทธิภาพการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส หรือ efficiency of enzymatic hydrolysis ตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีตแล้ว ของหญ้าขัดใบยาว กระถิน ธูปฤาษี หญ้าพันงูขาวและหญ้ารังนก เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 8.8, 7.4, 6.7, 5.9 และ 5.4 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์

Abstract

The aim of this research was to establish an optimum pretreatment condition for 5 weed biomass; *Achyranthes aspera*, *Chloris barbata* (grass weed), *Leucaena leucocephala*, *Sida acuta* (woody weed) and *Typha angustifolia* (water weed). Pretreatment was performed under pressure (15 psi) at 105, 110, 115 and 120°C using 1, 2 and 3% (w/v) sodium hydroxide (NaOH) concentrations. The results indicated that the highest removal of lignin and hemicellulose were achieved from pretreatment at 120°C but the solid residue of all treated sample was not very high. The efficiency of enzymatic hydrolysis of pretreated *Sida acuta*, *Leucaena leucocephala*, *Typha angustifolia*, *Achyranthes aspera* and *Chloris barbata* were significantly improved up to 8.8, 7.4, 6.7, 5.9 and 5.4 times, respectively compared with untreated sample.

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	I
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
การเตรียมตัวอย่าง	17
การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด	17
การวิเคราะห์หาลิกนิน	17
การวิเคราะห์หาลิกนินที่ละลายในกรด	18
การวิเคราะห์หาที่ไม่ละลายด้วยกรด	18
การวิเคราะหาปริมาณลิกนินทั้งหมด	18
การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโมกุลเดี่ยว	18
การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า	19
การพรีทรีตเมนต์ตัวอย่างวัชพืช	19
การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การวางแผนการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	20
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัชพืช 5 ชนิด	20
ผลของการพรีทรีตเมนต์วัชพืชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์	22
ผลการพรีทรีตเมนต์ที่มีต่อปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่	23
ผลการพรีทรีตเมนต์ที่มีต่อเซลลูโลส	23
ผลการพรีตเมนต์ที่มีต่อเฮมิเซลลูโลส	24
ผลการพรีตเมนต์ที่มีต่อลิกนิน	24
การย่อยวัชพืชทั้งที่ผ่านการพรีทรีตและไม่ผ่านการพรีทรีตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	27
บรรณานุกรม	38

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง (Table)

หน้า

Table 1 Chemical composition of five weeds species 20

Table 2 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Achyranthes aspera* for 60 mins 28

Table 3 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Chloris barbata* for 60 mins 29

Table 4 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Leucaena leucocephala* for 60 mins 30

Table 5 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Sida acuta* for 60 mins 31

Table 6 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Typha angustifolia* for 60 mins 32

สารบัญรูป (Figure)

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของเซลลูโลส 6

รูปที่ 2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส 7

รูปที่ 3 โครงสร้างของลิกนิน 8

Fig. 4 Time course of hydrolysis efficiency of *Seda acuta* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C. 33

Fig. 5 Time course of hydrolysis efficiency of *Leucaena leucocephala* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C. 34

Fig. 6 Time course of hydrolysis efficiency of *Chlois babata* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C. 35

Fig. 7 Time course of hydrolysis efficiency of *Achyranthes aspera* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C. 36

Fig. 8 Time course of hydrolysis efficiency of *Typha angustifolia* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C. 37

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันความต้องการในการใช้พลังงานจากปิโตรเลียมเพิ่มมากขึ้นทุกปี ในขณะที่แหล่งพลังงานที่มีอยู่กำลังจะหมดไป ส่งผลให้เกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงาน และราคาของพลังงานเชื้อเพลิงในตลาดเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งก๊าซที่เกิดจากการเผาไหม้พลังงานเชื้อเพลิงที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจกที่ส่งผลเสียต่อสภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมของโลก ปัญหาเหล่านี้กำลังส่งผลกระทบไปทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยต้องรับภาระค่าใช้จ่ายในการนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศโดยเฉพาะน้ำมันเชื้อเพลิงที่ใช้ในภาคการขนส่งและภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากประเทศไทยมีแหล่งพลังงานที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้ต้นทุนการผลิตในประเทศไทยสูงขึ้น และส่งผลให้เกิดสภาวะการขาดดุลการค้า จากปัญหาดังกล่าวรัฐบาลได้มีนโยบายในการแก้ไขด้วยการสนับสนุนให้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพลังงาน และส่งเสริมให้มีการใช้พลังงานทดแทนเพื่อลดปัญหาพลังงานดังกล่าว ในด้านการส่งเสริมให้มีการใช้พลังงานทดแทน โดยการนำเอทานอลมาใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินได้เป็นแก๊สโซฮอล์ที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบ 10 % และพัฒนามาเป็น 20 % ส่งผลให้ความต้องการในการใช้น้ำมันเบนซินลดลง ด้วยเหตุผลดังกล่าวความต้องการในการใช้เอทานอลเพื่อพลังงานในปัจจุบันจึงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Chingulpitak and Wongwises, 2014; Wattana, 2014)

เอทานอลที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตจากกระบวนการทางชีวเคมีที่มี 3 ขั้นตอนหลัก คือ การเตรียมน้ำตาลที่ใช้ในการหมัก การหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ และการกลั่น ในขั้นตอนการเตรียมน้ำตาลมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชีวมวลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ น้ำตาล แป้ง และลิกโนเซลลูโลส (Nigam and Singh, 2011) วัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งเป็นวัตถุดิบที่ง่ายต่อการนำมาใช้สำหรับผลิตเอทานอล โดยเฉพาะวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เนื่องจากเป็นวัตถุดิบอยู่ในรูปแบบที่พร้อม ต่อการนำไปหมักเป็นเอทานอล (Nguyen et al., 2008; Sorapipatana and Yoosin, 2011) อย่างไรก็ตามวัตถุดิบดังกล่าวกำลังประสบปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบ เนื่องจากความต้องการใช้วัตถุดิบเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ความไม่ยั่งยืนของวัตถุดิบ การขาดพื้นที่เพาะปลูก ต้นทุนในการเพาะปลูกสูงขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นแป้งและน้ำตาลเป็นพืชอาหาร การใช้พืชอาหารมาผลิตเป็นพลังงานโดยตรงอาจก่อให้เกิดภาวะการแข่งขันด้านอาหารและพลังงาน ที่อาจก่อให้เกิดการแคลนอาหารได้ในอนาคต ดังนั้นการนำวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหา เนื่องจากมีข้อได้เปรียบทางด้านราคาต้นทุนของวัตถุดิบ มีปริมาณมาก พบได้ทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสไม่ใช่พืชอาหาร จึงไม่ส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตอาหารในอนาคต (Agbor et al., 2011; Mussatto et al., 2010; Ziolkowska, 2014)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลชนิดหนึ่งที่มีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนคือ ส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต คือ ลิกนิน และส่วนที่สองคือ คาร์โบไฮเดรต ที่รวมทั้งเซลลูโลส และ

เฮมิเซลลูโลส (Volynets and Dahman, 2011) จากองค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิด องค์ประกอบในส่วนคาร์โบไฮเดรต คือเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้ โดยผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ ก่อนนำไปเข้าสู่ขั้นตอนการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการย่อยมีอุปสรรคที่สำคัญ คือองค์ประกอบลิกนินที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ยิ่งไปกว่านั้นยังมีองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสที่ กีดขวางการเข้าทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสต้องผ่านขั้นตอนการการพรีทรีตเมนต์เพื่อกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกไป เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่เหลือเพียงองค์ประกอบเซลลูโลสสำหรับนำไปเข้าสู่ขั้นตอนการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ จากนั้นจึงนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ ไปหมักต่อด้วยยีสต์ เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นเอทานอล (Sun and Cheng, 2002)

จากการศึกษาของ Premjet และคณะ (2013) พบว่า มีวัชพืชหลายชนิดที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงาน เนื่องจากมีข้อได้เปรียบในด้านปริมาณที่มีอยู่อย่างไม่จำกัด ไม่ต้องดูแลรักษา จึงไม่มีต้นทุนในการเพาะปลูก สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกฤดูกาลและในทุกสภาพแวดล้อม นอกจากนี้การนำวัชพืชมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพลังงานเป็นการจัดการวัชพืชที่ได้ประโยชน์ เพิ่มคุณค่าให้กับวัชพืช และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการจัดการวัชพืชด้วยวิธีอื่นเช่น การตัดและการเผาทำลาย รวมทั้งการใช้สารกำจัดวัชพืช เป็นต้น ดังนั้นวัชพืชเหล่านี้จึงจัดได้ว่าเป็นวัชพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านพลังงานที่พบได้ทั่วไปและมีอยู่อย่างไม่จำกัด โดยเฉพาะ ขัดใบยาว (*Sida acuta*) หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) กระถิน (*Leucaena leucocephala*) ธูปฤาษี (*Typha angustifolia*) และหญ้ารังนก (*Chloris barbata*) ยิ่งไปกว่านั้นวัชพืช 3 ชนิดแรกดังที่กล่าวไว้ในข้างต้นยังเป็นวัชพืชที่ในกลุ่มที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงเทียบเท่ากับพืชเส้นใยและไม้เนื้อแข็ง เมื่อนำค่าองค์ประกอบเซลลูโลสไปคำนวณหาค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีพบว่า มีค่าเอทานอลสูงถึง 461.0 – 520.30 (L/Ton) สูงกว่าแหล่ง วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้สำหรับผลิตเอทานอลในปัจจุบันเช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าวสาลี ฟางข้าว และชานอ้อยเป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นวัชพืชเหล่านี้ยังมีปริมาณลิกนิน ความชื้นและเถ้าต่ำ เหมาะสำหรับนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล (Premjet et al., 2013)

การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่การพรีทรีตเมนต์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และการหมัก ซึ่งขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์เป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมวัตถุดิบก่อนนำไปเข้าสู่ขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อกำจัดลิกนินและแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส เนื่องเป็นโครงสร้างที่ขัดขวางการเข้าทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ดังนั้นการพรีทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพจึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลให้สูงขึ้น ส่งผลให้สามารถลดปริมาณการใช้เอนไซม์ที่มีราคาสูงได้ การพรีทรีตเมนต์สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) การพรีทรีตเมนต์ ด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment) และการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment) โดยแต่ละวิธีมีข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบแตกต่างกัน นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการพรีทรีตเมนต์วัตถุดิบแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับวิธีการและองค์ประกอบของวัตถุดิบที่

นำมาเข้าสู่กระบวนการพรีทรีตเมนต์ (Hendriks and Zeeman, 2009; Limayem and Ricke, 2012; Premjet et al., 2013; Sánchez, 2009; Wyman et al., 2005) ดังนั้นการนำวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ หญ้าขัดใบยาว หญ้าพันงูขาว กระถิน ธูปฤาษี และหญ้ารังนก มาทำการศึกษาเพื่อใช้เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลจึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาข้อหลัก คือ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางเคมีของวัชพืชแต่ละชนิด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ของวัชพืช 5 ชนิด เช่น หญ้าขัดใบยาว (*Sida acuta*) หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) กระถิน (*Leucaena leucocephala*) ธูปฤาษี (*Typha angustifolia*) และ หญ้ารังนก (*Chloris barbata*) เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต Bio-ethanol
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการพรีทรีตเม้นต์วัชพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วย NaOH
3. การค้นคว้าหาเทคโนโลยีเพื่อแก้ไขปัญหาสำคัญในขั้นตอนการพรีทรีต ด้วยด่าง (NaOH) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาปริมาณ คาร์โบไฮเดรต ลิกนิน และเถ้า ของวัชพืชทั้ง 5 ชนิด
2. เพื่อพรีทรีต วัชพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วยวิธี physicochemical pretreatment (NaOH)
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะต่อการพรีทรีตวัชพืชแต่ละชนิดด้วยด่างเจือจาง (NaOH) ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% ที่อุณหภูมิ 105 110 115 และ 120°C
4. เพื่อทำการ hydrolysis วัชพืชที่ผ่านการกระบวนการพรีทรีต ด้วยเอนไซม์ cellulase
5. ตรวจหาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่เกิดขึ้น เช่น glucose, xylose, galactose และลิกนิน ที่เหลืออยู่

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอทานอล (ethanol)

เอทานอล คือ สารอินทรีย์ (organic compound) ในกลุ่มของแอลกอฮอล์ (alcohol) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group: –OH) จับอยู่กับอะตอมของคาร์บอน หรือเรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เอทานอลมีสูตรโมลกุลคือ CH_3CH_2OH เอทานอลบริสุทธิมีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี (colorless) ระเหยได้ง่าย (volatile) ติดไฟง่าย (flammable) ทำให้มึนเมา (intoxication) มีค่า pH เป็นกลาง มีกลิ่นเฉพาะตัวอ่อน มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 78°C และ จุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ –112°C เอทานอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้เป็นตัวทำละลายในทางเคมี (solvent) และใช้เป็นพลังงานทดแทน (alternative energy) โดยเฉพาะการนำไปใช้เป็นไบโอเอทานอล (bioethanol) เนื่องจากมีข้อได้เปรียบคือให้เปลวไฟสีฟ้าที่ให้พลังงานสูงในขณะที่เกิดการเผาไหม้และเกิดการเผาไหม้จนหมด (no residue) และเนื่องจากมีองค์ประกอบออกซิเจนอยู่ในโครงสร้างทำให้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่มีค่าออคเทนสูงเช่นเดียวกันกับเชื้อเพลิงปิโตรเลียม นอกจากนี้เอทานอลยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกหลายแนวทาง เช่น การนำเอทานอลไปผสมกับน้ำมันเบนซิน (gasoline) เพื่อใช้เป็น แก๊สโซฮอล์ (gasohol) ได้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นเอทานอลยังสามารถใช้เพิ่มค่าออคเทนในเครื่องยนต์โดยการเปลี่ยนเอทานอลเป็นสาร ETBE (ethyl tertiary butyl ether) แล้วใช้ทดแทนสาร MTBE (methyl tertiary butyl ether) จากข้อได้เปรียบดังกล่าวเอทานอลจึงเป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มของแอลกอฮอล์ ที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้น (Joshi et al., 2011; Zhang et al., 2010)

วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (feedstock for bioethanol production)

เอทานอลที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตจากกระบวนการทางชีวเคมี (biochemical conversion) ที่มี 3 ขั้นตอนหลักได้แก่การเตรียมน้ำตาลสำหรับการหมัก (fermentable sugar) การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ และการกลั่น ในขั้นตอนการเตรียมน้ำตาลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ 3 ประเภท คือ ประเภทน้ำตาล ประเภทแป้ง และ ประเภทน้ำตาล (Nigam and Singh, 2011)

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล (sucrose-containing feedstock)

วัตถุดิบประเภทน้ำตาล คือ วัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ซึ่งง่ายต่อการนำไปหมักให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์ ดังนั้นกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลมีเพียง การบีบ (milling process) หรือการสกัด (extraction process) จากนั้นเพียงแค่นำน้ำตาลที่ได้จากการสกัดไปหมักด้วยยีสต์ แล้วนำไปกลั่น จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกำจัดน้ำ (dehydration) เพื่อให้เหมาะสำหรับใช้เป็นพลังงานทดแทน เอทานอลที่ใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่จัดอยู่ในวัตถุดิบรุ่นที่หนึ่ง (first generation feedstock) เช่น อ้อย หัวบีท ข้าว

ฟ่างหวาน และ ผลไม้ เนื่องจากมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน แต่เมื่อเกิดความต้องการวัตถุดิบสูงขึ้น จึงเป็นเหตุให้เกิดความไม่ยั่งยืน ขาดพื้นที่เพาะปลูก ต้นทุนในการเพาะปลูกสูง และส่งผลให้ประสบปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบ ยิ่งไปกว่านั้นน้ำตาลคืออาหารของมนุษย์ ดังนั้นในการใช้อาหารมาผลิตเอทานอลเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานอาจก่อให้เกิดภาวะการแข่งขันทางด้านอาหารและพลังงาน (food and fuel competition) ที่เป็นสาเหตุของการแคลนอาหารในอนาคต ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเพื่อนำวัตถุดิบชนิดอื่นที่มีศักยภาพมากกว่าน้ำตาลมาใช้สำหรับการผลิตเอทานอล (Demirbas, 2011; Mussatto et al., 2010; Nigam and Singh, 2011)

วัตถุดิบประเภทแป้ง (starchy materials)

แป้งประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด และทั้งสองชนิดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส แต่มีมวลโมเลกุลและโครงสร้างต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดในแป้ง ได้แก่ อะไมโลส (Amylose) มีประมาณ 20-28% และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ประมาณ 72-80% อะไมโลสเป็นสายยาวที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ D-glucose (ประมาณ 6000 ยูนิต) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic อะไมโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีการแตกกิ่งของ D-glucosse (ประมาณ 2 ล้านยูนิต) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α,1-4 และ α,1-6 glycosidic (Akoh et al., 2008) เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการ saccharification ด้วย amylolytic microorganism หรือ enzyme เช่น glucoamylase และ α -amylase แป้งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และเมื่อนำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปหมักต่อด้วยยีสต์ น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ (Toksoy Öner et al., 2005)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic feedstock)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส คือ วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลชนิดหนึ่งมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนคือ ส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (non-carbohydrate) ได้แก่ ลิกนิน (lignin) ที่เป็นพอลิเมอร์ของสารฟีนิลโพรเพน (phenyl propane) 3 ชนิด คือ guaiacyl (G), *p*-hydroxyl phenol (H) และ syringyl (S) และส่วนที่สองคือคาร์โบไฮเดรต ได้แก่เซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) (Volynets and Dahman, 2011)

เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดหนึ่งที่พบมากที่สุดในธรรมชาติเนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส เซลลูโลส คือ พอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส (D-glucose หรือ D-glucopyranose) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (β-glycosidic bond) ตำแหน่งที่ 1 และ 4 ของคาร์บอนอะตอมโดยทำมุม 180° ทำให้เกิดโครงสร้างพอลิเมอร์สายยาว (linear polymer) (รูปที่ 1) มีค่า degree of polymerization (DP) ตั้งแต่ 300 – 1000 ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาและกระบวนการบางชนิดเช่น การพรีทรีตเมนต์ที่ทำให้พอลิเมอร์ของกลูโคสมีขนาดเล็กลง เป็นต้น เซลลูโลสแบ่งตามโครงสร้าง

ออกเป็น 2 ประเภท คือ อสัณฐาน (amorphous cellulose) หมายถึงเซลลูโลสที่เรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ ไม่มีรูปร่างที่แน่นอน และโครงสร้างแบบที่สองคือแบบผลึก (crystalline cellulose) ที่เกิดจากพอลิเมอร์สายยาวของกลูโคสมาจัดเรียงตัวกันในแบบขนานแล้วยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) เกิดเป็นโครงสร้างแบบผลึกที่สามารถจำแนกได้เป็น 4 ชนิดคือ cellulose I, cellulose II, cellulose III และ cellulose IV ซึ่ง cellulose I พบมากที่สุดในธรรมชาติ cellulose I แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ cellulose I_α ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ ส่วน cellulose I_β พบได้ในพืชชั้นสูง เซลลูโลสทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช มีปริมาณมากถึง 40 – 90 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ด้วยสาเหตุดังกล่าวเซลลูโลสจึงเป็นแหล่งของน้ำตาล (fermentable sugar source) ที่มีปริมาณมากที่สุดในโลกและมีอยู่อย่างไม่จำกัด (Haghighi Mood et al., 2013; Perez and Mazeau, 2004; Wada et al., 2012)

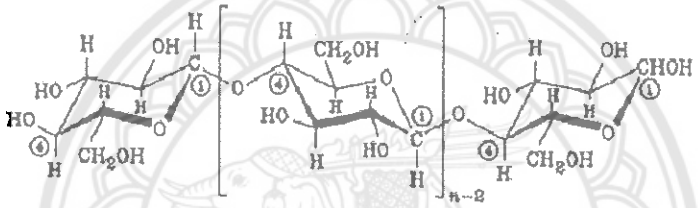

Fig. 1 โครงสร้างของเซลลูโลส (Harmsen, et al., 2010)

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลส คือ โพลิเมอร์เชิงซ้อน (heteropolymer) ที่พบมากเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลสองประเภท คือน้ำตาลโมลเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (hexose) ได้แก่ไซโลส (D-xylose) และอะราบิโนส (L-arabinose) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ แมนโนส (D-mannose) กลูโคส (D-glucose) และกาแลคโทส (D-galactose) มีค่า DP ตั้งแต่ 70 – 200 หน่วย (monosaccharide units) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเป็นสายโซ่ที่มีแขนง (highly branched) (รูปที่ 2) โดยวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสประเภทไม้เนื้ออ่อน (softwood) มีกลูโคแมนแนน (Glucomannan) เป็นสายโซ่หลักในขณะที่ประเภทไม้เนื้อแข็ง (hardwood) วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร (agricultural residue) และพืชล้มลุก (herbaceous) มีน้ำตาลไซโลสเป็นสายโซ่หลัก โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นแบบอสัณฐาน ทำให้สามารถละลายได้ง่ายด้วยความร้อนและสารเคมี เฮมิเซลลูโลสที่พบในธรรมชาติเชื่อมต่ออยู่กับโครงสร้างลิกนินด้วยพันธะอีเทอร์หรือเอสเทอร์ เกิดเป็นโครงสร้าง carbohydrate – lignin complex ล้อมรอบเซลลูโลส ดังนั้นเฮมิเซลลูโลสจึงเป็นอุปสรรคทางกายภาพ (physical barrier) ในการย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล (Njoku et al., 2013; Ping et al., 2013; Volynets and Dahman, 2011)

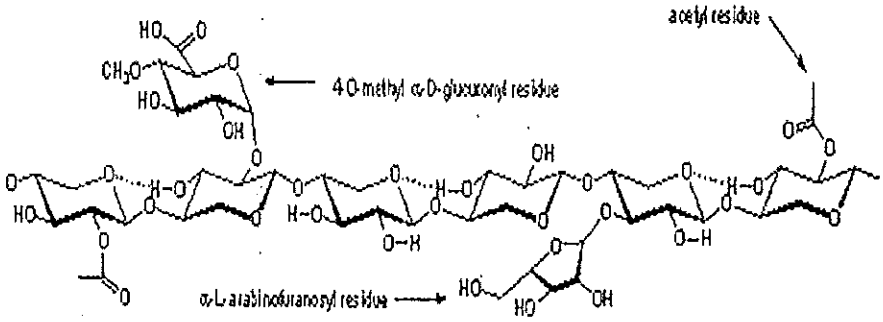

Fig. 2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Harmsen, et al., 2010)

ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน คือ พอลิเมอร์ที่พบมากเป็นอันดับสามรองจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากปริมาณ ดังกล่าวลิกนินจึงจัดได้ว่าเป็นอีกผลิตภัณฑ์ที่สำคัญของโลก ลิกนินในธรรมชาติสังเคราะห์จากมอนอเมอร์ (monolignol) ที่เป็นสารประเภท phenylpropane unit 3 ชนิด คือ guaiacyl (G), *p*-hydroxyl phenol (H) และ syringyl (S) (รูปที่ 3) โดยอัตราส่วนของมอนอเมอร์ทั้ง 3 ชนิดขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่มาของลิกนิน ความแตกต่างของอัตราส่วนของมอนอเมอร์มีผลทำให้โครงสร้างของลิกนินมีความแตกต่างกัน โดยลิกนินสามารถจำแนกตามแหล่งที่มา 3 ชนิด ได้แก่ลิกนินจากไม้เนื้ออ่อน (lignin of softwoods) ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น guaiacyl (G) ลิกนินจากไม้เนื้อแข็ง (lignin of hardwoods) และลิกนินจากพืชล้มลุก (lignin of herbaceous) ที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น guaiacyl และ *p*-hydroxyl phenol (G-H) นอกจากนี้ลิกนินยังสามารถจำแนกได้

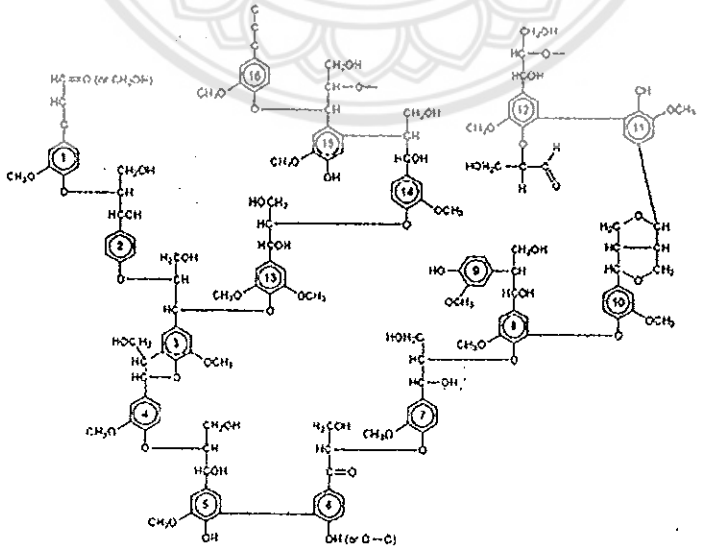

Fig. 3 โครงสร้างของลิกนิน (Harmsen, et al., 2010)

จากคุณสมบัติการละลายในกรด สามารถแบ่งลิกนิน ออกเป็น 2 ชนิด คือ ลิกนินที่ละลายในกรด (acid soluble lignin: ASL) ที่มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็น syringyl ในส่วนลิกนินที่ละลายในกรดเป็นลิกนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจึงง่ายต่อการกำจัดออกไปด้วยการพรีทรีตเมนต์ ลิกนินชนิดที่สองคือลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble lignin: AIL) ที่มีประกอบด้วย guaiacyl เป็นหลัก นอกจากนี้ในลิกนินยังมีองค์ประกอบอื่น เช่น acyl group และ กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่าที่เป็นที่มาของผลผลิตจากลิกนิน เช่น valinin, ferulic acid, vinyl guaiacol และ lignol เป็นต้น ลิกนินที่พบในธรรมชาติเชื่อมต่อกับโครงสร้างส่วนคาร์โบไฮเดรต ทำหน้าที่เพิ่มความแข็งแรงให้โครงสร้างพืช และป้องกันการทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นลิกนินจึงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Buranov and Mazza, 2008; Ko et al., 2015; Taherzadeh and Karimi, 2008)

ชีวมวลวัชพืช (weedy biomass)

วัชพืช (weed) หมายถึงพืชที่ไม่เป็นที่ต้องการของมนุษย์ มีความสามารถในการรุกราน อยู่รอด เพิ่มจำนวนประชากร และครอบครองพื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว วัชพืชที่กระจายพันธุ์และเพิ่มจำนวนในพื้นที่ทางการเกษตร ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในด้านผลผลิต เป็นสาเหตุของโรคและแมลง ทำให้ดินเสื่อมสภาพ ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของพืช นอกจากนี้การกระจายพันธุ์ของวัชพืชบางชนิดที่มีความชื้นน้อยและติดไฟได้ง่าย สามารถเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอัคคีภัย จากการศึกษาของ Premjet และคณะ (2013) พบว่า มีวัชพืชหลายชนิดที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงาน เนื่องจากมีข้อได้เปรียบในด้านปริมาณที่ไม่จำกัด ไม่ต้องดูแลรักษา จึงไม่มีต้นทุนในการเพาะปลูก สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกฤดูกาลและในทุกสภาพแวดล้อม เช่น หญ้าขัดใบยาว หญ้าพันงูขาว กระถิน ธูปฤาษี และ หญ้ารังนก (Premjet et al., 2013)

ดังนั้นการนำวัชพืชเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตพลังงาน เป็นการจัดการวัชพืชที่ได้ประโยชน์เพิ่มคุณค่าให้กับวัชพืช และเมื่อเปรียบเทียบกับการจัดการวัชพืชด้วยวิธีดั้งเดิมได้แก่ การตัดและการเผาทำลาย รวมทั้งการใช้สารกำจัดวัชพืช การนำวัชพืชมาใช้ประโยชน์ในด้านพลังงานจึงเป็นวิธีการจัดการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

หญ้าขัดใบยาว

หญ้าขัดใบยาวคือวัชพืชชนิดหนึ่ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Sida acuta* Burm.f. ชื่อสามัญภาษาไทยอื่น คือ หญ้าขัดใบยาว หญ้าขัดมอน หญ้าขัด หญ้าข้อ หญ้าขัดเหลี่ยม ยุงปัด ยุงกวาด ไม้กวาด และข้าวต้ม ชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ Broomweed, Southern sida, Spiny head sida, Ballier savanne และ Cheesewee อยู่ในวงศ์ Malvaceae มีลักษณะเป็นไม้ทรงพุ่มขนาดเล็กสูงประมาณ 30-100 cm มีกิ่งก้านมากและต้นแก่มีลักษณะเป็นเนื้อไม้แข็งและเหนียว ใบเป็นรูปใบหอกยาวประมาณ 3-5 cm ขอบใบหยักและมีหูใบ 1 คู่ ดอกมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยว สีเหลือง เมื่อแก่มีเมล็ดสีน้ำตาลปนดำ 5-8 เมล็ด ขยายพันธุ์

โดยใช้เมล็ด จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่า หญ้าขัดใบยาวมีองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและมีลิกนินต่ำ ประกอบด้วยเซลลูโลส 56.00±0.40% เฮมิเซลลูโลส 56.00±0.40% ในขณะที่พบลิกนินเพียง 6.80±0.10% จากปริมาณคาร์โบไฮเดรตสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าเอทานอลทางทฤษฎีได้มากถึง 520.30±5.4 (L/Ton) ดังนั้นหญ้าขัดใบยาวจึงเป็นวัชพืชที่ควรนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Premjet, et al., 2013; ดวงพร สุวรรณกุล, 2000; ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม, 1995)

หญ้าพันงูขาว

หญ้าพันงูขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Achyranghes aspera* Linn. มีชื่อสามัญภาษาไทยอื่น คือ หญ้าพันงู หญ้าตีนงูขาว หญ้าโคยงู และ หญ้าพันธุ์งู และมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ ได้แก่ Prickly-chaffed flover, Prickly-chaff flower และ Rough chaff tree อยู่ในวงศ์ Amaranthaceae ลำต้นมีลักษณะตั้งตรง ทรงพุ่ม สูงประมาณ 100 cm ลำต้นอ่อนมีขนสีขาวปกคลุม ใบเดี่ยวรูปทรงไข่ ยาว 6 - 10 cm ขอบใบหยักแผ่นใบมีลักษณะบางมีขนปกคลุมทั้งสองด้าน ดอกมีลักษณะเป็นแบบช่อเชิงลด ยาวประมาณ 10 - 30 cm ดอกย่อยมีสีเขียวเมื่อแก่มีผลชนิดแห้ง กระจายพันธุ์ด้วยเมล็ด สามารถพบได้ตามพื้นที่ทางการเกษตร ริมถนนและพื้นที่รกร้างทั่วไป จากการศึกษาองค์ประกอบพบว่า หญ้าพันงูขาวเป็นวัชพืชที่มีองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและลิกนินต่ำ ประกอบด้วยเซลลูโลส 53.70±0.10% เฮมิเซลลูโลส 10.20±0.10% แต่พบลิกนินเพียง 8.50±0.10% จากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของวัชพืชหญ้าพันงูขาวสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าเอทานอลทางทฤษฎีได้มากถึง 461.00±1.50 (L/Ton) ดังนั้นหญ้าพันงูขาวจึงเป็นวัชพืชที่ควรนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Premjet, et al., 2013; ดวงพร สุวรรณกุล, 2000; ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม, 1995)

กระถิน

กระถิน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Leucaena leucocephala* Lam. มีชื่อสามัญภาษาไทยอื่น คือ ตอเบา ตอเทศ และมีชื่อสามัญภาอังกฤษคือ White popinac และ Wild tamarind lead tree อยู่ในวงศ์ Mimosaceae หรือ Leguminosae กระถินเป็นไม้เนื้อแข็งที่มีลำต้นทรงพุ่มสูงประมาณ 100 - 150 cm ใบมีลักษณะเป็นใบประกอบแบบขนนกสองชั้น ดอกมีลักษณะเป็นแบบกระจุกสีขาว ผลมีลักษณะเป็นฝักเมื่อแก่แล้วฝักจะแตกออกตามยาว กระจายพันธุ์ด้วยเมล็ด มักพบในพื้นที่ทางการเกษตร และพื้นที่รกร้างทั่วไป เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี มีอายุ หลายฤดูและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่า กระถินประกอบด้วยเซลลูโลส 55.20±0.00% เฮมิเซลลูโลส 10.10±0.10% ลิกนิน 1610±0.10 และเถ้า 2.60±0.60% และจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าเอทานอล ทางทฤษฎีได้มากถึง 471.90±1.20 (L/Ton) ดังนั้นกระถินจึงเป็นวัชพืชที่ควรนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Premjet, et al., 2013; ดวงพร สุวรรณกุล, 2000; ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม, 1995)

ธูปฤาษี

ธูปฤาษี มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Typha angustifolia* Linn มีชื่อสามัญไทยคือ กกช้าง ปรือ กกธูป สลาบหลวง หญ้าเฟื้อ มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษคือ Lesser reedmace, Narrow leaved cat tail, Bulrush, Cattail, Flag, Reedmace tule และ Narrowleaf cattail ธูปฤาษีเป็นวัชพืชน้ำที่อยู่ในวงศ์ Typhaceae ลำต้นมีลักษณะตั้งตรงเป็นกอ มีลำต้นใต้ดิน ต้นสูงประมาณ 100 – 200 cm ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวแบน เรียวแหลม ยาวประมาณ 100 cm ดอกเป็นแบบ ช่อเชิงลดสีน้ำตาลเข้ม ผลมีลักษณะเรียวยาว มีขนาดเล็ก ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้าและเมล็ด เจริญเติบโตในบริเวณแหล่งน้ำขัง ในบึง และนาข้าวทั่วไป จากการศึกษาองค์ประกอบพบว่า ธูปฤาษีประกอบด้วยเซลลูโลส 47.10±0.10% เฮมิเซลลูโลส 16.90±0.40% ลิกนิน 10.00±0.30 และเถ้า 11.30±0.10% และจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าเอทานอลทางทฤษฎีได้มากถึง 462.90±3.90 (L/Ton) ดังนั้นธูปฤาษีจึงเป็นวัชพืชที่ควรนำมาศึกษาเพื่อใช้ เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Premjet, et al., 2013; ดวงพร สุวรรณกุล, 2000; ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม, 1995)

หญ้ารังนก

หญ้ารังนกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Chloris barbata* Sw. มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ Finger grass Swollen finger grass, Pea-cock plumegrass และ Plushgrass อยู่ในวงศ์ Poaceae หรือ Gramineae ลำต้นมีลักษณะตั้งตรงสูงประมาณ 30 – 100 cm มีข้อสีน้ำตาล บริเวณข้อสามารถแตกรากและทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน ใบเป็นใบเดี่ยว ค่อนข้างยาว ดอกมีลักษณะเป็นช่อเชิงลด กระจายพันธุ์โดยใช้เมล็ด หญ้ารังนกสามารถพบเห็นได้ทั่วไปตามพื้นที่ทางการเกษตร ริมถนน และพื้นที่รกร้าง โดยเฉพาะพื้นที่แห้งแล้ง จากการศึกษาองค์ประกอบ ทางเคมีพบว่า หญ้ารังนกประกอบด้วยเซลลูโลส 16.10±0.00% เฮมิเซลลูโลส 29.10±0.00% ลิกนิน 16.00±0.30 และเถ้า 16.00±0.30% และจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่พบสามารถนำไปคำนวณเป็นค่าเอทานอลทางทฤษฎีได้มากถึง 329.80±0.30 (L/Ton) ดังนั้นหญ้ารังนกจึงเป็นวัชพืชที่ควรนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล (Premjet, et al., 2013; ดวงพร สุวรรณกุล, 2000; ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม, 1995)

การพรีทรีตเมนต์ (pretreatment)

การพรีทรีตเมนต์ คือ ขั้นตอนที่สำคัญของการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสก่อนขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางกายภาพและทางเคมีของวัตถุดิบ กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เป็นอุปสรรคในขั้นต่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อให้คงเหลือเพียงองค์ประกอบเซลลูโลสที่มีโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Brodeur et al., 2011; Cao et al., 2012)

การพรีทรีตเมนต์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทได้แก่การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางกายภาพ การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางเคมี และ การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางชีวภาพ

การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีเชิงกล (mechanical pretreatment)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีเชิงกล (mechanical pretreatment) เรียกอีกชื่อว่าการลดขนาดด้วยวิธีเชิงกล (mechanical comminution) คือการลอก (shredding) การตัด (chipping) การโม่ (milling) และการบด (grinding) การลดขนาดด้วยวิธีเชิงกลส่วนใหญ่เป็นการตัดวัตถุดิบ ให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นจึงนำไปบดหรือโม่อีกครั้ง โดยแต่ละวิธีการจะได้ขนาดของวัตถุดิบที่แตกต่างกัน การตัดจะได้ขนาดวัตถุดิบประมาณ 10 – 30 mm ส่วนการบดหรือการโม่จะได้ขนาดวัตถุดิบประมาณ 0.2 – 2.0 mm การลดขนาดด้วยวิธีเชิงกลแต่ละวิธีต้องใช้พลังงานในกระบวนการแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของวัตถุดิบที่ต้องการ ความยืดหยุ่น ความลื่นและความเปราะของวัตถุดิบ นอกจากนี้ชนิดของวัตถุดิบยังมีผลต่อพลังงานที่ใช้ในกระบวนการ เช่น วัตถุดิบประเภทไม้เนื้อแข็งต้องใช้พลังงานสำหรับการลดขนาดมากกว่าวัตถุดิบประเภทวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร เป็นต้น การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีเชิงกลมีผลต่อโครงสร้างโครงสร้างเซลลูโลส ทำให้เซลลูโลสมีความเป็นผลึกและมีค่า degree of polymerization ลดลง ดังนั้นการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีเชิงกลจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ (Agbor et al., 2011; Alvira et al., 2010; Sun and Cheng, 2002; Volynets and Dahman, 2011)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ (physicochemical pretreatment)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำ

การพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำ (steaming/steam explosion pretreatment) **เป็นการใช้ไอน้ำในการพรีทรีตเมนต์ที่รวม**ทั้งมีและไม่มีการระเบิด (explosion) ในกระบวนการ โดยเติมวัตถุดิบและให้ความชื้นที่ค่อนข้างต่ำในถังปฏิกรณ์ จากนั้นใช้อุณหภูมิสูงขณะพรีทรีตเมนต์ในระหว่างกระบวนการจะเกิดกรดอินทรีย์ที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ของวัตถุดิบ และเกิดการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า autohydrolysis อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัดทางด้านอุปกรณ์ ที่มีราคาแพง และใช้พลังงานในกระบวนการสูงมาก (Volynets and Dahman, 2011; Wyman, 1996)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยน้ำร้อน

การพรีทรีตเมนต์ด้วยน้ำร้อน (liquid hot water pretreatment/hydrothermolysis) เป็นการพรีทรีตเมนต์ในอุณหภูมิสูงโดยไม่มีการเติมสารเคมีเข้าไประหว่างกระบวนการเช่นเดียวกันกับการพรีทรีตเมนต์ด้วยไอน้ำ เพียงแต่แตกต่างกันในเรื่องของความชื้นที่ใช้ในกระบวนการโดย การพรีทรีตเมนต์ด้วยน้ำร้อนใช้ปริมาณความชื้นมากกว่า โดยการพรีทรีตเมนต์ด้วยน้ำร้อนให้ผลผลิตของน้ำตาลไซโลสสูง ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถกำจัด ลิกนินได้มากถึง 40% อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยน้ำร้อนเป็นวิธีที่ใช้พลังงานสูงและต้องใช้เครื่องมือที่และอุปกรณ์ที่มีราคาแพง จึงทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูงเมื่อเปรียบกับการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีการอื่น (Volynets and Dahman, 2011; Wyman, 1996)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH pretreatment) คือการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ในกระบวนการ การทำปฏิกิริยาของสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในขั้นแรกคือไฮดรอกไซด์ (OH^-) จากโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเข้าชนกับคาร์บอนอะตอมของพันธะอีเทอร์หรือเอสเทอร์ เกิดสารมัธยันตร์ (intermediate) คือ tetrahedral intermediate จากนั้นสาร tetrahedral intermidiat เปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารที่เรียกว่า alkoxide (OCH_3) โดยสาร alkoxide ที่เกิดขึ้นจะเข้าไปทำปฏิกิริยา deprotonate กับกรดคาร์บอกซิลิค (carboxylic aicd) ทำให้พันธะอีเทอร์หรือเอสเทอร์ถูกทำลายอย่างถาวร (irreversible hydrolysis) ทำให้เกิดการละลายของลิกนินและหลุดออกจากวัตถุดิบ คงเหลือไว้แต่ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (Harmsen et al., 2010; Zhao et al., 2012b) ดังนั้นวัตถุดิบที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์จึงประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ยังทำให้ความเป็นผลึกของเซลลูโลสลดลง ค่า Degree of Polymerization ลดลง ความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น (Cao et al., 2012; McIntosh and Vancov, 2011; Wang et al., 2010; Xu et al., 2010; Xu et al., 2012)

ดังนั้นการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซดียมไฮดรอกไซด์ที่สามารถกำจัดลิกนินได้โดยไม่ทำให้เกิดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรตไปในระหว่างกระบวนการพรีทรีตเมนต์ จึงเป็นวิธีการพรีทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การ พรีทรีตเมนต์ยังมีข้อได้เปรียบ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเบสแก่ (strong base) จึงทำปฏิกิริยาได้รุนแรง เหมาะกับวัตถุดิบที่หลากหลาย สามารถใช้อุณหภูมิต่ำ ไม่ต้องใช่เครื่องมือที่ซับซ้อน นอกจากนี้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถนำไปรีไซเคิลสำหรับการพรีทรีตเมนต์ ในครั้งต่อไปได้และไม่ทำให้เกิดสารยับยั้ง (inhibitory compound) ในระหว่างกระบวนการพรีทรีตเมนต์ (Wan et al., 2011; Xu et al., 2010; Xu et al., 2012)

อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดอรกไซด์มีข้อจำกัดคือ ประสิทธิภาพของการพรีทรีตเมนต์ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของวัตถุดิบโดยเฉพาะลิกนิน เนื่องจากการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่เหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีปริมาณลิกนินสูง เช่น วัตถุดิบประเภทไม้เนื้ออ่อน เช่น ไม้สน เป็นต้น (McIntosh and Vancov, 2010; Sun and Cheng, 2002; Wan et al., 2011)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยปูนขาว

การพรีทรีตเมนต์ด้วยปูนขาว (lime pretreatment) คือ การพรีทรีตเมนต์โดยใช้ปูนขาว ($CaCO_3$) ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ปูนขาวมีราคาถูก ไม่มีอันตรายต่อผู้ใช้และสามารถนำ กลับมาใช้ใหม่ได้ การพรีทรีตเมนต์ ด้วยปูนขาวสามารถกำจัดลิกนินได้มากกว่า 50% และย่อยเฮมิเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ สภาวะที่เหมาะสมในการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยปูนขาวมี 2 แบบคือ การใช้อุณหภูมิสูง มีค่าอุณหภูมิตั้งแต่ 85 - 135°C นาน 1 - 3 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้อุณหภูมิประมาณ 50-65 °C ต้องใช้เวลานานกว่า 24 ชั่วโมง นอกจากนี้การพรีทรีตเมนต์โดยใช้ปูนขาวด้วยสภาวะที่เหมาะสมสามารถกำจัดลิกนินได้มากถึง 90% ส่งผลให้ผลผลิต

ของน้ำตาลจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยปูนขาวมีข้อเสียเปรียบคือปูนขาวสามารถละลายได้น้อย ดังนั้นในระหว่างการพรีทรีตเมนต์จึงต้องใช้สารเคมีในปริมาณมากในการเพิ่มความเข้มข้น (Volynets and Dahman, 2011; Xu and Cheng, 2011)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนีย

การพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนีย (ammonium pretreatment) คือการพรีทรีตเมนต์โดยใช้สารแอมโมเนียในปฏิกริยา เช่น สารแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_3OH) การพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนียในสภาวะที่เหมาะสมสามารถกำจัดลิกนินได้ถึง 60-70% และเฮมิเซลลูโลสถึง 50% สามารถเพิ่มค่าการย่อยสลายในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สูงถึง 95% สภาวะที่ใช้ในการพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนียคือที่อุณหภูมิ 140 - 170°C นาน 10 - 30 min (Volynets และDahman, 2011) ยิ่งไปกว่านั้นการพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนียยังมีข้อได้เปรียบคือไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งในการบวนการหมักและแอมโมเนียที่ผ่านกระบวนการพรีทรีตเมนต์ยังสามารถรีไซเคิลได้ อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนียก็มีข้อเสียเปรียบสภาวะที่เหมาะสมในการทำการพรีทรีตเมนต์ด้วยแอมโมเนียต้องใช้อุณหภูมิสูงซึ่งทำให้เกิดการใช้พลังงานในการผลิตมากกว่าระบบอื่น (Balat, 2011)

การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดเจือจาง (dilute acid pretretment)

เป็นการพรีทรีตเมนต์ที่มีลักษณะเดียวกับการพรีทรีตเมนต์แบบ liquid hot water pretreatment แต่ที่มีการเติมกรดเข้าไปในกระบวนการ กรดที่นิยมใช้ส่วนใหญ่คือกรดซัลฟูริกเข้มข้นน้อยกว่า 1% (v/v) ซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า สภาวะที่ใช้ในการทำ dilute acid pretreatment ขึ้นอยู่กับชนิดของผลผลิตที่ต้องการ หากผลผลิตที่ต้องการคือน้ำตาลไซโลสต้องใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 120 °C และใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง แต่หากต้องการน้ำตาลกลูโคสจะต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 180 °C แต่เวลาสั้นกว่าคือ 15 min ปริมาณน้ำตาลผลผลิตสูงสุดที่ได้ประมาณ 85% นอกจากนี้ได้มีการทดลองใช้กรดชนิดอื่นมาทดแทนกรดซัลฟูริก เช่น กรดฟูมาริก และ กรดมาเลอิก โดยกรดมาเลอิกสามารถให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกับการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริก การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดเป็นวิธีที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้ต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อใช้เมื่อใช้ร่วมกับวิธีการพรีทรีตเมนต์แบบ steam explosion pretreatment ในทางทฤษฎีแล้ววิธีจะให้ผลผลิตของน้ำตาลไซโลสสูงถึง 90% อย่างไรก็ตามการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดก็มีข้อเสียคือการเกิดสารเคมีบางชนิดขึ้นในปฏิกิริยาเช่น กรดอะซิติก (acetic acid) furfural หรือ Hydroxymethyl furfural (HMF) โดยสารเหล่านี้เป็นสารยับยั้ง (inhibitory compound) ในขั้นตอนย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการหมักทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง (Volynets and Dahman, 2011)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

Silverstein และคณะ (2007) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีตเมนต์ไม้จากต้นสำลี (cotton stalk) ด้วยวิธีทางเคมี 4 วิธี คือการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

และโอโซน พบว่า วิธีการพรีทรีตเมนต์ที่สามารถกำจัดลิกนินและให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สูงที่สุด การพรีทรีตเมนต์ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2.0 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 90 min นอกจากนี้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการกำจัดลิกนิน ในขณะที่การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลก็ต่อเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการพรีทรีตเมนต์เท่านั้น (Silverstein et al., 2007) Chen และคณะ (2009) ทดลองเปรียบเทียบวิธีการพรีทรีตเมนต์ด้วยวิธีทางเคมี 4 วิธีการ คือ การพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริก ปูนขาว แอมโมเนียร่วมกับกรดไฮโดรคลอริก และการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่า การกำจัดลิกนินออกไปในขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ส่งผลให้ผลผลิตในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 120°C นาน 30 min สามารถกำจัดลิกนินและเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้มากที่สุด ผลผลิตที่ได้คิดเป็นค่าการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose hydrolysis yield) สูงถึง 81.20% มากกว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยกรดซัลฟูริก ปูนขาว และ แอมโมเนีย คิดเป็น 2.1 1.6 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบจากทั้ง 4 วิธีการพบว่า การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้เกิดสารยับยั้งในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือ กรดอะซิติก (acetic acid) น้อยที่สุด (Chen et al., 2009) Duguid และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองการพรีทรีตเมนต์ซังข้าวโพด (corn cob) เปลือกข้าวโพด (corn husk) ใบข้าวโพด (corn leaf) ลำต้นส่วนล่าง (corn stalk bottom) และลำต้นส่วนบนของข้าวโพด (corn stalk top) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.4-0.8% ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง พบว่า แม้ว่าวัตถุดิบที่มาจากพืชชนิดเดียวกันแต่มาจากส่วนของลำต้นที่ไม่เหมือนกันส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน และสภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์แต่ละส่วนของต้นข้าวโพดแตกต่างกันออกไป สภาวะที่เหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์เปลือกข้าวโพดคือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.8% ให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคส สูงกว่า 90% ในขณะที่การพรีทรีตเมนต์ลำต้นข้าวโพดโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในความเข้มข้นเท่ากันกลับให้ผลผลิตของน้ำตาลกลูโคสเพียง 45% (Duguid et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์กับวัตถุดิบชนิดอื่น เช่น McIntosh และVancov (2010) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของฟางข้าวฟ่างหวาน (*Sorghum bicolor*) ด้วยการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.75 – 2.00 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 60 และ 120°C นาน 30 – 90 min พบว่า การใช้อุณหภูมิ 120°C ให้ผลผลิตของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar release) สูงกว่าการใช้อุณหภูมิ 60°C ถึง 5.6 เท่า (McIntosh and Vancov, 2010) Wang และคณะ (2010) ได้พรีทรีตเมนต์หญ้า *Cynodon dactylon* (Bermuda grass) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 – 3.0 %(w/v) นาน 15 – 90 min ที่อุณหภูมิ 121°C พบว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลต่อองค์ประกอบลิกนินของวัตถุดิบมากที่สุด รองลงมาคือเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ตามลำดับ โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นตั้นแต่ 1.0 % (w/v) นานกว่า 30 min สามารถกำจัดลิกนินได้มากกว่า 70% โดยสูญเสียน้ำตาลกลูโคสน้อยกว่า 10% เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น หลังจากที่นำวัตถุดิบที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 3 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 min ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือค่า conversion yield เท่ากับ 91.68% คิดเป็น 3 เท่าของวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการพรีทรีต (Wang et al., 2010) Xu และคณะ (2010) ได้เปรียบเทียบผล

ของอุณหภูมิที่มีผลต่อโครงสร้างทางเคมีของวัตถุดิบหญ้าสวิตช์รวมทั้งผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์จากขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ของตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 21°C และ 50°C ต้องใช้เวลานานมากกว่า 12 ชั่วโมงจึงสามารถกำจัดลิกนินออกจากวัตถุดิบ 62.9% และ 77.8% ในขณะที่การพรีทรีตเมนต์ด้วยอุณหภูมิ 121°C ใช้เวลาเพียง 0.25 – 1.0 ชั่วโมง สามารถกำจัดลิกนินออกจากวัตถุดิบได้มากถึง 85.8% หลังจากที่นำวัตถุดิบที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่า ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.0 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 min มีค่าเท่ากับ 425.4 mg/g มากกว่าวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ถึง 3.55 เท่า (Xu et al., 2010) McIntosh และ Vancov (2011) ได้ทำการพรีทรีตเมนต์ฟางข้าวฟ่างและฟางข้าวสาลีพบว่า การพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และอุณหภูมิที่ใช้ในการพรีทรีตเมนต์จะยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มากขึ้น (McIntosh and Vancov, 2010)

การย่อยสลายเซลลูโลส

ขั้นตอนการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การย่อยด้วยกรด หรือ acid hydrolysis และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ หรือ enzyme hydrolysis

การย่อยเซลลูโลสด้วยกรด

การย่อยเซลลูโลสด้วยกรด คือ การย่อยโดยใช้กรดเป็นสารเร่งปฏิกิริยา กรดที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) กรดเกลือ (hydrochloric acid) กรดไฮโดรฟลูออริก (hydrofluoric acid) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) กรดไนตริก (nitric acid) และ กรดฟอร์มิก (formic acid) แบ่งออกเป็นสองวิธี คือ การย่อยด้วยกรดเข้มข้น (concentrated acid hydrolysis) โดยความเข้มข้นของกรดที่ใช้อยู่ในระหว่าง 10 – 30% ที่อุณหภูมิต่ำ และวิธีที่สองคือการย่อยด้วยกรดเจือจาง (diluted acid hydrolysis) โดยความเข้มข้นของกรดที่ใช้เท่ากับ 2 – 5 % ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือเกิดการย่อยสลายของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของเฮมิเซลลูโลสเกิดเป็นสารยับยั้ง (inhibitory compound) ในขั้นตอนการหมัก เช่น ฟูเฟอรอล (fufural) และ ไฮดรอกซีเมทิลฟูเฟอรอล (hydroxy methyl fufural) (Verardi et al., 2012)

การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ คือ การย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้ผลผลิตคือน้ำตาลกลูโคส วิธีการย่อยดังกล่าวมีข้อได้เปรียบคือสามารถทำได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง (mind condition) และไม่มีสารที่มีฤทธิกัดกร่อน เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโสกลูคาเนส (exoglucanase) และ บีต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) เอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตได้จากเห็ดราและแบคทีเรียซึ่งเอนไซม์ที่มาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดกันประกอบด้วยชนิดของ

เอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน โดยกระบวนการย่อยในขั้นตอนแรกคือเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสในส่วนที่เป็นโครงสร้างผลึกเกิดเป็นเซลลูโลสที่มีปลายสายอิสระขึ้น (free-end cellulose) จากนั้นเอกโสกลูคาเนสเข้าไปย่อยเซลลูโลสที่มีปลายสายอิสระเกิดเป็นเซลโลไบโอส (cellobiose) จากนั้น เซลโลไบโอสจึงถูกย่อยด้วยบีต้ากลูโคซิเดสได้เป็นน้ำตาลกลูโคส (Kumar et al., 2008)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินวิจัย

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างวัชพืชทั้ง 5 ชนิดได้แก่หญ้าขัดใบยาว (*Sida acuta*) หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera*) กระถิน (*Leucaena leucocephala*) ธูปฤาษี (*Typha angustifolia*) และ หญ้ารังนก (*Chloris barbata*) เก็บรวบรวมมาจาก จังหวัดพิษณุโลก พิจิตร นครสวรรค์ ตาก อุตรดิตถ์ และ สุโขทัย มาตัดให้มีขนาดความยาวประมาณ 2-5 cm แล้วนำไปตากในที่ร่มนาน 7 วัน จากนั้นบดและร่อนตัวอย่างให้มีขนาดระหว่าง 260–425 μm

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของพืชในการทดลองนี้ ใช้วิธีมาตรฐาน National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter et al., 2008a; Sluiter et al., 2008b)

การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) และความชื้น (Moisture)

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัมลงในขวดชั่งน้ำหนักที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณดังสมการที่ 1 และ 2

ปริมาณของแข็งทั้งหมด (%) = (น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ g / น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ g) x 100 g (1)

ปริมาณความชื้น (%) = 100 - ปริมาณของแข็งทั้งหมด % (2)

การวิเคราะห์หาลิกนินที่ละลายในกรดและไม่ละลายด้วยกรด

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างลงในหลอดทดลองปริมาณ 0.3 กรัม เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 72% (w/w) ปริมาณ 3 มิลลิลิตรแล้วคนด้วยแท่งแก้วคนสารจนทั่ว แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และคนของผสมด้วยแท่งแก้วคนสารทุก 10 นาที จากนั้นถ่ายของผสมลงในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเจือจางกรดให้เหลือ 4 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ด้วยการเติมน้ำกลั่นปริมาณ 84 มิลลิลิตรในขณะเดียวกันต้องชะตัวอย่างออกจากหลอดทดลองให้หมด นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็งจนตัวอย่างมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปแยกส่วนด้วย centrifuge method ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลว (liquid fraction) ไปวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด (Acid Soluble Lignin: ASL) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และนำส่วนของแข็ง (solid fraction) ไปวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (Acid Insoluble Lignin: AIL)

การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด

นำส่วนของเหลวจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ค่าความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณลิกนินที่ละลายในกรดดังสมการที่ 3

ลิกนินที่ละลายในกรด (%) = (absorbance x 87 (ml) x ค่าเจือจาง/[110 x ปริมาณของแข็งทั้งหมด (g) x ความกว้างของเซลล์ (cm) x 100] (3)

การหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด

นำส่วนของแข็งของตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ไปล้างด้วยน้ำกลั่นร้อนจนมีค่า pH เป็นกลางด้วย centrifuge method ด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนของแข็งของตัวอย่างที่มีค่าเป็นกลางไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ จากนั้นนำตัวอย่างที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว ไปเผาที่อุณหภูมิ 575 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ชั่งและบันทึกน้ำหนักเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด ดังสมการที่ 4

ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (%) = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g) – น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (g) / ปริมาณของแข็งทั้งหมด (g) x 100 (4)

การหาปริมาณลิกนินทั้งหมด (total lignin)

ปริมาณลิกนินทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5

ปริมาณลิกนินทั้งหมด = ลิกนินที่ละลายในกรด (%)+ ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (%) (5)

การหาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide)

นำส่วนของเหลวของตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างในข้อ 2 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) ลงไปให้มีค่า pH ประมาณ 5.5-6 จากนั้นนำตัวอย่างไปแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างส่วนใส (supernatant) ไปกรองด้วยชุดกรองสำหรับกระบอกฉีดยา (syringe filter) ที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่อง HPLC Shimadzu รุ่น LC 20 AD ด้วยสภาวะ

Aminex HPX 87P Column 7.8 x 300 mm

Flow rate 0.6 ml/min

Column temperature 80 °C RI

Detector temperature 55 °C

การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1 กรัมลงในครูซิเบิ้ลที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 575 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักแล้วนำไปคำนวณดังสมการ

ปริมาณเถ้า (%) = น้ำหนักเถ้า (g) /น้ำหนักตัวอย่าง (g) x 100 (6)

การพรีทรีตเมนต์ตัวอย่างวัชพืชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0, 2.0 และ 3.0 % (w/v)

ชั่งตัวอย่างวัชพืช 3 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นจึง เติมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1, 2 และ 3 % ที่ไว้แล้วอย่างละ 24 มิลลิลิตร เสร็จแล้วปิดด้วยกระดาษฟอยล์ (aluminum foil) แล้วให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 105, 110, 115 และ 120°C นาน 60 min (การทดลองแต่ละครั้งให้แยกทำที่ละอุณหภูมิ) เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นให้ถ่ายของผสมที่เย็นแล้วลงในหลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติกขนาด 50 ml แล้วนำไปแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวที่ด้านบนของหลอดเซนติฟิวจ์ทิ้งไป จากนั้นล้างส่วนของแข็ง (solid fraction) ในหลอดด้วยน้ำกลั่นร้อนจนมีค่า pH เป็นกลาง จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และลิกนิน

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Enzymatic hydrolysis)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการพรีทรีตและตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพรีทรีต (untreated biomass) ปริมาณ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมอาไซด์ที่มีความเข้มข้น 2% เอนไซม์ Cellic CTec 2 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ 12 , 24 , 48 และ 72 ชั่วโมงเพื่อนำไปวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธี HPLC method

การวางแผนการทดลอง

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Compleately Randomized Design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 วิเคราะห์ผลแบบ one way anova แล้วเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัชพืช 5 ชนิด

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี คือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินที่ไม่ละลายในกรด ลิกนินที่ละลายในกรด และเถ้าของวัชพืชทั้ง 5 ชนิดด้วยวิธีการมาตรฐานจาก National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter et al., 2008a; Sluiter et al., 2008b) โดย วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design: CRD) และทำการทดลอง 3 ซ้ำจากนั้นนำข้อมูลของแต่ละองค์ประกอบมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ผล ดังแสดงในตาราง 1.

Table 1 Chemical composition of five weeds species

Component	*S.acuta* (% D/w)	*A.aspera* (% D/w)	*L.leucocephala* (% D/w)	*C.barbata* (% D/w)	*T.angustifolia* (% D/w)
Glucan	44.50±0.3	35.26±0.1	43.85±0.3	32.32±0.1	32.96±0.3
Xylan	14.95±0.1	9.31±0.1	13.29±0.1	18.17±0.1	11.10±0.1
Galactan	1.25 ±0.1	2.10±0.0	1.12±0.1	1.42±0.1	1.96±0.0
Extractive	7.15±0.4	5.41±0.3	5.69±0.3	8.43±0.1	10.86±0.9
Ash	5.22±0.0	9.67±0.1	3.27±0.1	13.68±0.1	13.41±0.1
AIL*	16.07±0.1	16.48±0.1	20.55±0.1	15.65±0.7	19.20±0.2
ASL**	3.48 ±0.1	4.85±0.2	2.70±0.1	5.25±0.1	5.19±0.3
Total lignin	19.55±0.8	21.33±1.5	23.25±1.1	20.90±0.8	24.38±0.5

% (D/w) = % of total dry weight. AIL* = acid insoluble lignin, ASL**= acid soluble lignin, Value are mean, ± SD (n= 3)

จากผลการทดลองตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าจากตัวอย่างวัชพืช 5 ชนิด สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณเถ้าต่ำกว่า 10% ได้แก่ พันงูขาว (9.67±0.1%) หญ้าขัดใบยาว (5.22±0.0%) และกระถินมีปริมาณเถ้าต่ำสุด (3.27±0.1%) 2) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณเถ้าสูงกว่า 10% โดยพบว่าหญ้ารังนก (13.68±0.1%) มีปริมาณเถ้าสูงสุดในกลุ่มวัชพืชที่นำมาทดสอบ รองลงมาคือ ธูปฤาษี (13.41±0.1%) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณเถ้าของวัชพืชทั้ง 5 ชนิดนี้ สูงกว่าปริมาณเถ้าที่พบในชีวมวลพืชชนิดอื่นหลายชนิด เช่น danish pine, willow, poplar, cereal straw, miscanthus และ switchgrass (McKendry, 2000) เถ้าเป็นของแข็งตกค้างจำพวกอนินทรีย์สาร (inorganic residue) ที่เกิดขึ้นจากการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) มาเผาไหม้ ในสภาวะที่มีอากาศ ปริมาณเถ้าที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของวัสดุลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด ปริมาณเถ้าเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบความเหมาะสมในการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นแหล่งพลังงานความร้อน เพราะการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มี

ปริมาณเถ้าสูงมาใช้เป็นแหล่งพลังจะทำให้มีค่าใช้จ่ายในกระบวนการแปรรูป การดำเนินงานและการกระบวนการผลิต สูงขึ้น (McKendry, 2000) นอกจากนี้แล้วยังทำให้ประสิทธิภาพการเผาไหม้ต่ำลง (Sarenbo, 2009)

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินจากตัวอย่างวัชพืชทั้ง 5 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณลิกนินต่ำกว่า 10% โดยพบว่าปริมาณลิกนินต่ำที่สุดพบได้จากธูปฤาษี (5.19±0.3%) และหญ้ารังนก (5.25±0.1%) ตามลำดับ 2) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณลิกนินสูงกว่ากว่า 10% โดยพบว่าปริมาณลิกนินสูงสุดพบได้จากกระถิน (23.25±1.1%) หญ้าพันงูขาว (21.33±0.2%) และหญ้าขัดใบยาว (19.55±0.1%) ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณลิกนินของวัชพืชทั้ง 5 ชนิดกับลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นพบ พบว่าวัชพืชเหล่านี้มีปริมาณลิกนินต่ำกว่าไม้เนื้อแข็ง เช่น Black locust, Hybrid poplar และ Eucalyptus (Balat and Balat, 2009) ไม้เนื้ออ่อนบาง เช่น spruce, pine และ hemlocks วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ sugarcane bagasse และวัชพืชบางชนิด ได้แก่ *Saccharum spontaneum*, *Lantana camara* และ *Prosopis juliflora* (Chandel and Singh, 2011) ลิกนินเป็นไบโอโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีหน่วยย่อยของ phenyl propane เป็นองค์ประกอบ ที่ไม่ใช่สารคาร์โบไฮเดรต ลิกนินพบได้ในผนังเซลพืชทุกชนิด ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับเนื้อไม้ นอกจากนี้แล้วลิกนินนี้จะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ในขั้นตอนเอนไซม์ไฮโดรไลซีส เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Adler et al., 2006; Binod et al., 2010; Hamelinck et al., 2005)

จากปริมาณเฮมิเซลลูโลสที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากตัวอย่างวัชพืชทั้ง 5 ชนิด สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่มย่อย คือ 1) กลุ่มวัชพืชที่มีเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่า 15% ได้แก่ กระถิน (14.41±0.1%) ธูปฤาษี (13.06±0.0%) และหญ้าพันงูขาวปริมาณเฮมิเซลลูโลสต่ำที่สุด (11.41±0.0%) ในกลุ่มวัชพืชที่นำมาศึกษา 2) กลุ่มวัชพืชที่มีเฮมิเซลลูโลสสูงกว่า 15% พบว่า หญ้ารังนกมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูง (19.59±0.0%) รองลองมาคือ หญ้าขัดใบยาว (16.20±0.0%) เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณลิกนินที่พบในวัชพืชทั้ง 5 ชนิดนี้ กับลิกโนเซลลูโลสชนิดอื่นๆ พบว่าปริมาณลิกนินของวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ต่ำกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หลายชนิด เช่น corn cobs, rice straw, sugar cane bagasse, wheat straw และ barley straw เป็นต้น (Abbasi and Abbasi, 2010) นอกจากนี้แล้วยังต่ำกว่าไม้เนื้อแข็งบางชนิด เช่น birch, willow และ aspen (Chandel and Singh, 2011) ไม้เนื้ออ่อน เช่น spruce และ pine และวัชพืชบางชนิด ได้แก่ *S. spontaneum*, *P. juliflora* และ *Eichhornia crassipes* รวมทั้งของเสียจากชุมชน คือ Processed paper และ Newspaper (Chandel and Singh, 2011) โดยทั่วไปแล้วเฮมิเซลลูโลส นั้นประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์หลายชนิด ตัวอย่างเช่น น้ำตาลไซโลส (xylose) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่ คาร์บอน 5 อะตอม เฮมิเซลลูโลสดังกล่าวนี้จะถูกขจัดออกไปในขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนเอนไซม์ไฮโดรไลซีส (Taherzadeh and Karimi, 2008) นอกจากนี้แล้วในขั้นตอนการพรีทรีตเมนต์ลิกโนเซลลูโลส ด้วยสภาวะที่รุนแรงด้วยกรด ส่งผลให้เฮมิเซลลูโลส บางส่วนเปลี่ยนเป็นสาร furfural ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งในขั้นตอนการหมักเอทานอล (Zhu and Pan, 2010)

จากผลการทดลองตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลสจากตัวอย่างวัชพืช สามารถแยกได้ 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสสูงมากกว่า 40% พบว่าหญ้าขัดใบยาวมีปริมาณเซลลูโลสสุด (44.50±0.3%) และรองลงมาคือ กระถิน (43.85±0.3%) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลลูโลสของวัชพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ กับลิกโนเซลลูโลส ชนิดอื่นๆ พบว่าปริมาณเซลลูโลสของวัชพืช 2 ชนิดนี้ สูงกว่าวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหลายชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล ได้แก่ sugar cane bagasse, wheat straw, barley straw, oat straw, rye straw, bamboo (Abbasi and Abbasi, 2010) และ corn stover (Chandel and Singh, 2011) 2) กลุ่มวัชพืชที่มีปริมาณเซลลูโลสต่ำกว่า 40% ได้แก่ หญ้าพันงูขาว (35.26±0.1%) ธูปฤาษี (32.96±0.3%) และหญ้ารังนกมีปริมาณเซลลูโลสต่ำที่สุด (32.32±0.1%) ตามลำดับ ปริมาณเซลลูโลสของวัชพืชในกลุ่มนี้สูงกว่า coastal bermuda grass, rye grass (early leaf), rye grass (seed setting), elephant grass, banana waste (Abbasi and Abbasi, 2010) และ switch grass (Balat and Balat, 2009) โดยทั่วไป เซลลูโลส คือไบโอโพลีเมอร์ ที่เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ภายในผนังเซลล์พืช โครงสร้างของเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเส้นใยอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม และโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส พบว่าเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสแต่ละหน่วยย่อยมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β--1,4glycosidic bound เป็นสายยาว (Kumar et al., 2009)

การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเซลลูโลส นอกจากนี้แล้ว ปริมาณเซลลูโลสและลิกนิน เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะสัดส่วนของเซลลูโลสและลิกนิน ที่อยู่ภายในชีวมวลเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการคัดเลือกชีวมวลพืชที่เหมาะเพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล นอกจากนี้แล้ว ในทางทฤษฎีแสดงให้อย่างชัดเจนว่า ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงสุดจะได้รับจากชีวมวลพืชที่มีเซลลูโลสสูงและมีปริมาณลิกนินต่ำ เพราะเซลลูโลสจะถูกไฮโดรไลซ์ ด้วยกรด หรือเอนไซม์ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นน้ำตาลกลูโคส จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการหมักโดยยีสต์หรือแบคทีเรียให้เป็นเอทานอล ดังถ้าปริมาณถ้ามีน้ำตาลกลูโคสสูงก็จะผลให้ผลิตของเอทานอลสูงขึ้นด้วยเช่นกัน (McKendry, 2000)

ผลของการพรีทรีตเมนต์วัชพืชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากการพรีทรีตตัวอย่างวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิต่างๆ (105, 110, 115 และ120°C) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (w/v) พบว่าทั้งอุณหภูมิและความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีผลกระทบต่อองค์ประกอบชีวมวลของวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่ (solid residue) เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส (xylan และ galactan) และลิกนิน ในปริมาณที่แตกต่างกัน อย่างเด่นชัดและมีนัยสำคัญ ($P < 0.5$) นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สูงขึ้นจะมีผลกระทบต่อองค์ประกอบชีวมวลของวัชพืชทั้ง 5 ชนิด มากกว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบเหมือนกันในทุกตัวอย่างพืชที่นำมาทดลอง

ผลการพรีทรีตเมนต์ที่มีต่อปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่ (solid residue)

ผลการทดลองพบว่าการพรีทรีตเมนต์วัชพืช ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% ที่อุณหภูมิ 105°C ปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่มากที่สุด ได้แก่ หญ้าขัดใบยาว (69.76±0.22 – 62.48±0.20%), กระถิน (59.16±0.52 – 51.61±1.06%), หญ้าพันงูขาว (55.27±0.33 – 47.38±0.37), หญ้ารังนก (54.93±0.34 – 36.93±0.23%) และ ธูปฤาษี (43.55±0.21 - 30.47±0.23%) ในขณะที่การพรีทรีตที่อุณหภูมิ 120°C จะปริมาณของแข็งที่เหลืออยู่น้อยที่สุด ได้แก่ หญ้าขัดใบยาว (65.79±0.24 – 58.46±0.27%), กระถิน (58.03±0.39 – 51.23±0.33%), หญ้าพันงูขาว (49.09±0.24 – 41.94±0.18), หญ้ารังนก (51.89±0.19 – 33.89±0.36%) และ ธูปฤาษี (36.63±0.19 - 23.22±0.22%) (แสดงใน ตารางที่ 1-5) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า วัชพืชกลุ่มที่มีเนื้อไม้ (หญ้าขัดใบยาวและกระถิน) มีปริมาณของแข็งเหลืออยู่มากที่สุด ตามด้วย วัชพืชกลุ่มหญ้า (หญ้าพันงูขาวและหญ้ารังนก) มีปริมาณของแข็งเหลือออยู่ในระดับปานกลาง แต่ วัชพืชน้ำ (ธูปฤาษี) จะปริมาณของแข็งเหลือออยู่ในระดับต่ำสุด ปริมาณที่ลดลงของของแข็งหรือ(solid residue) ของตัวอย่างพืชที่ถูกนำมาพรีตเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญที่จะนำมาใช้ในการประเมินความเหมาะสมในการพรีทรีตเมนต์ชีวมวลจากพืช เพราะถ้าปริมาณของแข็งเหลืออยู่น้อยก็จะส่งผลให้ปริมาณเซลลูโลสที่จะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคสในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์น้อยลงไปด้วยเช่นกัน (Zhu et al., 2006)

ผลการพรีทรีตเมนต์ที่มีต่อเซลลูโลส

จากผลการทดลองพบว่าการพรีทรีตเมนต์วัชพืช ทั้ง 5 ชนิด ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1, 2 และ 3% ที่อุณหภูมิต่างๆ (105, 110, 115 และ120°C) ผลการทดลองพบว่า คล้ายกับที่พบในการลดลงของของแข็งที่เหลืออยู่ และสามารถแบ่งวัชพืช ได้เป็น 3 กลุ่ม ตามปริมาณเซลูโลสที่เหลืออยู่ โดยแบ่งเป็นช่วง ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-3% เรียงกันเป็นลำดับ ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 เป็นวัชพืชน้ำ คือ ธูปฤาษี จะมีปริมาณเซลลูโลเหลืออยู่น้อยที่สุด 25.04±0.21-21.59±0.23% ที่ 105°C และ 19.03±0.19-14.69±0.22% ที่ 120°C, กลุ่มที่ 2 วัชพืชจำพวกหญ้า จะมีปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่ในระดับปานกลาง คือ 30.72±0.16-28.90±0.90% ที่ 105°C และ 24.88±0.13-24.29±0.03% ที่ 120°C (หญ้าพันงูขาว) และ 27.61±0.21-23.12±0.13% ที่ 105°C และ 25.30±0.26-22.45±0.26% ที่ 120°C (หญ้ารังนก) และกลุ่มที่ 3 วัชพืชที่มีเนื้อไม้ จะมีปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่ในระดับสูงที่สุด คือ 40.85±0.27-39.49±0.50% ที่ 105°C และ 39.67±0.28-37.71±0.13% ที่ 120°C (หญ้าขัดใบยาว) และ 39.80±0.23-38.23±0.14% ที่ 105°C และ 39.13±0.49-36.99±0.51% ที่ 120°C (กระถิน) ผลการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ส่งผลกระทบต่อการลดลงของเซลลูโลสของพืชแต่ละกลุ่มได้อย่างแตกต่างกัน โดยจะมีผลกระทบต่อพืชน้ำมากที่สุด รองลงมาคือวัชพืชจำพวกหญ้าและวัชพืชที่มีเนื้อไม้ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความคาดหวังในการพรีทรีตวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก็เพื่อทำให้มีปริมาณเซลลูโลสเหลืออยู่มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ พร้อมทั้งทำลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ขจัดเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสิ่งอื่นๆ

ที่ทำหน้าที่ขัดขวางการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในขั้นตอนการผลิตน้ำตาล (Alvira et al., 2010b; Behera et al., 2014; Taherzadeh and Karimi, 2008; Zhao et al., 2012a)

ผลการพรีตเมนต์ที่มีต่อเฮมิเซลลูโลส

เนื่องจากเฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลสองประเภท คือน้ำตาลโมลเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (hexose) ได้แก่ไซโลส (D-xylose) และอะราบิโนส (L-arabinose) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ แมนโนส (D-mannose) กลูโคส (D-glucose) และกาแลคโทส (D-galactose) เฮมิเซลลูโลสนี้จะเชื่อมต่ออยู่กับโครงสร้างลิกนินด้วยพันธะอีเทอร์หรือเอสเทอร์ เกิดเป็นโครงสร้าง carbohydrate – lignin complex ล้อมรอบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสจึงเป็นอุปสรรคทางกายภาพ (physical barrier) อีกชนิดหนึ่งนอกเหนือจากลิกนิน ดังนั้นจุดประสงค์หนึ่งของการพรีทรีตชีวมวล ก็เพื่อที่จะขจัดเฮมิเซลลูโลสออกไป เพื่อจะทำเกิดรูพรุน (mean pore size) ขึ้นบนพื้นผิวของซับสเตท ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้การเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกูลโคสได้ดียิ่งขึ้น (Agbor et al., 2011; Alvira et al., 2010b) จากการพรีตวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วย ที่อุณหภูมิและเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่แตกต่างกัน พบว่าการการพรีตวัชพืชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1-3% ที่ อุณหภูมิ120°C สามารถขจัด ไซแลน (xylan) และ กาแลคแตน (galactan) ออกออกจากตัวอย่างวัชพืชได้มากที่สุด โดยพบว่าตัวอย่างพืชที่สามารถขจัดไซแลนออกไปได้สูงสุดคือ ธูปฤาษี (56.94-80.63%) ตามด้วย หญ้าขัดใบยาว (56.79-63.61%), หญ้าพันงูขาว (44.85-62.23%), หญ้ารังนก (38.36-61.53%) และกระถิน (25.41-43.38%) ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 1-5) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าที่สภาวะเดียวกันนี้ สามารถขจัดกาแลคแตน (galactan) ออกจากหญ้าพันงูขาว (56.19-86.19%) ตามด้วย ธูปฤาษี (50.51-81.14%), หญ้าขัดใบยาว (27.22-80.00%), หญ้ารังนก (40.14-71.83%) และกระถิน (28.57-71.43%) ตามลำดับ (แสดงในตารางที่ 1-5) เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นแขนงและอสัณฐาน (amorphous) จึงทำให้ง่ายต่อการขจัดออกด้วยกระบวนการ physicochemical พรีทรีตเมนต์ (Agbor et al., 2011) และเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบอื่นๆที่อยู่ภายเฮมิเซลลูโลส พบว่าไซแลนสามารถขจัดออกมาได้ง่ายที่สุด (Hendriks and Zeeman, 2009)

ผลการพรีตเมนต์ที่มีต่อลิกนิน

จากการพรีทรีตวัชเมนต์วัชพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1-3% ที่อุณหภูมิ 115 และ120°C สามารถขจัดลิกนินออกไปได้ในปริมาณที่ไม่แตกกันมากนัก แต่ทว่าว่าการทดลอง ที่อุณหภูมิ 120°C สามารถขจัดลิกนินออกไปได้ในปริมาณที่สูงสุด (ตารางที่ 1-5) โดยพบว่ามีวัชพืช 3 ชนิดที่สามารถขจัดลิกนิกออกไปได้มากว่า 90% ได้แก่ เป็นวัชพืชที่อยู่ในน้ำ ธูปฤาษี (82.74-95.69%) ตามด้วยวัชพืชพวกหญ้า หญ้ารังนก (76.74%-95.08%) และหญ้าพันงูขาว (75.06-93.62%) แต่ทว่าวัชพืชอีก 2 ชนิดที่ขจัดลิกนินออกไปได้ต่ำกว่าเล็กน้อย คือ วัชพืชที่มีเนื้อไม้ กระถิน (70.75-92.43%) และหญ้าขัดใบยาว (80.61-90.84%) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าการพรีทรีตวัชพืชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

30 ... 2564
1040107

สามารถขจัดลิกนินได้แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัชพืช แต่โดยภาพรวมแล้วการพรีทรีตเมนต์นี้สามารถขจัดลิกนินออกไปได้มากว่า 85% ซึ่งถือว่าสามารถขจัดลิกนินออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปกติแล้วภายในผนังเซลล์พืช เส้นใยไมโครไฟบริวเซลลูโลส (cellulose microfibrils) จะเชื่อมติดกับเฮมิเซลลูโลสและฝังอยู่ในลิกนิน เปรียบเสมือนแท่งเหล็กที่ฝังอยู่คอนกรีต (Zhao et al., 2012b) ดังนั้นลิกนินจึงทำหน้าที่เหมือนกับอุปสรรคทางกายภาพ (physical barrier) ขัดขวางและยั้บยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ที่จะย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกูลโลส (Agbor et al., 2011; Hendriks and Zeeman, 2009; Zhao et al., 2012a) ดังนั้นเพื่อให้ขั้นตอนการทำ enzymatic hydrolysis เกิดประสิทธิภาพสูงสุด จึงเลือกสภาวะการพรีทรีตเมนต์ ที่อุณหภูมิ 120°C ที่ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-3% ไปดำเนินการต่อในขั้นต่อไป

การย่อยวัชพืชทั้งที่ผ่านการพรีทรีตและไม่ผ่านการพรีทรีตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เพื่อศึกษาผลการของอุณหภูมิและความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อการผลิตน้ำตาลกูลโคสวัชพืชที่ 5 ชนิด ทั้งที่ผ่านการพรีทรีตและไม่ผ่านการพรีทรีต ได้ถูกนำย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิ 50°C และเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 3 วัน จากการศึกษาพบว่า เมื่อนำวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ที่ไม่ผ่านการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาย่อยด้วยเอนไซม์ จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการเป็นเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกูลโคส หรือ efficiency of enzymatic hydrolysis ได้ต่ำมากอยู่ในช่วง 10.11±0.06%-15.32±0.17% ทั้งนี้ขึ้นอยู่ชนิดของพืช เช่น efficiency of enzymatic hydrolysis ของวัชพืชที่มีเนื้อไม้ คือ หญ้าขัดใบยาว (10.11±0.06%) และกระถิน (12.31±0.07%) แสดงในรูปที่ 1-2 ส่วนวัชพืชพวกหญ้า คือ หญ้ารังนก (13.65±0.11%) หญ้าและพันงูขาว (15.32±0.17%) แสดงในรูปที่ 3-4 และวัชพืชน้ำ คือ ธูปฤาษี (13.9±0.05%) แสดงในรูปที่ 5 ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ค่า efficiency of enzymatic hydrolysis ต่ำมาก เนื่องมาจากผนังเซลล์พืชมีโครงสร้างที่ซับซ้อน เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันตามธรรมชาติของสารโพลิเมอร์และสารปัจจัยอื่นอีกหลายชนิด จึงทำให้ลิกโนเซลลูโลสในธรรมชาติมีความคงทนและต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Alvira et al., 2010a; Behera et al., 2014; Zhao et al., 2012a)

หลังจากวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ถูกนำมาพรีทรีตด้วยความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-3 ที่อุณหภูมิ 120°C โดยพบว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกูลโคสจะสูงขึ้นหลังจากบ่มไว้ 24 ชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลกูลโคสจะสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง และความเข้มข้นของน้ำตาลกูลโคสจะสูงสุดที่ การบ่ม 72 ชั่วโมง นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นของน้ำตาลกูลโคสที่ผลิตได้จะเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกันไปขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และชนิดของวัชพืช จากผลการทดลอง enzymatic hydrolysis วัชพืช 4 ชนิด พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงขึ้น ส่งผลให้ efficiency of enzymatic hydrolysis สูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าที่ความเข้มข้น 3% จะให้ efficiency of enzymatic hydrolysis สูงที่สุด คือ 91.54±0.39% สำหรับธูปฤาษี (รูปที่ 5), 90.13±0.35% สำหรับหญ้าพันงูขาว (รูปที่ 4), 89.29±0.24% สำหรับหญ้าขัดใบยาว (รูปที่ 1) และ 72.01±0.09% สำหรับหญ้ารังนก (รูปที่ 3) ตามลำดับ แต่ทว่าในกรณีของกระถิน พบว่า

efficiency of enzymatic hydrolysis สูงสุด (90.77±0.73%) เมื่อพรีทรีตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1% และเมื่อความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงขึ้น ถึง 2% (90.54±0.48%) และ 3% (89.75±1.22%) พบว่า efficiency of enzymatic hydrolysis ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าลิกนินเป็นปัจจัยหลักที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสดังเมื่อลิกนินถูกขจัดออกไปจึงส่งผลให้ efficiency of enzymatic hydrolysis เพิ่มสูงขึ้นมาก อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับวัชพืชที่ไม่ถูกพรีทรีตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sun and Cheng, 2002) นอกจากนี้แล้วยังมีปัจจัยอื่นอีกที่ทำให้ efficiency of enzymatic hydrolysis ไม่เพิ่มขึ้นจนถึง 100% ได้แก่ การเข้าถึงพื้นที่ผิวด้านหน้าของเซลลูโลส (accessible surface area) และโครงสร้างผลึกที่ยังหลงเหลืออยู่บางส่วนหลังจากการพรีทรีตเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Taherzadeh and Karimi, 2008; Zhao et al., 2012b)

นอกจากนี้แล้วยังพบว่า efficiency of enzymatic hydrolysis ของวัชพืชทั้ง 5 ชนิดที่นำมาทดลองนในครั้งนี้สูงกว่า พืชชนิดอื่นๆ ที่ถูกพรีทรีตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีรายงานไว้ ดังนี้คือ poplar (41.5%) (Rawat et al., 2013), *Typha angusitifolia* (55.3%) (Ruangmee and Sangwichien, 2013), wheat straw (39.4%) และ sugarcan bagasse (55.1%) (Zhang et al., 2011), oil palm mesocarp fiber (60.0%) (Iberahim et al., 2013) และ *Imperata cylindrical* (70.0%) (Haque et al., 2016).

อย่างไรก็ตามเพื่อให้งานวิจัยได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในระดับนานาชาติ ควรที่จะทำการทดลองเพิ่มเติมผลการทดลองในส่วนของ enzymatic hydrolysis พร้อมทั้งทำการศึกษาโครงสร้างวัชพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนและศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ทั้งก่อนและหลังพรีทรีตเมนต์

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การพรีทรีตเมนต์วัชพืชทั้ง 5 ด้วยการใช้ความร้อนภายใต้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 120°C ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-3% ทำให้สามารถขจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ออกไปจากตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีนัยสำคัญอย่างยิ่ง จึงส่งผล efficiency of enzymatic hydrolysis สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างวัชพืชที่ไม่ผ่านการพรีทรีเมนต์ โดยพบว่าที่การพรีทรีตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3% ส่งผลให้ efficiency of enzymatic hydrolysis ของ ธูปฤาษี (91.54±0.39%), หญ้าพันงูขาว (90.13±0.35%), หญ้าขัดใบยาว (89.29±0.24%) และหญ้ารังนก (72.01±0.09%) สูงขึ้น ตามลำดับ แต่ในกรณีของกระถิน พบว่าการพรีทรีเมนต์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เพียง 1% ส่งผลให้ efficiency of enzymatic hydrolysis สูงขึ้นถึง 90.77±0.73%

Table 1 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Achyranthes aspera* for 60 mins

Temperature (°C)	NaOH (%)	Solid residue (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Galactan (%)	Lignin (%)
Untreated		100±00^{a}	35.26±0.39^{a}	9.32±0.11^{a}	2.10±0.03^{a}	21.33±0.08^{a}
105	1	55.27±0.33^{b}	30.72±0.16^{b}(12.88%)	6.28±0.13^{b}(32.62%)	1.19±0.02^{b}(43.33%)	6.40±0.09^{b}(70.00%)
	2	48.68±0.48^{c}	29.70±0.37^{c}(15.77%)	5.21±0.26^{c}(44.10%)	0.58±0.02^{c}(72.38%)	3.31±0.06^{c}(84.48%)
	3	47.38±0.37^{d}	28.90±0.90^{d}(18.04%)	4.60±0.11^{d}(50.64%)	0.45±0.03^{d}(78.57%)	2.01±0.06^{d}(90.58%)
110	1	54.59±0.44^{e}	30.14±0.11^{e}(14.52%)	5.97±0.08^{e}(35.94%)	1.11±0.03^{e}(47.14%)	6.13±0.08^{e}(71.26%)
	2	48.57±0.41^{f}	28.45±0.10^{f}(19.31%)	4.87±0.09^{f}(47.75%)	0.43±0.02^{f}(79.52%)	3.18±0.06^{f}(85.09%)
	3	45.43±0.30^{g}	27.72±0.15^{g}(21.38%)	4.00±0.15^{g}(57.08%)	0.32±0.02^{g}(87.76%)	1.91±0.06^{g}(91.04%)
115	1	50.66±0.29^{h}	24.92±0.13^{h}(29.32%)	5.37±0.10^{h}(42.38%)	0.95±0.02^{h}(54.76%)	5.56±0.06^{h}(73.93%)
	2	47.35±0.40^{i}	24.64±0.18^{i}(30.12%)	4.60±0.10^{i}(50.64%)	0.53±0.02^{i}(74.76%)	2.99±0.05^{i}(85.98%)
	3	42.05±0.22^{j}	24.40±0.13^{j}(30.80%)	3.95±0.08^{j}(57.62%)	0.30±0.02^{j}(85.71%)	1.67±0.07^{j}(92.17%)
120	1	49.09±0.24^{k}	24.88±0.13^{h}(29.44%)	5.14±0.10^{k}(44.85%)	0.92±0.02^{k}(56.19%)	5.32±0.06^{k}(75.06%)
	2	47.26±0.47^{l}	24.47±0.25^{i}(30.60%)	4.34±0.07^{l}(53.43%)	0.43±0.03^{l}(79.52%)	2.90±0.09^{l}(86.40%)
	3	41.94±0.18^{m}	24.29±0.03^{j}(31.11%)	3.52±0.17^{m}(62.23%)	0.29±0.02^{m}(86.19%)	1.36±0.09^{m}(93.62%)

Note: Data are mean, ± standard deviation and n=3. Means in the same column with different letters differ statistically at P<0.05. In brackets (----) is amount of each component removed during pretreatment.

Table 2 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Chloris barbata* for 60 mins

Temperature (°C)	NaOH (%)	Solid residue (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Galactan (%)	Lignin (%)
Untreated		100±00^{a}	32.32±0.11^{a}	18.17±0.10^{a}	1.42±0.05^{a}	20.90±0.11^{a}
105	1	54.93±0.34^{b}	27.61±0.21^{b}(14.57%)	11.99±0.09^{b}(34.01%)	1.12±0.03^{b}(21.13%)	6.28±0.07^{b}(69.95%)
	2	40.63±0.45^{c}	24.51±0.17^{c}(24.16%)	9.47±0.19^{c}(47.88%)	0.60±0.02^{c}(57.75%)	2.92±0.10^{c}(86.03%)
	3	36.93±0.23^{d}	23.12±0.13^{d}(28.46%)	7.37±0.14^{d}(59.44%)	0.48±0.01^{d}(66.20%)	1.64±0.08^{d}(92.15%)
110	1	52.94±0.23^{e}	27.27±0.24^{b}(15.62%)	11.68±0.16^{c}(35.72%)	0.99±0.06^{e}(30.28%)	5.81±0.09^{e}(72.20%)
	2	38.72±0.45^{f}	24.42±0.22^{c}(24.44%)	9.18±0.15^{f}(49.78%)	0.55±0.01^{f}(61.27%)	2.65±0.07^{f}(87.32%)
	3	35.33±0.46^{g}	22.64±0.28^{d}(29.95%)	7.28±0.12^{g}(59.93%)	0.44±0.02^{g}(69.01%)	1.43±0.07^{g}(93.15%)
115	1	52.45±0.43^{h}	25.43±0.32^{e}(21.32%)	11.37±0.16^{h}(37.42%)	0.95±0.03^{eh}(33.10%)	5.43±0.07^{h}(74.02%)
	2	38.41±0.24^{i}	23.43±0.30^{f}(27.51%)	9.07±0.09^{i}(50.08%)	0.54±0.01^{fi}(61.97%)	2.38±0.09^{i}(88.61%)
	3	34.14±0.16^{j}	22.57±0.25^{g}(30.17%)	7.03±0.08^{j}(61.31%)	0.42±0.01^{gj}(70.42%)	1.19±0.08^{j}(94.30%)
120	1	51.89±0.19^{k}	25.30±0.26^{e}(21.72%)	11.20±0.09^{k}(38.36%)	0.85±0.06^{h}(40.14%)	4.86±0.12^{k}(76.74%)
	2	38.25±0.33^{l}	23.33±0.26^{f}(27.81%)	8.48±0.12^{l}(53.33%)	0.52±0.02^{i}(63.38%)	2.17±0.07^{l}(89.62%)
	3	33.89±0.36^{m}	22.45±0.26^{g}(30.54%)	6.99±0.08^{m}(61.53%)	0.40±0.02^{j}(71.83%)	1.03±0.05^{m}(95.08%)

Note: Data are mean, ± standard deviation and n=3. Means in the same column with different letters differ statistically at P<0.05. In brackets (----) is amount of each component removed during pretreatment.

Table 3 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Leucaena leucocephala* for 60 mins

Temperature (°C)	NaOH (%)	Solid residue (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Galactan (%)	Lignin (%)
Untreated		100±00^{a}	43.85±0.26^{a}	13.30±0.12^{a}	1.12±0.05^{a}	23.25±0.05^{a}
105	1	59.16±0.52^{b}	39.80±0.23^{b}(9.24%)	10.21±0.20^{b}(23.23%)	1.07±0.02^{b}(4.46%)	7.75±0.06^{b}(66.67%)
	2	55.55±0.37^{c}	38.72±0.39^{c}(11.70%)	9.17±0.21^{c}(31.05%)	0.95±0.02^{c}(15.18%)	4.33±0.05^{c}(81.38%)
	3	51.61±1.06^{d}	38.23±0.14^{d}(12.82%)	8.21±0.18^{d}(38.27%)	0.70±0.02^{d}(37.50%)	2.43±0.04^{d}(89.55%)
110	1	59.03±0.37^{be}	39.65±0.14^{be}(9.58%)	10.11±0.11^{be}(23.98%)	1.05±0.02^{b}(6.25%)	7.70±0.05^{e}(66.88%)
	2	54.50±0.57^{cf}	38.59±0.38^{cf}(12.00%)	9.14±0.24^{cf}(31.28%)	0.93±0.03^{c}(16.69%)	4.16±0.07^{f}(82.11%)
	3	51.46±0.27^{dg}	38.09±0.14^{dg}(13.13%)	7.61±0.20^{dg}(42.78%)	0.68±0.02^{d}(39.28%)	2.29±0.05^{g}(90.15%)
115	1	58.99±0.24^{e}	39.40±0.37^{ch}(10.15%)	9.96±0.12^{e}(25.11%)	0.83±0.01^{e}(25.89%)	7.26±0.06^{h}(68.77%)
	2	53.36±0.26^{f}	38.43±0.53^{fi}(12.36%)	9.06±0.24^{f}(31.88%)	0.63±0.02^{f}(43.75%)	3.94±0.04^{i}(83.05%)
	3	51.34±0.33^{g}	36.99±0.61^{gj}(15.64%)	7.59±0.19^{g}(42.93%)	0.34±0.02^{g}(69.64%)	1.97±0.06^{j}(91.53%)
120	1	58.03±0.39^{e}	39.13±0.49^{h}(10.76%)	9.92±0.13^{e}(25.41%)	0.80±0.01^{e}(28.57%)	6.80±0.07^{k}(70.75%)
	2	54.12±0.24^{f}	38.02±0.64^{i}(13.29%)	8.72±0.16^{f}(34.44%)	0.60±0.02^{f}(46.43%)	3.77±0.05^{l}(83.78%)
	3	51.23±0.33^{g}	36.99±0.51^{j}(15.64%)	7.53±0.12^{g}(43.38%)	0.32±0.01^{g}(71.43%)	1.76±0.05^{m}(92.43%)

Note: Data are mean, ± standard deviation and n=3. Means in the same column with different letters differ statistically at P<0.05.
In brackets (----) is amount of each component removed during pretreatment.

Table 4 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Sida acuta* for 60 mins

Temperature (°C)	NaOH (%)	Solid residue (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Galactan (%)	Lignin (%)
Untreated		100±00[a]	44.50±0.27[a]	14.95±0.12[a]	1.25±0.03[a]	19.55±0.04[a]
105	1	69.76±0.22[b]	40.85±0.27[b](8.20%)	10.88±0.20[b](27.22%)	0.66±0.03[b](47.20%)	7.42±0.02[b](62.05%)
	2	65.98±0.50[c]	40.43±0.21[c](9.15%)	9.47±0.15[c](36.66%)	0.56±0.03[c](55.20%)	3.90±0.05[c](80.05%)
	3	62.48±0.20[d]	39.49±0.50[d](11.26%)	8.14±0.17[d](45.45%)	0.38±0.02[d](96.60%)	2.30±0.03[d](88.24%)
110	1	69.45±0.21[e]	40.46±0.27[b](9.08%)	10.74±0.26[b](28.16%)	0.63±0.02[b](49.60%)	6.77±0.04[e](65.37%)
	2	63.19±0.50[f]	40.14±0.19[c](9.80%)	9.68±0.19[c](36.66%)	0.54±0.02[c](56.80%)	3.82±0.03[f](80.64%)
	3	60.18±0.22[g]	39.13±0.28[d](12.07%)	7.96±0.22[d](46.76%)	0.37±0.02[d](70.40%)	2.04±0.01[g](89.57%)
115	1	67.32±0.50[h]	39.98±0.17[e](10.16%)	6.79±0.34[e](54.58%)	0.53±0.02[e](57.60%)	6.03±0.03[h](69.16%)
	2	62.36±0.56[i]	38.28±0.37[f](13.98%)	5.76±0.26[f](61.47%)	0.45±0.03[f](64.00%)	3.38±0.05[i](82.71%)
	3	58.83±0.21[j]	37.86±0.14[g](14.92%)	5.62±0.14[g](62.41%)	0.26±0.02[g](79.20%)	1.81±0.03[j](90.74%)
120	1	65.79±0.24[k]	39.67±0.28[e](10.85%)	6.46±0.20[e](56.79%)	0.52±0.02[e](27.22%)	3.79±0.02[k](80.61%)
	2	60.95±0.29[l]	38.11±0.41[f](14.36%)	5.68±0.13[f](62.00%)	0.44±0.02[f](58.40%)	2.36±0.02[l](87.93%)
	3	58.46±0.27[m]	37.71±0.13[g](15.26%)	5.44±0.18[g](63.61%)	0.25±0.02[g](80.00%)	1.79±0.05[m](90.84%)

Note: Data are mean, ± standard deviation and n=3. Means in the same column with different letters differ statistically at P<0.05
In brackets (----) is amount of each component removed during pretreatment.

Table 5 Effect of various temperatures and sodium hydroxide (NaOH) concentrations on chemical composition after pretreatment of *Typha angustifolia* for 60 mins

Temperature (°C)	NaOH (%)	Solid residue (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Galactan (%)	Lignin (%)
Untreated		100±00^{a}	32.96±0.28^{a}	11.10±0.06^{a}	1.96±0.05^{a}	24.39±0.23^{a}
105	1	43.55±0.21^{b}	25.04±0.35^{b}(24.03%)	5.68±0.16^{b}(48.83%)	1.36±0.09^{b}(30.61%)	5.82±0.15^{b}(76.14%)
	2	33.31±0.23^{c}	21.97±0.23^{c}(33.34%)	3.97±0.21^{c}(64.23%)	0.81±0.08^{c}(58.67%)	2.75±0.18^{c}(88.72%)
	3	30.47±0.23^{d}	21.59±0.41^{d}(34.50%)	3.15±0.12^{d}(71.62%)	0.47±0.06^{d}(76.02%)	1.70±0.12^{d}(93.03%)
110	1	43.28±0.23^{e}	24.19±0.31^{e}(26.61%)	5.15±0.08^{e}(53.60%)	1.23±0.05^{e}(37.24%)	5.67±0.16^{b}(76.75%)
	2	33.23±0.22^{f}	21.74±0.10^{f}(34.04%)	3.69±0.18^{f}(66.76%)	0.73±0.05^{f}(62.75%)	2.58±0.19^{c}(89.42%)
	3	29.76±0.23^{g}	20.70±0.31^{g}(37.20%)	2.93±0.13^{g}(73.60%)	0.42±0.05^{g}(78.57%)	1.65±0.13^{d}(93.23%)
115	1	39.03±0.21^{h}	19.78±0.15^{g}(39.99%)	5.05±0.09^{h}(54.50%)	1.04±0.05^{h}(46.94%)	4.68±0.17^{e}(80.81%)
	2	32.65±0.23^{i}	19.55±0.25^{i}(40.69%)	3.13±0.10^{i}(71.80%)	0.62±0.05^{i}(68.37%)	2.50±0.18^{f}(89.75%)
	3	27.38±0.20^{j}	17.33±0.22^{j}(47.42%)	2.76±0.18^{j}(75.13%)	0.38±0.05^{j}(80.61%)	1.37±0.18^{g}(94.38%)
120	1	36.63±0.19^{k}	19.03±0.36^{k}(42.26%)	4.78±0.19^{k}(56.94%)	0.97±0.05^{h}(50.51%)	4.21±0.16^{h}(82.74%)
	2	31.72±0.17^{l}	18.90±0.16^{l}(42.66%)	2.30±0.21^{l}(79.28%)	0.59±0.06^{i}(69.90%)	2.33±0.23^{i}(90.45%)
	3	23.22±0.22^{m}	14.69±0.12^{m}(55.43%)	2.15±0.10^{m}(80.63%)	0.35±0.05^{j}(81.14%)	1.05±0.12^{j}(95.69%)

Note: Data are mean, ± standard deviation and n=3. Means in the same column with different letters differ statistically at P<0.05. In brackets (----) is amount of each component removed during pretreatment.

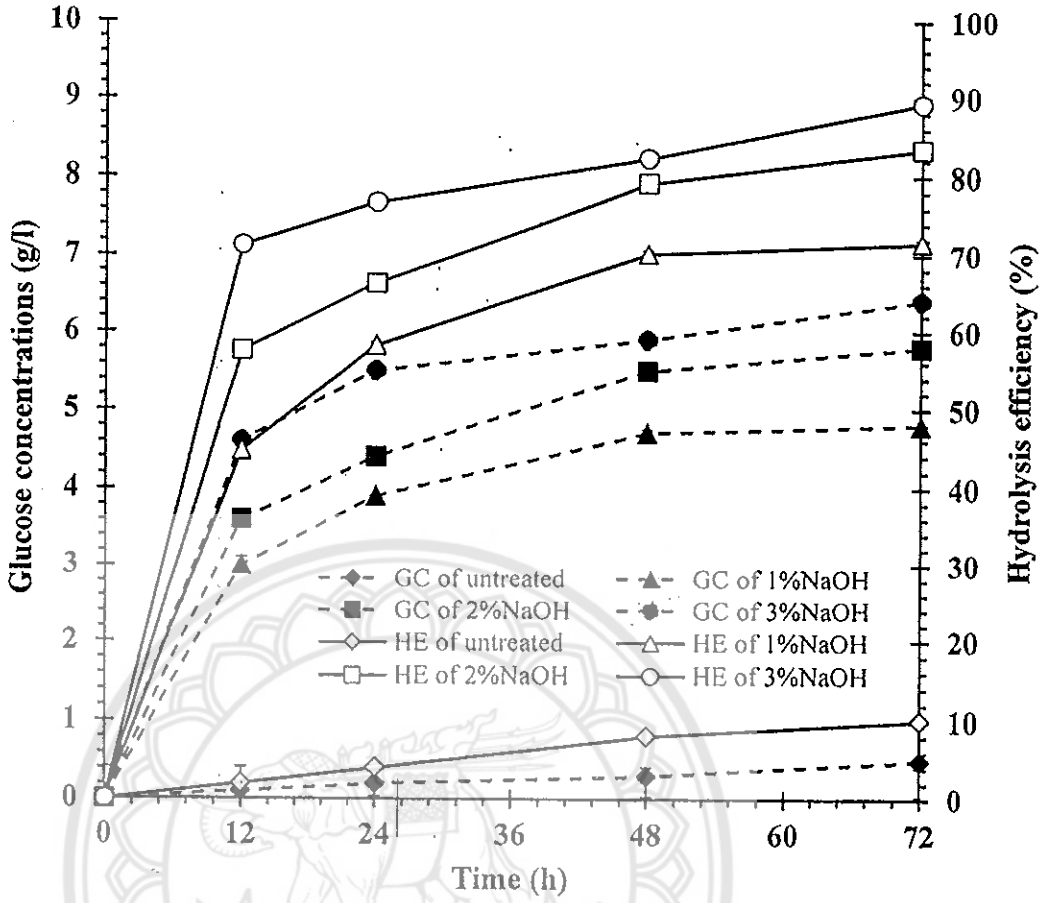

Fig. 1 Time course of hydrolysis efficiency of *Seda acuta* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C.

Note: HE, hydrolysis efficiency; GC, glucose concentrations.

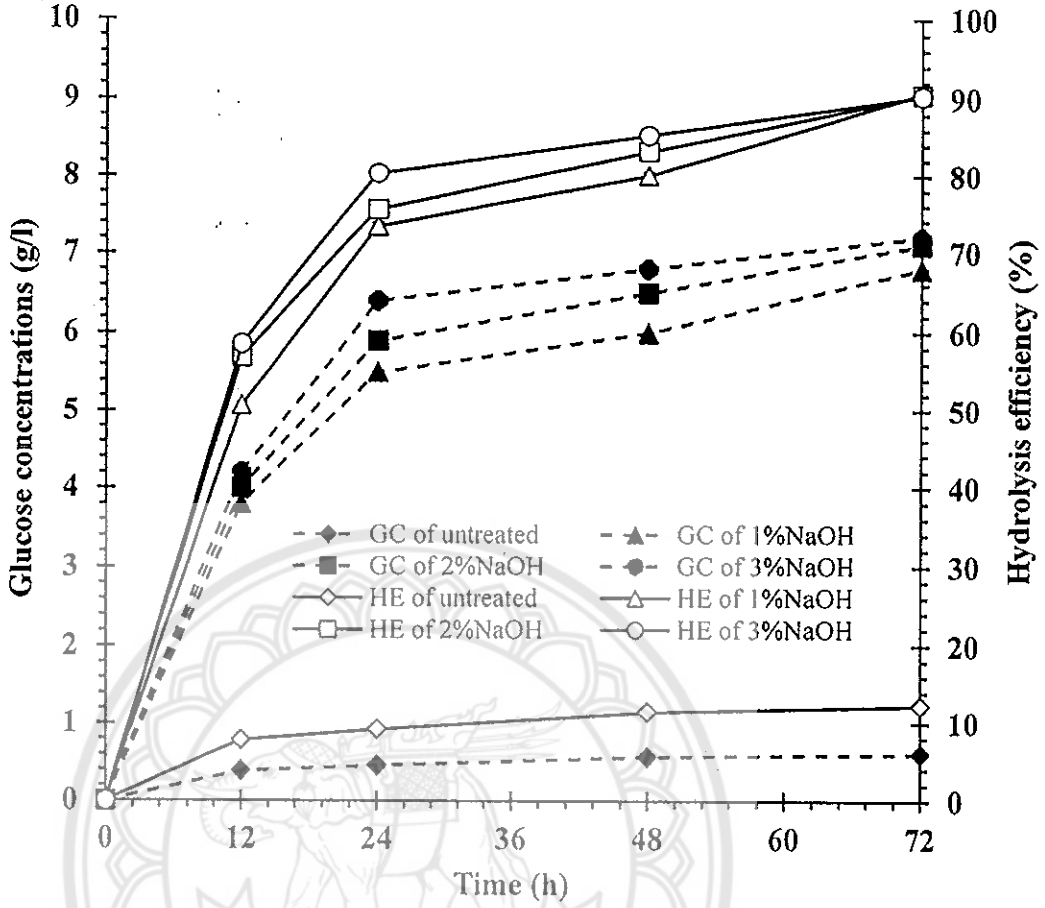

Fig. 2 Time course of hydrolysis efficiency of *Leucaena leucocephala* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C.

Note: HE, hydrolysis efficiency; GC, glucose concentrations.

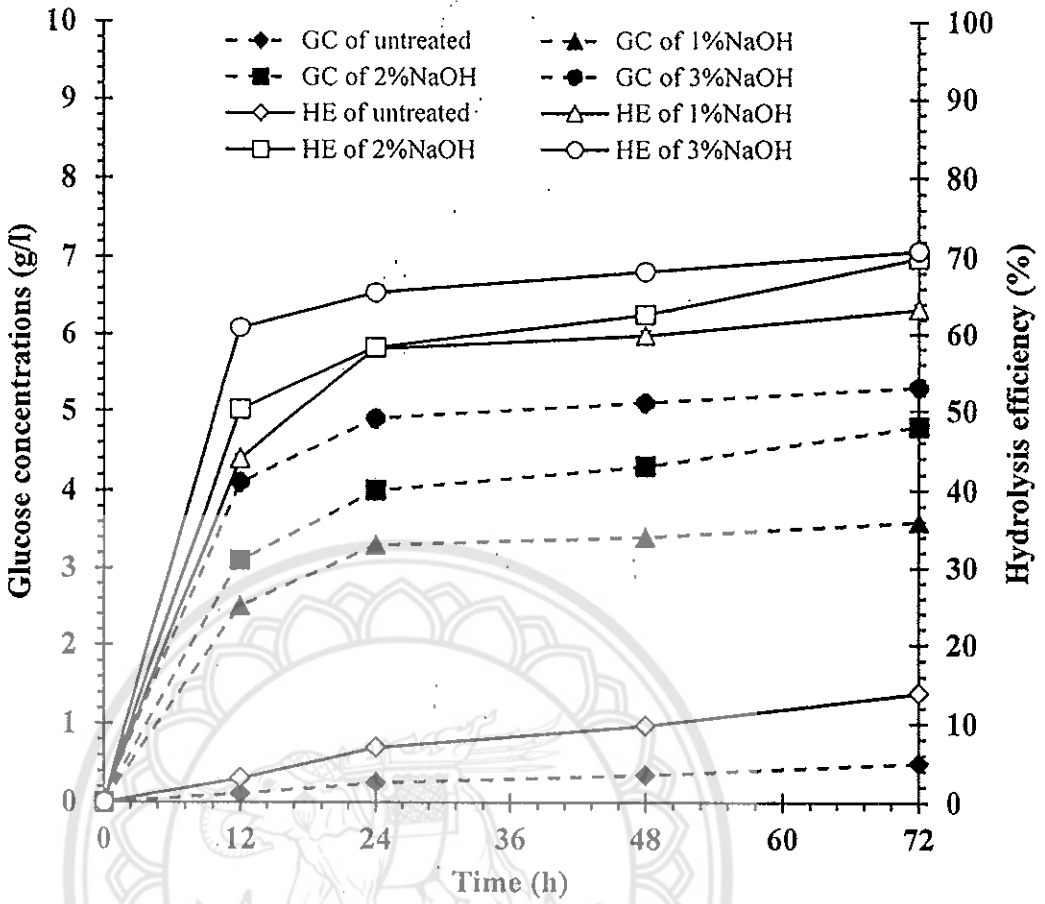

Fig. 3 Time course of hydrolysis efficiency of *Chlois babata* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C.
Note: HE, hydrolysis efficiency; GC, glucose concentrations.

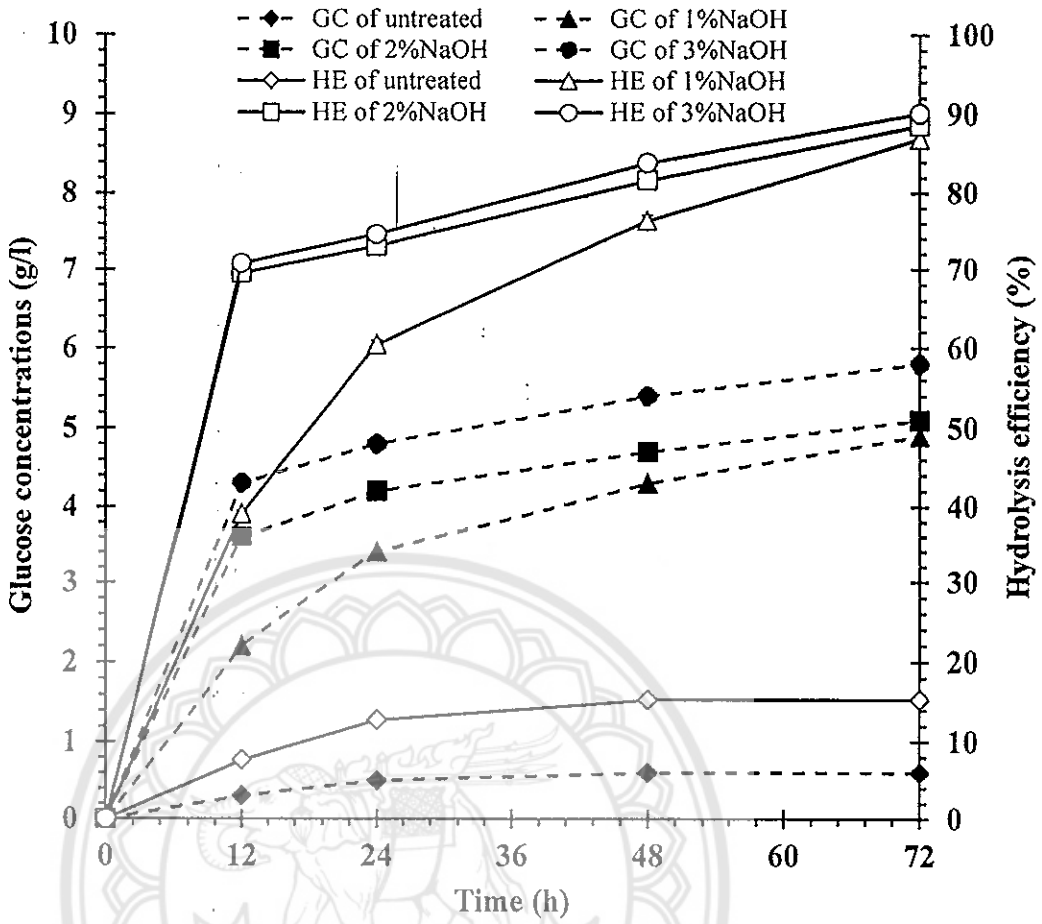

Fig. 4 Time course of hydrolysis efficiency of *Achyranthes aspera* pretreatment with various concentrations of sodiumhydroxide at 120°C.

Note: HE, hydrolysis efficiency; GC, glucose concentrations.

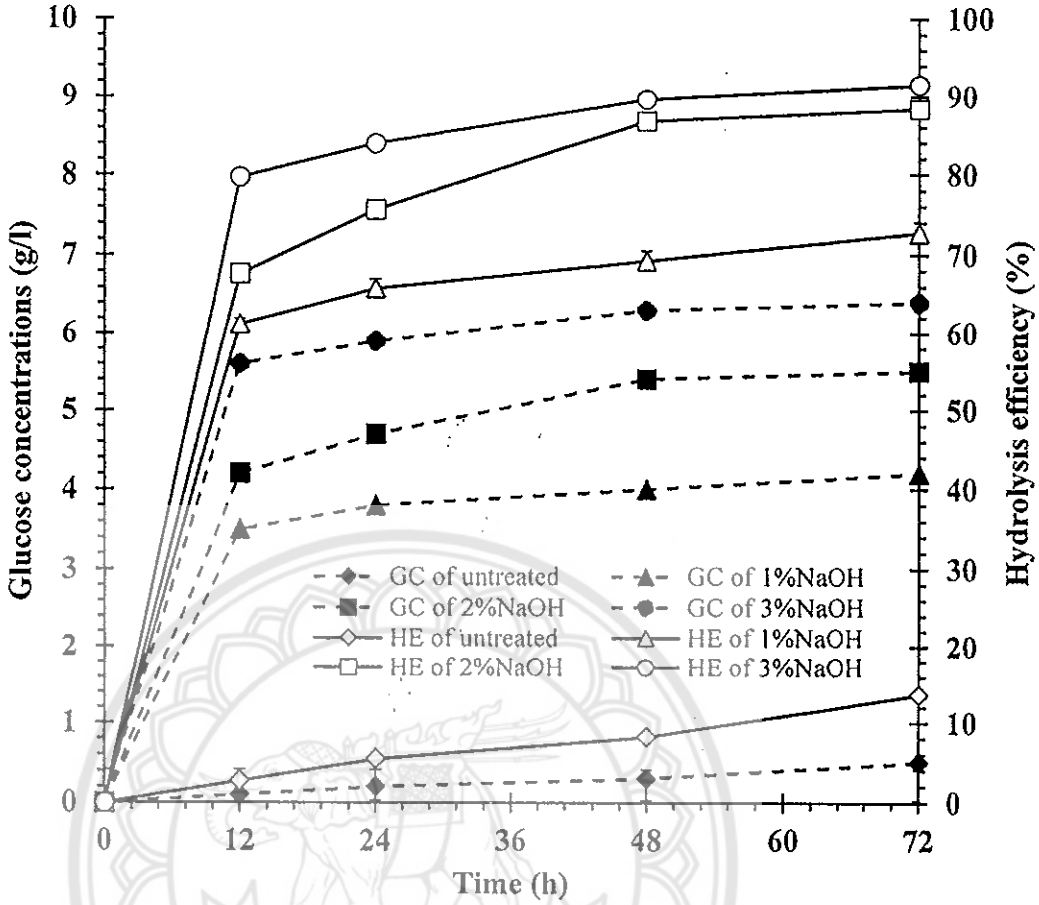

Fig. 5 Time course of hydrolysis efficiency of *Typha angustifolia* pretreatment with various concentrations of sodium hydroxide at 120°C.

Note: HE, hydrolysis efficiency; GC, glucose concentrations.

ดวงพร สุวรรณกุล และ รังสิต สุวรรณเขตนิคม 1995. วัชพืชในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 438 หน้า

ดวงพร สุวรรณกุล 2000. ชีววิทยาวัชพืช: พื้นฐานการจัดการวัชพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 178 หน้า

Abbasi, T. and Abbasi, S.A., 2010. Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. Renewable Sustainable Energy Rev., 14(3): 919-937.

Adler, P.R., Sanderson, M.A., Boateng, A.A., Weimer, P.J. and Jung, H.-J.G., 2006. Biomass yield and biofuel quality of switchgrass harvested in fall or spring. Agron. J., 98(6): 1518-1525.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Biotechnol. Adv., 29(6): 675-685.

Akoh, C.C., Chang, S.-W., Lee, G.-C. and Shaw, J.-F., 2008. Biocatalysis for the production of industrial products and functional foods from rice and other agricultural produce. J. Agric. Food. Chem., 56(22): 10445-10451.

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. Bioresour. Technol., 101.

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Energy Convers. Manage., 52(2): 858-875.

Balat, M. and Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Appl. Energy, 86(11): 2273-2282.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N. and Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable Sustainable Energy Rev., 36(0): 91-106.

Binod, P. et al., 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresour. Technol., 101(13): 4767-4774.

Brodeur, G. et al., 2011. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. Enzyme Research: 1-17.

Buranov, A.U. and Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. Indus. Crops. Prod., 28: 237–259.

Cao, W., Sun, C., Liu, R., Yin, R. and Wu, X., 2012. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. Bioresour. Technol., 111: 215-221.

Chandel, A. and Singh, O., 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. Appl. Microbiol. Biotechnol., 89(5): 1289-1303.

Chen, M., Zhao, J. and Xia, L., 2009. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. Biomass and Bioenergy, 33(10): 1381-1385.

Chingulpitak, S. and Wongwises, S., 2014. Critical review of the current status of wind energy in Thailand. Renewable Sustainable Energy Rev., 31: 312-318.

Demirbas, A., 2011. Competitive liquid biofuels from biomass. Appl. Energy, 88(1): 17-28.

Duguid, K.B. et al., 2009. Effect of anatomical fractionation on the enzymatic hydrolysis of acid and alkaline pretreated corn stover. Bioresour. Technol., 100(21): 5189-5195.

Haghighi Mood, S. et al., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renewable Sustainable Energy Rev., 27: 77-93.

Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.v. and Faaij, A.P.C., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. Biomass and Bioenergy, 28(4): 384-410.

Haque, M.A., Barman, D.N., Kim, M.K., Yun, H.D. and Cho, K.M., 2016. Cogon grass (Imperata cylindrica), a potential biomass candidate for bioethanol: cell wall structural changes enhancing hydrolysis in a mild alkali pretreatment regime. J. Sci. Food Agric., 96(5): 1790-1797.

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L. and Bakker, R., 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. 9085857570, Wageningen UR Food & Biobased Research.

Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol., 100(1): 10-18.

Iberahim, N.I., Jahim, J.M., Harun, S., Nor, M.T.M. and Hassan, O., 2013. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. IJCEA, 3(4): 101-105.

Joshi, B. et al., 2011. Lignocellulosic ethanol production: current practices and recent developments. Biotechnol. Mol. Biol. Rev., 6(8): 172-182.

Ko, J.K., Kim, Y., Ximenes, E. and Ladisch, M.R., 2015. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Bioeng., 112(2): 252-62.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind. Eng. Chem. Res., 48(8): 3713-3729.

Kumar, R., Singh, S. and Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35(5): 377-391.

Limayem, A. and Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Prog. Energy Combust. Sci., 38(4): 449-467.

McIntosh, S. and Vancov, T., 2010. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. Bioresour. Technol., 101(17): 6718-6727.

McKendry, P., 2000. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresour. Technol., 83(1): 37-46.

Mussatto, S.I. et al., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnol. Adv., 28(6): 817-830.

Nguyen, T.L.T., Gheewala, S.H. and Garivait, S., 2008. Full chain energy analysis of fuel ethanol from cane molasses in Thailand. Appl. Energy, 85(8): 722-734.

Nigam, P.S. and Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. Prog. Energy Combust. Sci., 37(1): 52-68.

Njoku, S.I., Iversen, J.A., Uellendahl, H. and Ahring, B.K., 2013. Production of ethanol from hemicellulose fraction of cocksfoot grass using pichia stipitis. Sustain. Chem. Process., 1(1): 13.

Perez, S. and Mazeau, K., 2004. Conformations, structures and morphologies of celluloses, Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Dekker, pp. 41-68.

Ping, Y., Ling, H.-Z., Song, G. and Ge, J.-P., 2013. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. Biochem. Eng. J., 75: 86-91.

Premjet, S., Pumira, B. and Premjet, D., 2013. Determining the potential of inedible weed biomass for bio-energy and ethanol production BioRes., 8(1): 701-716.

Rawat, R., Kumbhar, B.K. and Tewari, L., 2013. Optimization of alkali pretreatment for bioconversion of poplar (*Populus deltoides*) biomass into fermentable sugars using response surface methodology. Ind. Crops. Prod., 44: 220-226.

Ruangmee, A. and Sangwichien, C., 2013. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of narrow-leaf cattail for bioethanol production. Energy Convers. Manage., 73: 381-388.

Sarenbo, S., 2009. Wood ash dilemma-reduced quality due to poor combustion performance. Biomass Bioenergy, 33(9): 1212-1220.

Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D. and Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. Bioresour. Technol., 98(16): 3000-3011.

Sluiter, A. et al., 2008a. Determination of Structuralin Biomass Carbohydrates and Lignin, Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory.Technical Report NREL/TP-510-42618. p 1-17.

Sluiter, A., Hyman, D., Payne, C. and Wolfe, J., 2008b. Determination of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Material, Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL).Technical Report NREL/TP-510-42627. p 1-9.

Sorapipatana, C. and Yoosin, S., 2011. Life cycle cost of ethanol production from cassava in Thailand. Renewable Sustainable Energy Rev., 15(2): 1343-1349.

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

Taherzadeh, M. and Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. Int. J. Mol. Sci., 9(9): 1621-1651.

Toksoy Öner, E., Oliver, S.G. and Kırdar, B., 2005. Production of ethanol from starch by respiration-deficient recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 71(10): 6443-6445.

Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E. and Calabrò, V., 2012. Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives. In: Prof, Marco, Aurelio and P. Lima (Editors), Bioethanol. InTech, pp. 95-122.

Volynets, B. and Dahman, Y., 2011. Assessment of pretreatments and enzymatic hydrolysis of wheat straw as a sugar source for bioprocess industry. IJEE, 2(3). 427-446.

Wada, M., Nishiyama, Y., Chanzy, H., Forsyth, T. and Langan, P., 2012. The structure of celluloses. Powder Diffr., 23(2): 92-95.

Wan, C. and Li, Y., 2010. Microbial delignification of corn stover by Ceriporiopsis subvermispora for improving cellulose digestibility. Enzyme. Microb. Technol., 47(1): 31-36.

Wan, C., Zhou, Y. and Li, Y., 2011. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. Bioresour. Technol., 102(10): 6254-6259.

Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P. and Cheng, J.J., 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. Bioresour. Technol., 101(10): 3583-3585.

Wattana, S., 2014. Bioenergy development in Thailand: Challenges and strategies. Energy Procedia, 52: 506-515.

Wyman, C., 1996. Handbook on bioethanol: production and utilization. CRC press.

Wyman, C.E. et al., 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. Bioresour. Technol., 96(18): 1959-1966.

Xu, J. and Cheng, J.J., 2011. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. Bioresour. Technol., 102(4): 3861-3868.

Xu, J., Cheng, J.J., Sharma-Shivappa, R.R. and Burns, J.C., 2010. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. Energy Fuels, 24(3): 2113-2119.

Xu, J., Zhang, X. and Cheng, J.J., 2012. Pretreatment of corn stover for sugar production with switchgrass-derived black liquor. Bioresour. Technol., 111: 255-260.

Zhang, B., Shahbazi, A. and Wang, L., 2010. Alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of cattails from constructed wetlands. AJEAS, 3(2): 328-332.

Zhang, Y., Liu, Y.-Y., Xu, J.-L., Yuan, Z.-H. and Zhuang, X.-S., 2011. High solid and low enzyme loading based saccharification of agricultural biomass. BioRes., 7(1): 345-353.

Zhao, X., Zhang, L. and Liu, D., 2012a. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Biofuels, Bioprod. Biorefin., 6(4): 465-482.

Zhao, X., Zhang, L. and Liu, D., 2012b. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. Biofuels, Bioprod. Biorefin., 6(5): 561-579.

Zhu, J.Y. and Pan, X.J., 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. Bioresour. Technol., 101(13): 4992-5002.

Zhu, S. et al., 2006. Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. Biosyst. Eng., 93(3): 279-283.

Ziolkowska, J.R., 2014. Prospective technologies, feedstocks and market innovations for ethanol and biodiesel production in the US. Biotechnol. Rep., 4: 94-98.