



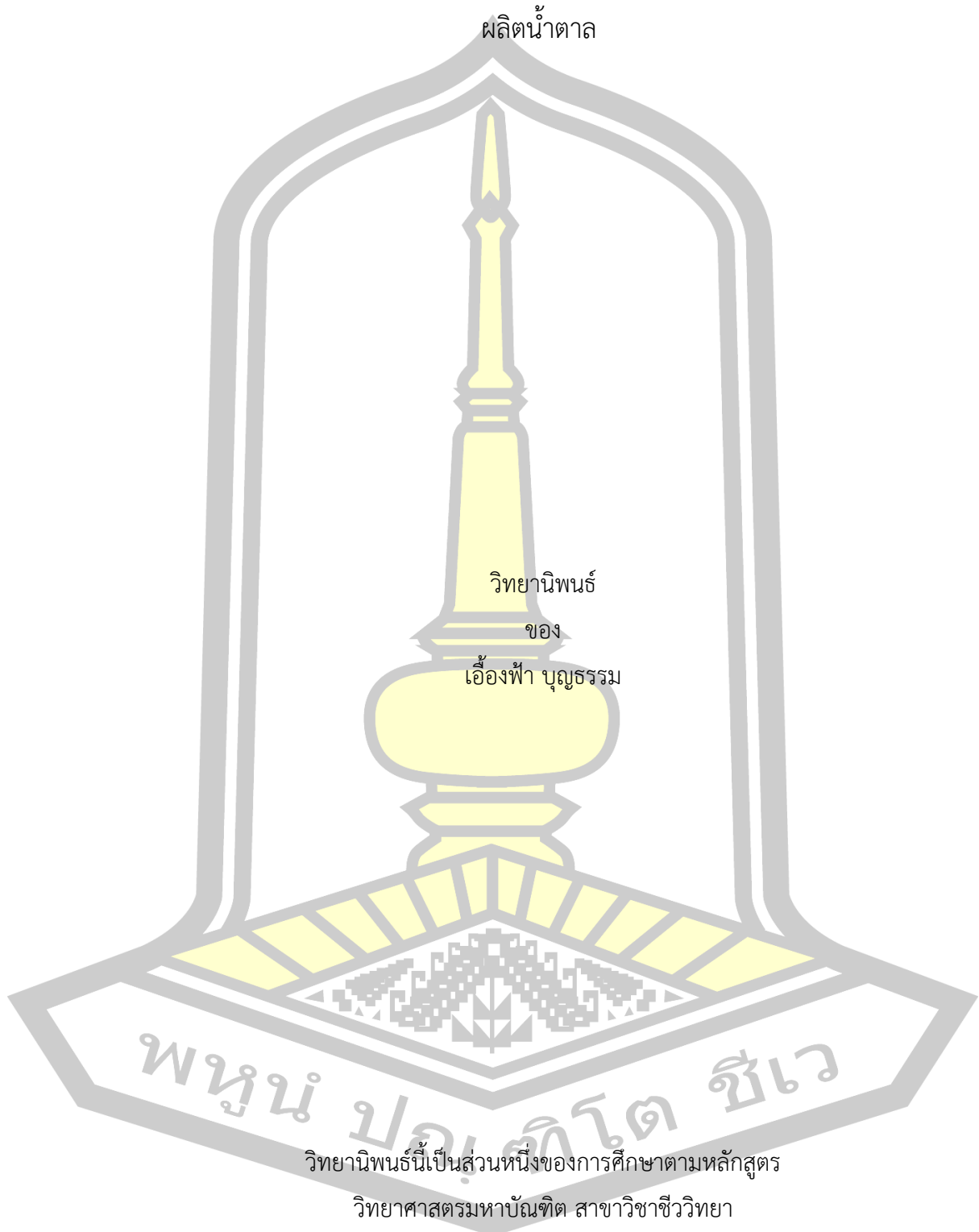
ผลของการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดเจือจางต่อสมบัติของโครงสร้างและ กระบวนการผลิต
น้ำตาล

วิทยานิพนธ์
ของ
เอื้องฟ้า บุญธรรม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ปีการศึกษา 2560

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผลของการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดเจือจางต่อสมบัติของโครงสร้างและ กระบวนการ
ผลิตน้ำตาล



วิทยานิพนธ์
ของ
เอื้องฟ้า บุญธรรม

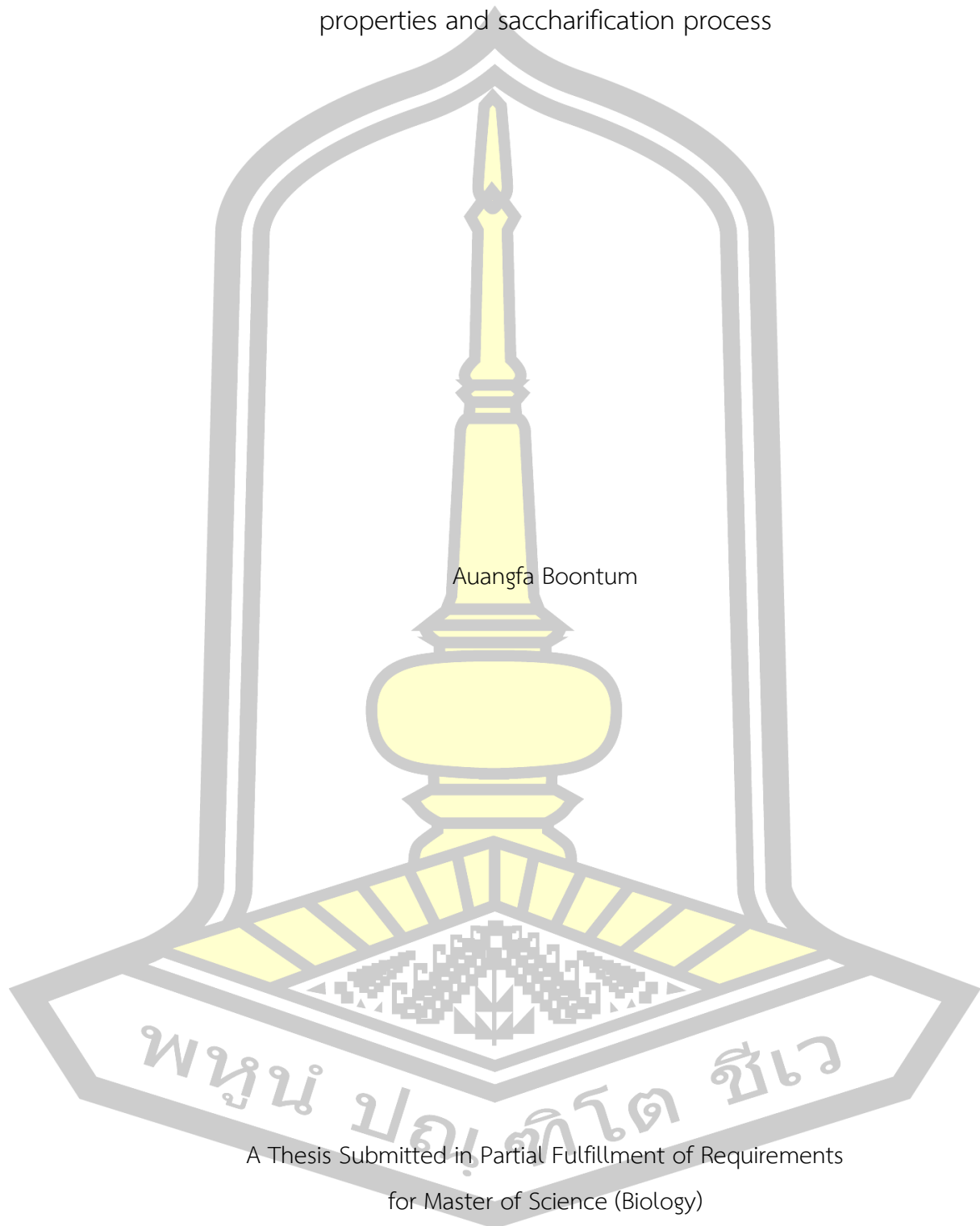
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Effect of pretreatment of water hyacinth using dilute acid on structural
properties and saccharification process



Aungmye Boontum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biology)

Academic Year 2017

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาว เอื้องฟ้า บุญธรรม
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร. จิรภา เพชรสม)

.....กรรมการ

(ผศ.ดร. สุदारัตน์ ถนนแก้ว)

.....กรรมการ

(ดร. กานต์สิริ ปักเคราติ)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
()
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผศ.ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน.....เดือน.....ปี.....

ชื่อเรื่อง	ผลของการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดเจือจางต่อสมบัติของโครงสร้างและกระบวนการผลิตน้ำตาล		
ผู้วิจัย	เอื้องฟ้า บุญธรรม		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. จิรภา เพชรสม		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	ชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง โดยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพ ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลสลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลรวมน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสโดยใช้ 3',5'-dinitrosalicylic acid (DNS) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 23.32 มิลลิกรัมต่อกรัมชีวมวล ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 2.5 % (v/v) ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยการใช้เอนไซม์ การสลายด้วยเอนไซม์แสดงให้เห็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 11.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0 % (v/v) ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส การสังเกตการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางโครงสร้างในผักตบชวาก่อนและหลังกระบวนการปรับสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR) และเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของพื้นผิวผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพแสดงให้เห็นการทำลายบริเวณพื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ ดัชนีผลึกของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาของการทำปฏิกิริยา ผลกระทบหลักคือการละลายเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างลิกนินในผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการเข้าถึงพื้นผิวเซลลูโลสและได้น้ำตาลปริมาณสูงขึ้น

คำสำคัญ : การปรับสภาพ, ผักตบชวา, กรดซัลฟิวริก

TITLE Effect of pretreatment of water hyacinth using dilute acid on structural properties and saccharification process

AUTHOR Auangfa Boontum

ADVISORS Dr. Jirapa Phetsom

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biology

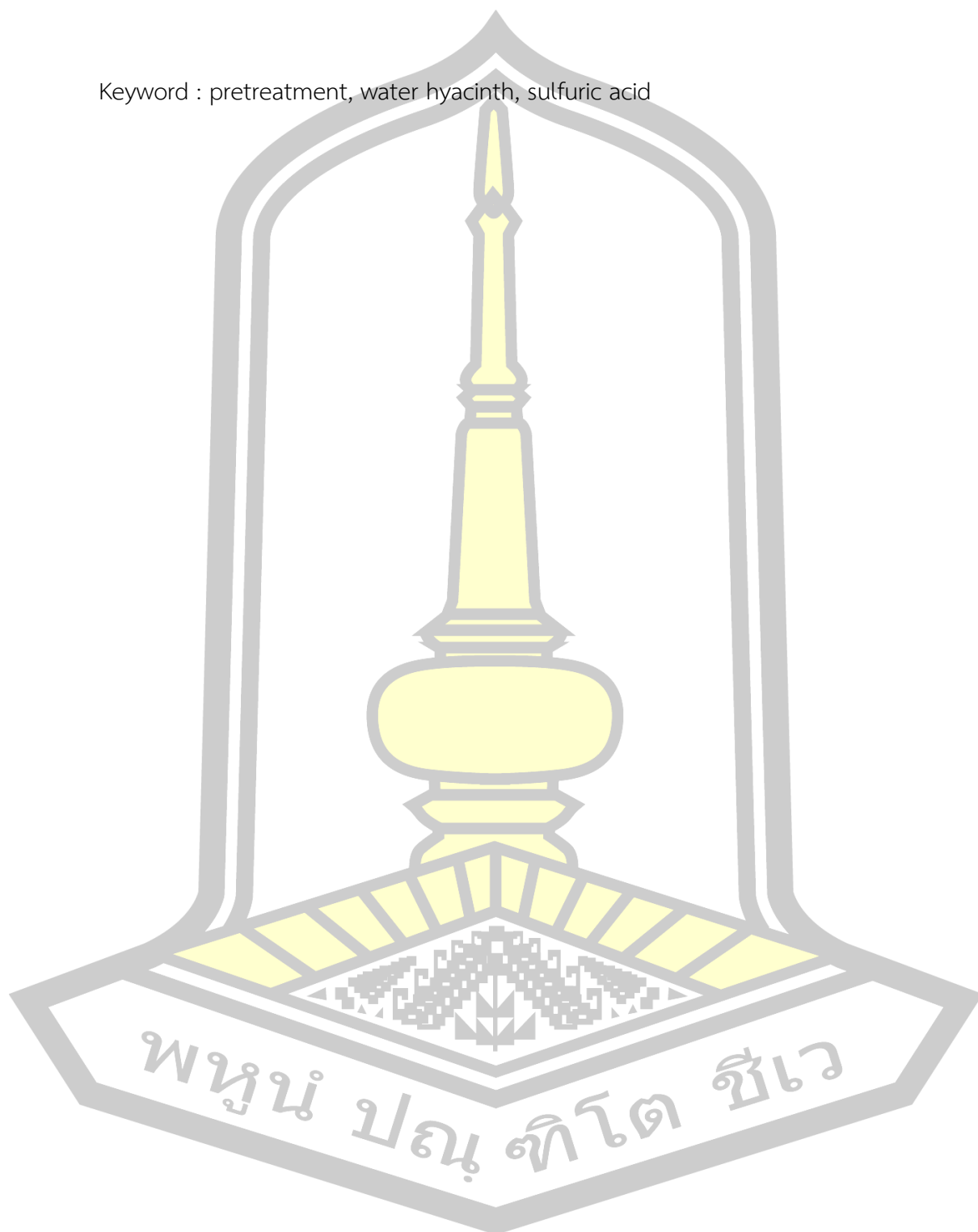
UNIVERSITY Mahasarakham **YEAR** 2017
University

ABSTRACT

This study aims to explore the effect on water hyacinth pretreatment with dilute sulfuric acid. The contents of cellulose, hemicellulose and lignin in water hyacinth before and after pretreatment were evaluated. The results revealed that the hemicellulose content was reduced when the temperature was increased to 90 °C. Total reducing sugars in hydrolysate were analyzed by 3',5'-dinitrosalicylic acid (DNS method). A maximal reducing sugar yield of 23.32 mg/g biomass was achieved when the water hyacinth was pretreated by 2.5 % (v/v) sulfuric acid with a reaction time of 24 h at 90 °C. The examination of pretreatment efficiency and enzymatic hydrolysis, experiments were carried out. The result showed that the maximal reducing sugar yield was 11.01 g/L, which was obtained from the pretreated water hyacinth by 3.0 % (v/v) sulfuric acid with a reaction time of 24 h at 90 °C. The changes of structural properties were observed in water hyacinth before and after pretreatment process by SEM, FTIR and XRD analyses. The comparison of pretreated and untreated water hyacinth revealed that the damaged surface was observed in pretreated water hyacinth. The decrease in the crystallinity index of the pretreated water hyacinth was obtained when increasing the acid concentration, temperature, and reaction time. The crystallinity indices in pretreated and untreated water hyacinth were 42.92% and 27.41%, respectively. The main effects were increasing of dissolved hemicellulose and alteration of lignin structure in pretreated water hyacinth. Therefore, the pretreatment process can improve accessibility of the

cellulose for hydrolytic enzymes and higher sugar yields can be obtained.

Keyword : pretreatment, water hyacinth, sulfuric acid



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วย ความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก อาจารย์ ดร.จิรภา เพชรสม ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ที่ช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงได้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. ปรียกมล กลั่นฤทธิ์ ผศ.ดร.สุดารัตน์ ถนอมแก้ว อาจารย์ ดร.กานต์สิริ ปีกเศราติ และอาจารย์ ดร.ธีรชัย คุณโทม ที่ได้สละเวลา ในการให้คำแนะนำ และช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่และอุปกรณ์ต่างๆ เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญูกตเวทิตาคุณแด่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอื้องฟ้า บุญธรรม



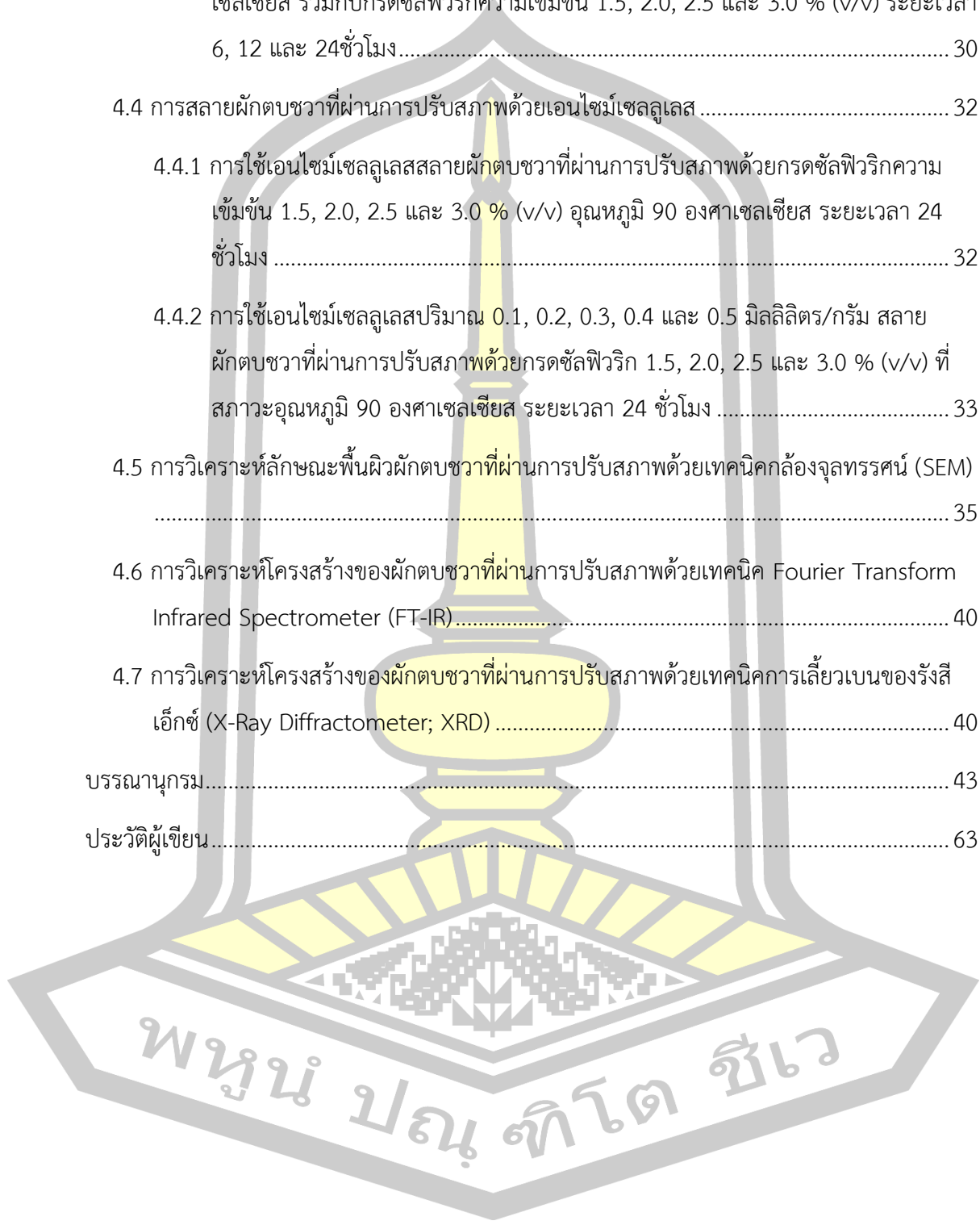
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	3
1.5 ระยะเวลาในการทำวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัย.....	4
2.1 ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส.....	4
2.1.1 เซลลูโลส.....	4
2.1.2 เฮมิเซลลูโลส.....	5
2.1.3 ลิกนิน.....	6
2.2 กระบวนการปรับสภาพชีวมวล.....	8
2.2.1 การปรับสภาพชีวมวลทางกายภาพ.....	8
2.2.1.1 การใช้แรงเชิงกล (mechanical comminution).....	8

2.2.1.2 การใช้รังสี (irradiation).....	8
2.2.1.3 การอัดด้วยแรงดัน (extrusion).....	8
2.2.1.4 การไพโรไลซิส (pyrolysis).....	9
2.2.1.5 การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion).....	9
2.2.1.6 การใช้น้ำร้อน (liquid hot water).....	9
2.2.2 การปรับสภาพชีวมวลทางเคมี.....	9
2.2.2.1 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis).....	9
2.2.2.2 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis).....	10
2.2.2.3 การปรับสภาพด้วยการออกซิเดชัน (oxidation).....	10
2.2.2.4 การปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิก (Ionic liquid).....	11
2.2.3 การปรับสภาพชีวมวลทางชีวภาพ.....	11
2.2.3.1 การปรับสภาพชีวมวลด้วยรา (fungi).....	11
2.2.3.2 การปรับสภาพชีวมวลด้วยแบคทีเรีย (bacteria).....	11
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	17
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	17
3.2 สารเคมี.....	17
3.3 วิธีการดำเนินงาน.....	18
3.3.1 การเตรียมผักตบชวาและวิเคราะห์องค์ประกอบ.....	18
3.3.2 การปรับสภาพผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	19
3.3.3 การสลายผักตบชวากับเอนไซม์เซลลูเลสและวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์.....	20
3.3.4 การย่อยสลายผักตบชวาโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้นที่ต่างกันและวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์.....	20

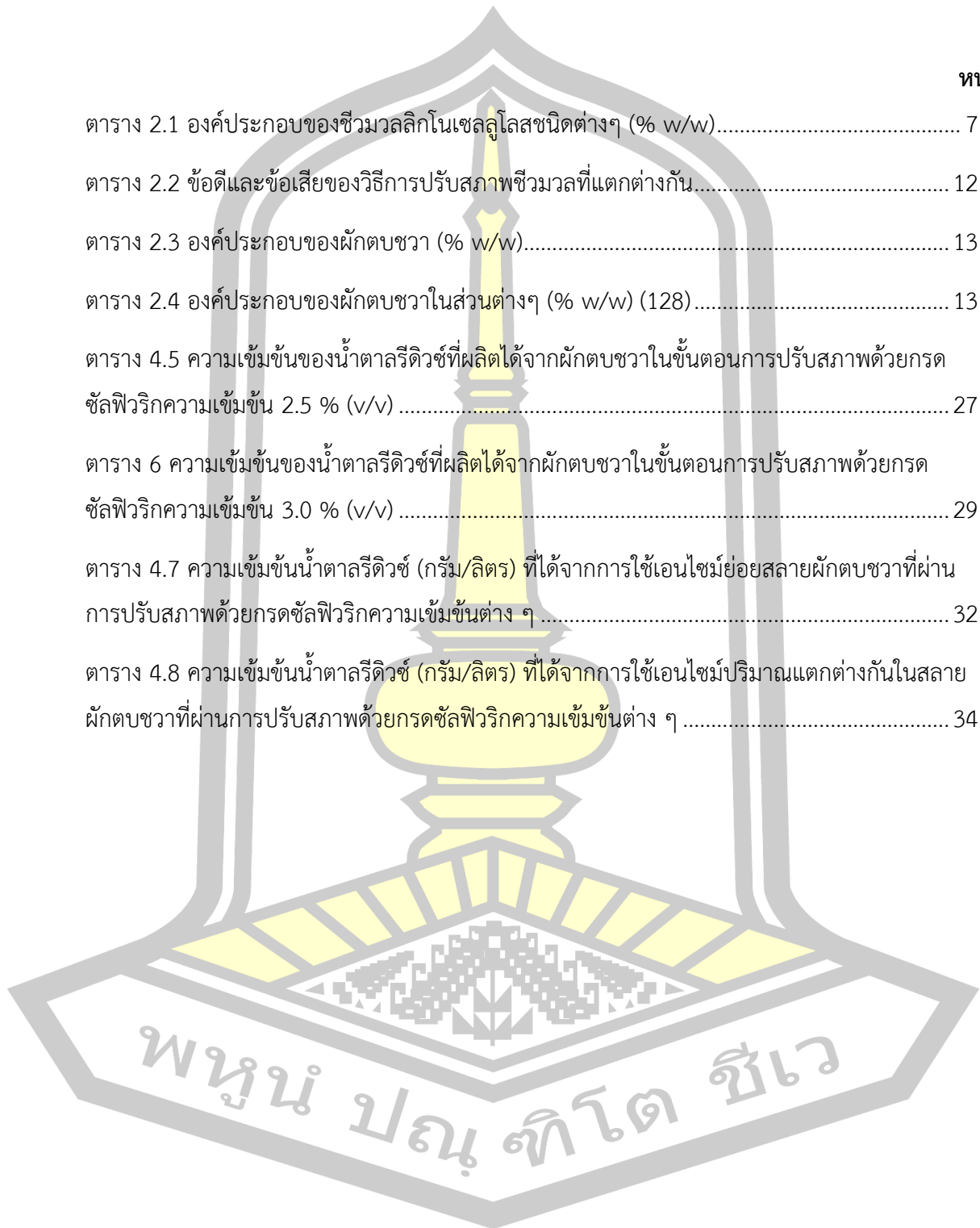
3.3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้เทคนิค 3,5-dinitrosalicylic (DNS) method (Miller, 1959) (162)	20
3.3.6 การวิเคราะห์พื้นผิวผักตบชวาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (SEM)	20
3.3.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผักตบชวาด้วย FT-IR	20
3.3.8 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผักตบชวาด้วย XRD	21
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	22
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาก่อนการปรับสภาพ.....	22
4.2 การปรับสภาพผักตบชวากับกรดซัลฟิวริก	22
4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 (% v/v) สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	22
4.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง	24
4.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง	25
4.2.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง	27
4.2.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง	28
4.3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก	30

4.3.1	เปรียบเทียบการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	30
4.4	การสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส.....	32
4.4.1	การใช้เอนไซม์เซลลูเลสสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	32
4.4.2	การใช้เอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม สลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	33
4.5	การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ (SEM).....	35
4.6	การวิเคราะห์โครงสร้างของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR).....	40
4.7	การวิเคราะห์โครงสร้างของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-Ray Diffractometer; XRD).....	40
	บรรณานุกรม.....	43
	ประวัติผู้เขียน.....	63



สารบัญตาราง

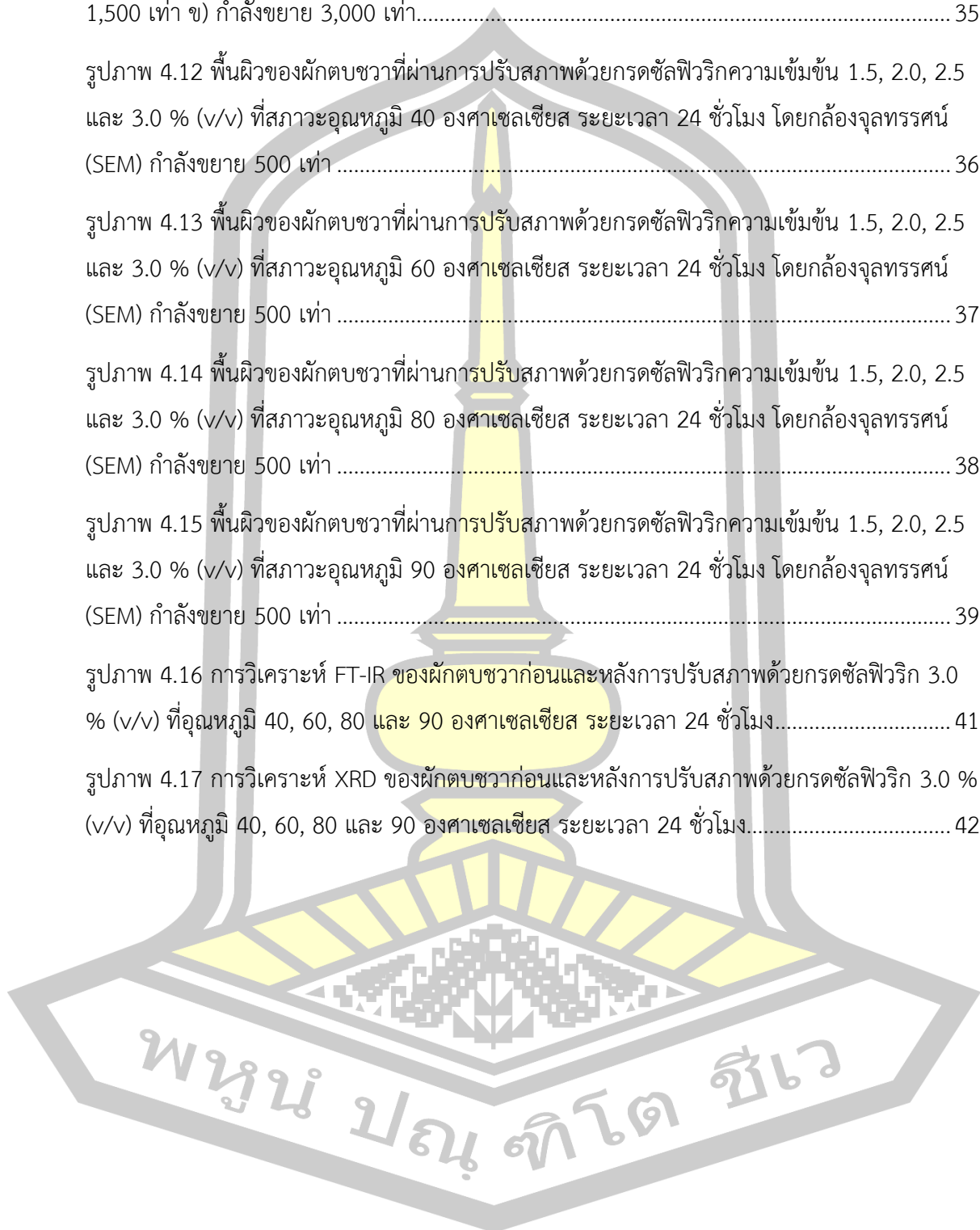
	หน้า
ตาราง 2.1 องค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ (% w/w).....	7
ตาราง 2.2 ข้อดีและข้อเสียของวิธีการปรับสภาพชีวมวลที่แตกต่างกัน.....	12
ตาราง 2.3 องค์ประกอบของผักตบชวา (% w/w).....	13
ตาราง 2.4 องค์ประกอบของผักตบชวาในส่วนต่างๆ (% w/w) (128).....	13
ตาราง 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v)	27
ตาราง 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v)	29
ตาราง 4.7 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นต่าง ๆ	32
ตาราง 4.8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ปริมาณแตกต่างกันในสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นต่าง ๆ	34



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปภาพ 2.1 องค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของผนังเซลล์พืช (23).....	4
รูปภาพ 2.2 โครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส (32).....	5
รูปภาพ 2.3 โครงสร้าง (A) โมเลกุลเฮกโซสและเพนโทสที่พบได้ในเฮมิเซลลูโลส (23) (B) โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (42).....	6
รูปภาพ 2.4 โครงสร้างของลิกนิน (43).....	7
รูปภาพ 2.5 แผนภาพการสลายพันธะเบต้าไกลโคซิดิกของเซลโลไบโอส และเกิดไซโลส 2 โมเลกุล (89, 90).....	10
รูปภาพ 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง.....	28
รูปภาพ 4.7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	31
รูปภาพ 4.8 เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	31
รูปภาพ 4.9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์โดยการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.3 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา).....	33
รูปภาพ 4.10 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์โดยการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา).....	34

รูปภาพ 4.11 พื้นผิวของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพโดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) ก) กำลังขยาย 1,500 เท่า ข) กำลังขยาย 3,000 เท่า.....	35
รูปภาพ 4.12 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า	36
รูปภาพ 4.13 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า	37
รูปภาพ 4.14 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า	38
รูปภาพ 4.15 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า	39
รูปภาพ 4.16 การวิเคราะห์ FT-IR ของผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	41
รูปภาพ 4.17 การวิเคราะห์ XRD ของผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	42



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผักตบชวาเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) มีองค์ประกอบที่สำคัญคือเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) พอลิเมอร์ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีศักยภาพเป็นแหล่งน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพได้ (1) ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาจึงได้รับความสนใจในการศึกษาและวิจัยใช้ผักตบชวาเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงทดแทน (2, 3) เนื่องจากในผักตบชวาประกอบประกอบเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสปริมาณสูงถึง 44-66.9% (น้ำหนักแห้ง) และลิกนินปริมาณต่ำ (4, 5) อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาพบว่าผักตบชวามีปริมาณองค์ประกอบของเซลลูโลสต่ำกว่าชีวมวลจำพวกไม้ หรือฟาง (6) ผักตบชวาเป็นพืชน้ำที่ก่อให้เกิดปัญหามลพิษกับสิ่งแวดล้อม (7) และมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 สัปดาห์ (8) ซึ่งปกคลุมบนพื้นผิวน้ำทำให้แสงส่องลงไปไม่ถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ใต้น้ำ จึงส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต (9) และขัดขวางการระบายน้ำของประตูน้ำและทำให้เกิดการตื่นเงินของแหล่งน้ำ ดังนั้นการนำผักตบชวามาใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ สามารถลดปริมาณและปัญหาดังกล่าวได้

องค์ประกอบของผนังเซลล์พืชมีลิกนินที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบอสัณฐาน ประกอบด้วยหน่วยย่อยของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ที่แตกต่างกัน ทำให้ยากต่อการย่อยสลาย (10) และเป็นอุปสรรคในกระบวนการใช้เอนไซม์ (enzyme) ย่อยสลายน้ำตาลจากพอลิเมอร์ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากการลดโอกาสการเข้าถึงของเอนไซม์ในการสัมผัสพื้นผิวของชีวมวล ทำให้เกิดผลผลิตน้ำตาลปริมาณต่ำ และส่งผลกระทบต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตทางชีวภาพ นอกจากนี้กระบวนการผลิตน้ำตาลจากการใช้เอนไซม์สลายพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ยังได้รับผลกระทบจากโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส เนื่องจากพื้นผิวของโครงสร้างผลึกมีความหนาแน่นสูง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ต่ำ ส่งผลต่อต้นทุนที่เพิ่มมากขึ้นในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (11) ดังนั้นการนำวัสดุลิกโนเซลลูโลสมาใช้ผลิตน้ำตาลในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพ จึงจำเป็นต้องทำการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิต ซึ่งการปรับสภาพสามารถทำได้หลายวิธี คือ วิธีทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ และการใช้วิธีร่วมกันระหว่างกายภาพและเคมี หรือเคมีและชีวภาพ (12) กระบวนการปรับสภาพจะช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพื้นผิววัสดุลิกโนเซลลูโลส ทำให้เกิดช่องว่างและรูพรุน และเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับเอนไซม์ (13, 14) ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีทำให้เกิดน้ำตาลปริมาณสูง เนื่องจากสารละลายกรดและด่างที่ใช้ในการปรับสภาพทำให้เกิดการสลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งการกำจัดลิกนินเป็นการลดอุปสรรคการทำงานของเอนไซม์ (15)

การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายกรดทำให้เกิดการสลายการเชื่อมต่อระหว่างเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส (16) เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวทำให้เกิดการเข้าถึงของเอนไซม์ ส่งผลให้กระบวนการย่อยสลายน้ำตาลมีประสิทธิภาพสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายกรดเข้มข้นในกระบวนการผลิตก่อให้เกิดสารยับยั้งที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และฟูแรน (furan) เป็นต้น (17, 18) นอกจากนี้ยังทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ต้องทนการกัดกร่อนของกรด ดังนั้นจึงต้องมี

การประยุกต์ใช้กรดเจ็องในการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสหลายชนิด เช่น ฟางข้าว (19) ผักตบชวา (2, 20, 21) และหญ้า (22) ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลและผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลกระทบจากการใช้กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) เจ็องในการปรับสภาพผักตบชวา โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและชีวภาพของ ผักตบชวา โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ร่วมกับสมบัติทางกายภาพของพื้นผิวด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy; FT-IR) และเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-ray Powder diffraction; XRD) และประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulases) ทาง การค้า เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลด้วยเอนไซม์ร่วมกับวิธีการปรับสภาพ ที่เหมาะสมต่อผักตบชวาและนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาและเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินในผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจ็อง
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจ็อง ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี และเทคนิค การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์
3. ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก เจ็องโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ผักตบชวาที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยส่วนใบและลำต้น ผ่านการอบแห้งอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (จนกระทั่งน้ำหนักคงที่) มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร
2. กรดซัลฟิวริกเจ็องความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3% (v/v) ใช้ในการปรับสภาพ ผักตบชวา ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง
3. วิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินของผักตบชวาที่ผ่านการ ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจ็อง
4. วิเคราะห์พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจ็องโดยกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี และเทคนิคการเลี้ยวเบนของ รังสีเอ็กซ์
5. วิเคราะห์การผลิตน้ำตาลจากผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจ็องโดย การใช้เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

1.4 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา SC2-402/2 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5 ระยะเวลาในการทำวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน	ระยะเวลา											
	ส.ค. 60	ก.ย. 60	ต.ค. 60	พ.ย. 60	ธ.ค. 60	ม.ค. 61	ก.พ. 61	มี.ค. 61	เม.ย. 61	พ.ค. 61	มิ.ย. 61	ก.ค. 61
1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล					→							
2. วิเคราะห์องค์ประกอบผักตบชวา และปรับสภาพผักตบชวา							→					
3. วิเคราะห์พื้นผิวโครงสร้างของ ผักตบชวา								→				
4. วิเคราะห์การย่อยสลายผักตบชวา ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ เซลลูเลสทางการค้า										→		
5. วิเคราะห์ผลการทดลอง											→	
6. สรุปผลการทดลอง											→	
7. จัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์												→

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

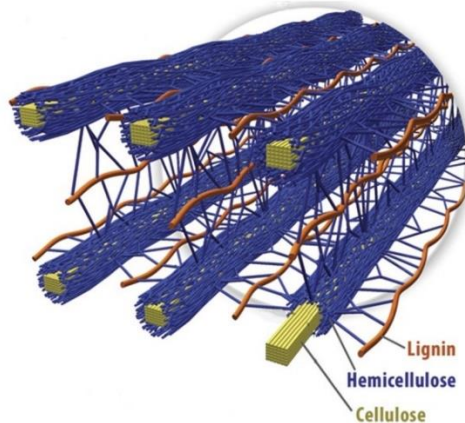
- ทราบผลที่เกิดขึ้นต่อองค์ประกอบทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง
- สามารถใช้เป็นแนวทางในการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง เพื่อการสลายเอมิเซลลูโลส และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลจากการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า
- เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสลายน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของ ผักตบชวา และการนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าต่อไป

พนุ ปรณ ทิโต ชีเว

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัย

2.1 ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (รูปภาพ 2.1) นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นๆอีก คือ เพคติน ไกลโคโปรตีน และสารอนินทรีย์ต่างๆ (10, 23) โดยทั่วไปพบว่าองค์ประกอบของเซลลูโลสในชีวมวลอยู่ในช่วง 30-50% เฮมิเซลลูโลส 15-35% และลิกนิน 10-30% ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตในรูปแบบพอลิเมอร์ของน้ำตาล และสามารถสลายได้น้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพและสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ โดยลิกนินจัดเป็นพอลิเมอร์ที่อยู่ในรูปของอะโรมาติก ทำให้เกิดการห่อหุ้มและปกป้องเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากการสลายของเอนไซม์และจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าลิกนินทำหน้าที่เสมือนกาวเชื่อมประสานเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเข้าด้วยกัน ทำให้เกิดความแข็งแรงของโครงสร้างผนังเซลล์

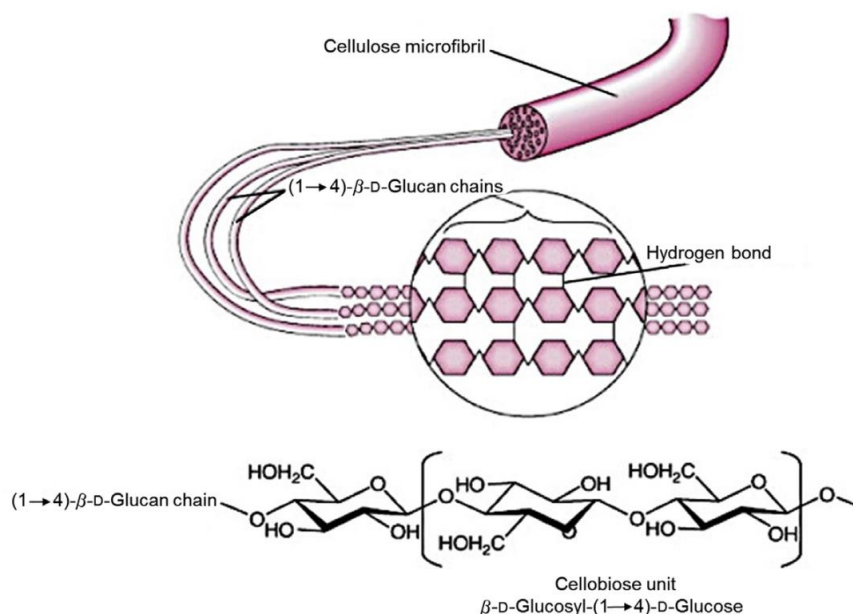


รูปภาพ 2.1 องค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของผนังเซลล์พืช (23)

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ในรูปแบบคาร์บอนชีวภาพที่พบมากที่สุดและเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ลิกโนเซลลูโลส มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์เส้นตรงของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของเซลโลไบโอส (cellobiose) ที่มีกลูโคสเป็นหน่วยย่อย (24, 25) ในสายของเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อยกลูโคส (D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้าไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic) (26, 27) (รูปภาพ 2.2) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ที่อยู่บนพื้นผิวภายในและภายนอกของเซลลูโลสทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen) ภายในสายโซ่เดียวกันและสายโซ่ที่อยู่ใกล้กัน ระหว่างสายโซ่เซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงวานเดอร์วาลส์ ทำให้เกิดสายไมโครไฟบริล (microfibril) ที่มีความแข็งแรงทนต่อแรงดึงพลังงานสูง (28) โมเลกุลเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน เนื่องจากแรงยึดเกาะของพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของน้ำและเซลลูโลสมีค่าสูงกว่าแรงวานเดอร์วาลส์ที่เกิดขึ้น ดังนั้นความ

แข็งแรงของเซลลูโลสจึงเกิดจากพันธะไฮโดรเจน ซึ่งการเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในเซลลูโลสยังทำให้เกิดลักษณะโครงสร้างผลึกและอสัณฐาน (29) โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสจะศึกษาจากค่าดัชนีผลึก (crystallinity index ; CrI) โดยการเพิ่มค่าดัชนีผลึกทำให้การสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมีและชีวภาพเกิดขึ้นได้ยาก (30, 31)



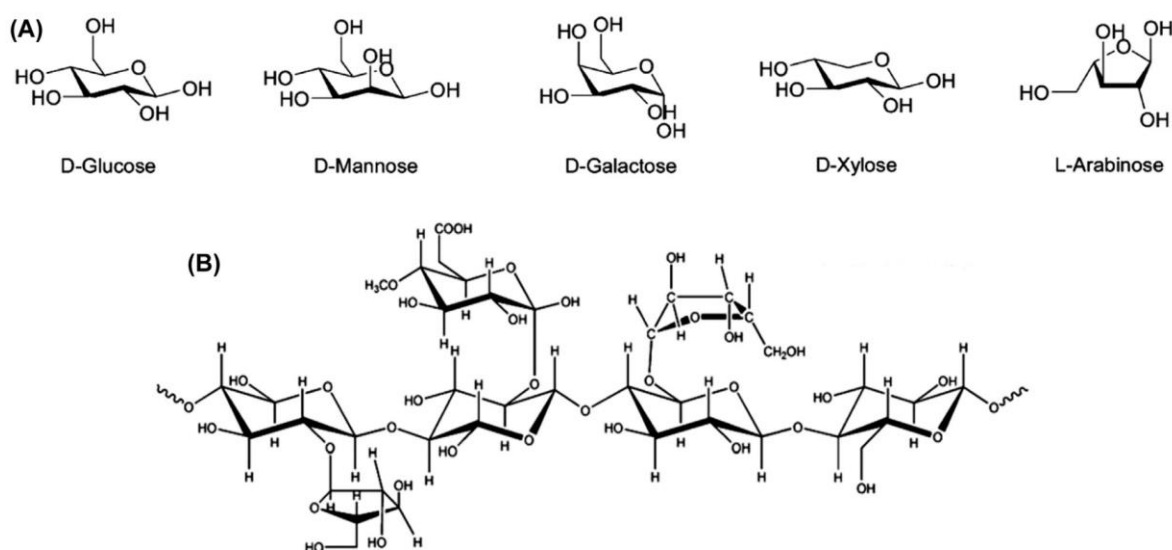
รูปภาพ 2.2 โครงสร้างของโมเลกุลเซลลูโลส (32)

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

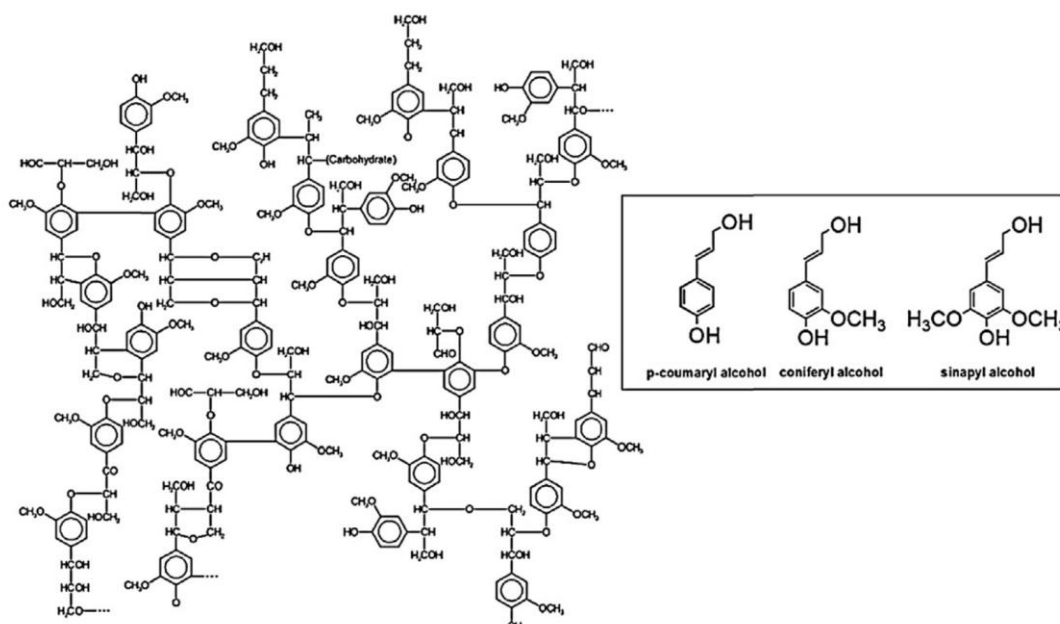
เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรตที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส มีลักษณะโครงสร้างเป็นแขนง ออสัณฐาน และเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยแตกต่างกันของน้ำตาลเพนโทส (pentose) [ไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose)] น้ำตาลเฮกโซส (hexose) [แมนโนส (mannose) กลูโคส กาแลคโตส (galactose) และแรมนโนส (rhamnose)] (รูปภาพ 2.3) ซึ่งองค์ประกอบจะแตกต่างกันในชีวมวลที่ต่างชนิดกัน เช่น ไม้เนื้อแข็ง และวัสดุทางการเกษตรพบไซแลน ในขณะที่ไม้เนื้ออ่อนพบกลูโคแมนแนน (glucomannan) เป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (10, 33, 34) เฮมิเซลลูโลสมีนี้น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส เกิดการเชื่อมต่อของพันธะไฮโดรเจนกับเส้นใยเซลลูโลสและพันธะโควาเลนต์ (covalent) กับลิกนิน โดยทั่วไปพบว่าการสลายเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อนทำได้ยากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไม้เนื้อแข็งเนื่องจากปริมาณของกรดเมทิลกลูคิวโรนิก (methyl glucuronic) พบในไม้เนื้ออ่อนมากกว่าไม้เนื้อแข็ง (35, 36)

2.1.3 ลิกนิน

ลิกนินมีลักษณะโครงสร้างแบบอสัณฐาน ประกอบด้วยฟีนิลโพรเพน (พารา-คูมาริล แอลกอฮอล์ (*p*-coumaryl alcohol) โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และไซแนปซิล แอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol) (รูปภาพ 2.4) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester) เกิดเป็น สารประกอบเชิงซ้อนกับเฮมิเซลลูโลสหรือหุ้มเซลลูโลส ทำให้ยากต่อการสลายด้วยวิธีทางเคมีและการ ใช้เอนไซม์ ลิกนินมีบทบาทสำคัญทางชีววิทยาต่อผนังเซลล์พืชโดยส่งเสริมให้เกิดความสมบูรณ์และ ความสามารถในการต้านทานการบุกรุกของเชื้อก่อโรคพืช (37) และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ในการสลายผนังเซลล์พืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำลายโครงสร้างร่างแหของลิกนินก่อนกระบวนการ สลายชีวมวลด้วยเอนไซม์ (38) ชีวมวลที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจะเป็นอุปสรรคต่อการ สลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการสลายด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการสลายผนังเซลล์พืช อาจเกิดสารประกอบฟูแรน (furan) เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural ; HMF) ซึ่งส่งผลยับยั้ง กระบวนการหมักทางชีวภาพ (39-41)



รูปภาพ 2.3 โครงสร้าง (A) โมเลกุลเฮกโซสและเพนโทสที่พบได้ในเฮมิเซลลูโลส (23) (B) โครงสร้าง ของเฮมิเซลลูโลส (42)



รูปภาพ 2.4 โครงสร้างของลิกนิน (43)

ชนิดของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสมีผลต่อปริมาณองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ สภาวะการเจริญเติบโต ฤดูกาล และอายุของชีวมวลที่ทำการศึกษา ตัวอย่างองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสชนิดต่าง ๆ (ตาราง 2.1)

ตาราง 2.1 องค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ (% w/w)

ชีวมวล	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	อ้างอิง
Corn stover	40.8	20.6	21.3	Liu <i>et al.</i> , 2009 (44)
Hardwood barks	39-44	19-25	18-22	Stoklosa <i>et al.</i> , 2015 (45)
Miscanthus straw	44.5	26.2	26.5	Kang <i>et al.</i> , 2013 (46)
Poplar wood	49.3	21.5	25.4	Chandra <i>et al.</i> , 2015 (47)
Rice straw	36.5	20.8	16.9	Kim <i>et al.</i> , 2012 (48)
Softwood barks	16-41	18-21	23-40	Soudham <i>et al.</i> , 2015 (49)
Sugarcane bagasse	41.0	30.1	21.1	Yoon <i>et al.</i> , 2011 (50)
Switchgrass	34.8	28.5	23.5	Karp <i>et al.</i> , 2015 (51)
Wheat straw	35.2	22.2	21.1	Toquero <i>et al.</i> , 2014 (52)

2.2 กระบวนการปรับสภาพชีวมวล

วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพชีวมวล คือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพร่วมกับเคมีของวัสดุลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้มีพื้นที่ผิวที่เหมาะสมสำหรับการสลายด้วยเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงพื้นผิวชีวมวลจะขึ้นอยู่กับวิธีการปรับสภาพทำให้การสลายด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุด (53) กลไกการสลายชีวมวลมีข้อจำกัดหลายปัจจัย เช่น โครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ดีกรีของการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization) ความชื้น และปริมาณลิกนินที่เป็นองค์ประกอบ (30, 54-56) ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพชีวมวลที่มีประสิทธิภาพจึงควรคำนึงถึงปริมาณและคุณภาพของเส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพ ว่ามีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้ใช้พลังงานต่ำในขั้นตอนการดำเนินการและเกิดผลพลอยได้ปริมาณต่ำ ซึ่งหลีกเลี่ยงการเกิดสารยับยั้งที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกระบวนการหมักชีวภาพ (57, 58) ปัจจุบันจัดจำแนกกระบวนการปรับสภาพชีวมวลได้ 3 กลุ่ม คือ กายภาพ เคมี ชีวภาพ และการใช้วิธีร่วมกันระหว่างกายภาพและเคมี หรือเคมีและชีวภาพ (12)

2.2.1 การปรับสภาพชีวมวลทางกายภาพ

2.2.1.1 การใช้แรงเชิงกล (mechanical comminution)

การใช้แรงเชิงกลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตัด การบด การโม่ หรือการทุบวัสดุชีวมวลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผลึก (59) ลดขนาดของวัสดุชีวมวล (60) ลดดีกรีของพอลิเมอร์ เพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา ส่งผลให้การสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (58) อย่างไรก็ตาม การลดขนาดและโครงสร้างผลึกของชีวมวลด้วยวิธีเหล่านี้ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและมีต้นทุนสูง (10) การลดขนาดของชีวมวลเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนการปรับสภาพชีวมวลด้วยสารเคมี ยกเว้นการใช้วิธีระเบิดด้วยไอน้ำหรือแอมโมเนีย การใช้สารละลายอินทรีย์ และตัวทำละลายในการปรับสภาพ ไม่จำเป็นต้องทำการลดขนาดชีวมวลก่อนการปรับสภาพ (61, 62)

2.2.1.2 การใช้รังสี (irradiation)

รังสีที่ใช้ในการปรับสภาพชีวมวลมีหลายชนิด เช่น รังสีแกมมา (gamma ray) อนุภาคอิเล็กตรอน (electron) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์ให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้รังสีที่มีพลังงานสูงเกินกว่า 100 MR (mega-Roentgen) ส่งผลให้เกิดการสลายโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) และวงแหวนกลูโคส (63) การใช้อนุภาคอิเล็กตรอน (80 kGy, 0.12 mA, 1 MeV) ในการปรับสภาพฟางข้าว พบว่าเอนไซม์สลายฟางข้าวได้ปริมาณน้ำตาลที่นำไปใช้ในกระบวนการหมักเท่ากับ 52% (64) การใช้รังสีแกมมาในการปรับสภาพฟางข้าวสาลีและทำการสลายด้วยเอนไซม์ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 13% (65)

2.2.1.3 การอัดด้วยแรงดัน (extrusion)

การอัดวัสดุชีวมวลในรูปแบบการผสมทำให้เกิดแรงเสียดทานและความร้อนต่อวัสดุชีวมวล ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพและเคมี ในกระบวนการอัดด้วยแรงดันมีการออกแบบเพื่อปรับเปลี่ยนความเร็ว รูปแบบของสกรู และอุณหภูมิภายในระบบ ทำให้ขนาดของเส้นใยเซลลูโลสสั้นลงและเพิ่มประสิทธิภาพการสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์ (66)

2.2.1.4 การไพโรไลซิส (pyrolysis)

วิธีไพโรไลซิสคือการอบวัสดุชีวมวลด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 300 องศาเซลเซียส) ทำให้เกิดเป็นแก๊สไฮโดรเจน คาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) และถ่าน สามารถทำลายโครงสร้างเส้นใยของชีวมวล (67-69) ผลจากการใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในการปรับสภาพเปลือกถั่ว (Brazilian nut) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและลักษณะของพื้นผิว (70)

2.2.1.5 การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion)

วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำสามารถนำมาใช้ในการปรับสภาพวัสดุชีวมวลได้ โดยใช้อุณหภูมิช่วง 160-260 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 0.7-4.8 MPa ทำให้ชีวมวลผสมกับไอน้ำอ้อมตัวที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดันอย่างรวดเร็ว (71) การใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำจะทำให้ น้ำเกิดปฏิกิริยาคล้ายกับการใช้กรด ทำให้เกิดกรดอะซิติก (acetic acid) ขึ้นจากหมู่อะเซทิล ที่สลายจากเฮมิเซลลูโลส และทำให้ลิกนินเกิดการกระจายตัวและหลุดออกจากโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส (72) ดังนั้นการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์หรือจุลินทรีย์จึงเกิดขึ้นได้ง่าย ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำคือ ระยะเวลา อุณหภูมิ ขนาดของวัสดุและความชื้น (32)

2.2.1.6 การใช้น้ำร้อน (liquid hot water)

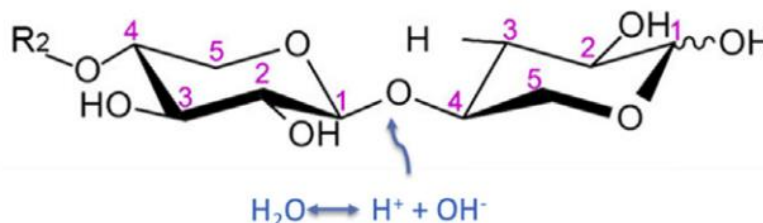
วิธีการปรับสภาพโดยใช้น้ำร้อนที่มีอุณหภูมิในช่วง 130-240 องศาเซลเซียส และความดันสูง จะทำให้น้ำทำหน้าที่คล้ายตัวเร่งปฏิกิริยากรดในสภาวะอุณหภูมิสูง (73) ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพนั้นจะเกิดการแทรกตัวของน้ำเข้าสู่ผนังเซลล์พืชทำให้เกิดการพองตัวของเซลลูโลส เกิดการละลายของเฮมิเซลลูโลส และลิกนินหลุดออกจากโครงสร้าง ทำให้เซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพนี้สามารถสลายด้วยเอนไซม์ได้ดีขึ้น และสามารถนำเฮมิเซลลูโลสกลับคืนมาจากกระบวนการได้ในรูปแบบโพลิโกแซคคาไรด์และโมโนแซคคาไรด์ (32) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพโดยใช้กรด เจือจางและตัวเร่งปฏิกิริยากรดในกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ พบว่าการใช้น้ำร้อนทำให้เกิดสารถ่ายย่อยต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) น้อยกว่าวิธีการปรับสภาพอื่นๆ (74)

2.2.2 การปรับสภาพชีวมวลทางเคมี

2.2.2.1 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis)

การปรับสภาพชีวมวลด้วยกรดเข้มข้นหรือกรดเจือจาง ทำให้เกิดการสลายเฮมิเซลลูโลสที่ยึดเกาะโครงร่างเซลลูโลสและลิกนินในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของชีวมวล ระยะเวลา ความเข้มข้น อุณหภูมิ และชนิดของกรดที่ใช้ในการปรับสภาพ โดยทั่วไปนิยมใช้กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เนื่องจากราคาถูกและมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อย (75, 76) เมื่อเปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและการใช้ความร้อนในการปรับสภาพชีวมวล พบว่าการใช้กรดเจือจางสามารถใช้กับชีวมวลได้หลายชนิดและได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในปริมาณมากกว่า (77, 78) การใช้กรดเจือจางความเข้มข้นประมาณ 1-3% จะใช้ร่วมกับอุณหภูมิ 200-240 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายโครงร่างผลึกเซลลูโลส (79) สลายน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซส เกิดสารถ่ายย่อยต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน เช่น สารประกอบฟีนอลิก และไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล

(75) พบรายงานการใช้กรดซัลฟิวริกเจือจางในการปรับสภาพชีวมวลหลายชนิด เช่น หล้าสวีตซ์ (80, 81) ซังข้าวโพด (82, 83) ต้นสน (84) และต้นปอปลาร์ (85, 86) นอกจากนี้ยังมีการปรับสภาพสองขั้นตอนโดยใช้กรดและการใช้เอนไซม์ เช่น กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.5% (v/v) ทำการปรับสภาพหญ้าเบอร์มิวด้าและฟางข้าวไรซ์ ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars) 20% และ 23% ตามลำดับ (87) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.75% (v/v) ทำการปรับสภาพฟางข้าวสาลีได้น้ำตาล 56% (88) ซึ่งการใช้กรดในการสลายพอลิแซ็กคาไรด์ (ไซลแลน) เกิดจากการสลายพันธะไกลโคซิดิกด้วยการการแตกตัวของน้ำเป็นไฮโดรเจนประจุบวก และไฮดรอกไซด์ (hydroxide) ประจุลบ (รูปภาพ 2.5)



รูปภาพ 2.5 แผนภาพการสลายพันธะเบต้าไกลโคซิดิกของเซลลูโลส และเกิดไฮดรอกไซด์ 2 โมเลกุล (89, 90)

2.2.2.2 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis)

การปรับสภาพชีวมวลด้วยด่างทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในลิกโนเซลลูโลส โดยทำให้เกิดการสลายลิกนิน การพองตัวและการสลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (89-91) เกิดการละลายของเฮมิเซลลูโลสบางส่วน (91, 92) การใช้ด่างปรับสภาพพบว่าได้ผลดีกับชีวมวลที่เป็นวัสดุที่ได้จากการเกษตร พบว่ามีการสูญเสียน้ำตาลน้อยกว่าชีวมวลชนิดอื่นในกระบวนการปรับสภาพ (93) การใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 2% (w/v) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ในการปรับสภาพก้านฝ้ายสามารถกำจัดลิกนินได้ 65% (12) การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายต่างส่งผลให้เกิดการสลายโครงสร้างพอลิเมอร์ของชีวมวลสูงขึ้น ทำให้ผลผลิตก๊าซชีวภาพเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายต่างยังทำให้เกิดสารยับยั้งในระหว่างกระบวนการและส่งผลให้ยับยั้งการผลิตก๊าซมีเทน (methane) เนื่องจากการสลายสารอินทรีย์และการเกิดกรดอินทรีย์อย่างรวดเร็ว (94)

2.2.2.3 การปรับสภาพด้วยการออกซิเดชัน (oxidation)

การปรับสภาพด้วยการออกซิเดชันโดยใช้สารเคมี เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ก๊าซโอโซน ก๊าซออกซิเจน หรืออากาศ สามารถกำจัดลิกนินได้ เรียกกระบวนการใช้ก๊าซโอโซนปรับสภาพนี้ว่าโอโซนไลซิส (ozonolysis) ซึ่งทำลายวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ของโครงสร้างลิกนิน ในขณะที่เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสไม่ถูกทำลาย (75) สำหรับพืชที่มีไขเคลือบอยู่ในรูปของซิลิกา

(silica) และโปรตีนสามารถกำจัดได้โดยปฏิกิริยาการย่อยเปียก (wet oxidation) (95) ในก้านอุ่นที่มี แทนนินเป็นองค์ประกอบ เมื่อปรับสภาพด้วยปฏิกิริยาการย่อยเปียกสามารถเปลี่ยนเซลลูโลสได้สูงถึง 50% (96)

2.2.2.4 การปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิก (Ionic liquid)

ของเหลวไอออนิกที่ใช้ในการปรับสภาพชีวมวลมีหลายชนิด โดยทั่วไปสารประกอบไอออนิก ประกอบด้วยประจักษ์ด้วยอะตอมของไอออนบวกและไอออนลบที่ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไอออนิก มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง จุดหลอมเหลวต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส และความดันไอต่ำ ใน ส่วนของเหลวไอออนิกประกอบด้วยไอออนบวกอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่ไม่สมมาตร และไอออนลบอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ (97) มีการนำของเหลวไอออนิกมาปรับสภาพชีวมวลหลายชนิด เช่น ชังข้าวโพด (98) ฝ้าย (98) ชานอ้อย (99) และฟางข้าวสาลี (100) สามารถทำลายโครงสร้างผลึกเซลลูโลส ทำให้เอนไซม์ สามารถทำการสลายเซลลูโลสได้ดีขึ้น เช่น การใช้ N-Methylmorpholine N-oxide (NMMO) ปรับ สภาพชานอ้อยสภาวะอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ การทำงานของเอนไซม์ได้สองเท่า (101)

2.2.3 การปรับสภาพชีวมวลทางชีวภาพ

2.2.3.1 การปรับสภาพชีวมวลด้วยรา (fungi)

ราที่ใช้การปรับสภาพชีวมวลสามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ white-rot brown-rot และ soft-rot fungi สายพันธุ์ white-rot ที่นิยมใช้ในการปรับสภาพชีวมวลเพื่อกำจัดลิกนิน เช่น *Phanerochaete chrysosporium* (102) *Pycnoporus cinnabarinus* (103) *Phlebia* spp. (104) *Echinodontium taxodii* (105) สำหรับสายพันธุ์ brown-rot สามารถสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ดีกว่าลิกนิน ดังนั้นจึงทำให้เนื้อไม้เกิดการสลายเพียงบางส่วน (106, 107) และสายพันธุ์ soft-rot เช่น *Trichoderma reesei* และ *Aspergillus niger* สามารถสลายชีวมวลได้ดี (108)

2.2.3.2 การปรับสภาพชีวมวลด้วยแบคทีเรีย (bacteria)

ความนิยมในการใช้แบคทีเรียปรับสภาพชีวมวลน้อยกว่ารา เนื่องจากผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่ ย่อยสลายลิกนินเซลลูโลสได้ต่ำกว่า รายงานการศึกษการปรับสภาพชีวมวลโดยแบคทีเรียหลายสาย พันธุ์ เช่น *Bacillus* sp. AS3 (109) *Bacillus circulans* และ *Sphingomonas paucimobilis* (110) *Cellulomonas* และ *Zymomonas* spp. (34)

การเลือกใช้วิธีการปรับสภาพชีวมวลควรคำนึงถึงชนิดของชีวมวล เนื่องจากชีวมวลมี องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในปริมาณที่แตกต่างกัน และวิธีการปรับสภาพมี ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับโมเลกุลแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยข้อดีและข้อเสียของ วิธีการปรับสภาพ (ตาราง 2.2)

ตาราง 2.2 ข้อดีและข้อเสียของวิธีการปรับสภาพชีวมวลที่แตกต่างกัน

วิธีการปรับสภาพ	ข้อดี	ข้อเสีย	อ้างอิง
การบด การไม่ การตัด	ลดขนาดวัสดุและทำลายโครงสร้างผลึกเซลลูโลส	ใช้พลังสูง	(15, 58-60)
การใช้รังสี	ทำให้เกิดการแตกหักของเส้นใยและมีขนาดเล็กกลางทำให้เกิดการสลายด้วยเอนไซม์ได้ดี และได้น้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณสูง	เครื่องมือมีราคาแพง และไม่เหมาะกับการใช้ในระดับอุตสาหกรรม	(58, 63)
ไพโรไลซิส (pyrolysis)	เกิดสารระเหยน้อย	การสลายเกิดขึ้นช้า ใช้เวลานาน	(111)
การระเบิดด้วยไอน้ำ	เปลี่ยนโครงสร้างของลิกนิน สลายเฮมิเซลลูโลส	เกิดสารยับยั้งต่อกระบวนการชีวภาพ	(72)
การใช้น้ำร้อน	กำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ไม่เกิดสารยับยั้ง	ต้องใช้อัตราส่วนของแข็งและของเหลวที่เหมาะสม และได้ผลไม่ดีในไม้เนื้ออ่อน	(73, 112-114)
การใช้กรด	เกิดปฏิกิริยาในสภาวะปกติ ลดการใช้พลังงาน สลายเฮมิเซลลูโลส และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลส	อุปกรณ์เกิดการกัดกร่อน และเกิดสารยับยั้งต่อกระบวนการชีวภาพ และมีค่าใช้จ่ายสูงในการนำกรดมาใช้ใหม่	(115)
การใช้ด่าง	ทำลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส โดยไม่เกิดการแตกหักของเฮมิเซลลูโลส	ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ร่วมกับด่างมีราคาแพง และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างลิกนิน	(116, 117)
การออกซิเดชัน (oxidation)	ทำลายโครงสร้างลิกนินแต่ไม่ส่งผลต่อเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส	กระบวนการดำเนินงานมีต้นทุนสูง	(75)
ของเหลวไอออนิก (ionic liquid)	มีประสิทธิภาพสูงในการนำเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส และไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งต่อกระบวนการชีวภาพ	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และใช้เวลานานในการปรับสภาพ อาจทำให้เกิดการระเบิดได้	(116, 118)
การใช้จุลินทรีย์	สลายลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส ใช้พลังงานต่ำ ไม่ใช้สารเคมี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม	อัตราการย่อยสลายช้า ใช้ระยะเวลาในกระบวนการ และใช้พื้นที่มากในการดำเนินงาน	(93, 119, 120)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานการศึกษาองค์ประกอบของผักตบชวา (ตาราง 2.3) พบว่าการวิเคราะห์องค์ประกอบส่วนใหญ่ใช้ผักตบชวาทุกส่วนรวมกัน สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบแบบแยกส่วนใบ ลำต้น และราก (ตาราง 2.4)

ตาราง 2.3 องค์ประกอบของผักตบชวา (% w/w)

เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)	อ้างอิง
35.0	18.3	-	Abraham and Kurup, 1996 (121)
18.2	48.7	3.5	Nigam, 2002 (5)
19.5	33.4	9.3	Gunnarsson and Petersen, 2007 (4)
18.4	49.2	3.6	Kumar <i>et al.</i> , 2009 (2)
19.0	32.7	4.4	Sornvoraweat and Kongkiattikajorn, 2010 (122)
31.67	27.33	3.93	Reales-Alfaro <i>et al.</i> , 2013 (123)
27.55	39.83	14.96	Pattra and Sittijunda, 2015 (124)
20.37	42.29	4.23	Idrees <i>et al.</i> , 2013 (125)
32.5	38.1	11	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2016 (126)
34.19	17.66	12.22	Ahn <i>et al.</i> , 2012 (127)
31.6	27.3	9.3	Reales-Alfaro <i>et al.</i> , 2013 (123)
31.6	38.1	11	Kalhorinia <i>et al.</i> , 2013 (128)
23.31	22.11	12.58	Xia <i>et al.</i> , 2013 (129)
35	33	15.5	Ganguly <i>et al.</i> , 2013 (130)
19.2	40.0	4.8	Singh and Bishnoi, 2013 (131)
24.15	27.23	13.39	Cheng <i>et al.</i> , 2014 (132)
31.81	25.64	3.55	Yan <i>et al.</i> , 2015 (133)
28.9	30.8	4.6	Lin <i>et al.</i> , 2015 (134)
18.07	28.21	7.03	Zhang <i>et al.</i> , 2016 (135)
31.44	44.68	19.99	Das <i>et al.</i> , 2016a (136)
24.5	34.1	8.6	Das <i>et al.</i> , 2016b (137)

*(%) เท่ากับ กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

ตาราง 2.4 องค์ประกอบของผักตบชวาในส่วนต่างๆ (% w/w) (128)

	ใบ (%)	ลำต้น (%)	ราก (%)
เซลลูโลส	33.4	29.6	9.0
เฮมิเซลลูโลส	29.1	36.2	20.0
ลิกนิน	12.4	14.1	31.5

รายงานการศึกษาของ Nigam และคณะในปี 2002 ทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1% ร่วมกับการรีฟลักซ์ (reflux) ระยะเวลา 7 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 21% (5) รายงานการศึกษาของ Kumar และคณะในปี 2009 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2% ร่วมกับการทำรีฟลักซ์ ระยะเวลา 7 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 18.8% ซึ่งน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ได้มาจากเฮมิเซลลูโลส (น้ำตาลเพนโทส) (138) และรายงานการศึกษาของ Harun และคณะในปี 2011 ใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5% สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 12% (20) นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาของ Reales-Alfaro และคณะในปี 2013 ทำการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2% สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 33.3% (123)

ในปี 2013 Fileto-Perez และคณะได้ทำการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2% สภาวะอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 90 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 54% (139) นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาของ Idrees และคณะในปี 2014 ทำการปรับสภาพผักตบชวาที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3% แล้วทำการสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 1.15 ± 0.12 , 30.38 ± 0.77 , 31.85 ± 0.8 และ 36.68 ± 0.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (140) ซึ่งพบรายงานการศึกษาการปรับสภาพผักตบชวาของ Satyanagalakshmi ในปี 2011 โดยใช้สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที ปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 2% กรดไฮโดรคลอริก 2% กรดอะซิติก 30% และกรดฟอร์มิก 30% พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 32.7%, 27.7%, 9.7% และ 8.8% ตามลำดับ (141)

การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกับวิธีทางสถิติ Response Surface Methodology (RSM) พบรายงานการศึกษาของ Pattrra และ Sittijunda ในปี 2015 โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.31% ในการปรับสภาพก้านผักตบชวาเขย่าที่ความเร็ว 264.4 รอบต่อนาที (rpm) ระยะเวลา 7.73 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรวม 13 กรัมต่อลิตร (124) นอกจากนี้ยังพบรายงานของ Zhang และคณะในปี 2016 ทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1% สภาวะอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 19.7% (135) และรายงานของ Aswathy และคณะในปี 2010 ทำการปรับสภาพผักตบชวาโดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.88% สภาวะอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวิซ์ 13.6% (142)

รายงานการศึกษาของ Das และคณะในปี 2016a ทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2% สภาวะอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบว่าได้น้ำตาลจากการสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 42.56% (136) และรายงานการศึกษาของ Guragain ในปี 2011 ทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1% สภาวะอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 40 นาที พบว่าได้น้ำตาลจากการสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 22.3% (143)

นอกจากนี้ยังพบรายงานการปรับสภาพผักตบชวาด้วยสารเคมีชนิดอื่นๆ เช่น รายงานการศึกษาของ Idrees และคณะในปี 2013 ทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยโซเดียมซัลไฟต์ (sodium

sulfide) ความเข้มข้น 1.0% สภาวะอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การสลายด้วยเอนไซม์ Accellerase 1500 และ Optimash BG เท่ากับ 85.93% (125) และการศึกษาของ Ma และคณะในปี 2010 ทำการปรับสภาพผักตบชวาแบบร่วมกันระหว่างวิธีทางชีวภาพและเคมี โดยการใช้เชื้อราสีขาว *E. taxodii* บ่มร่วมกับผักตบชวา ระยะเวลา 10 วัน แล้วนำมาปรับสภาพต่อด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.25% สภาวะอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์ 33.3% (21)

ในปี 2016 Bhattacharya และคณะได้รายงานการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 1% 3% และ 5% ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง สภาวะอุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ระยะเวลา 2 และ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก 3% และ 5% ทำให้เกิดการเสียสภาพของเซลล์ มีการหลุดออกของส่วนคิวติเคิล (cuticle) เมื่อใช้ระยะเวลาปรับสภาพ 4 ชั่วโมง ทำให้เซลล์เปลี่ยนรูปร่าง (126)

เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของชีวมวลสามารถสลายให้เกิดน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักด้วยเอนไซม์ รายงานการศึกษาวิจัยการปรับสภาพชีวมวลส่วนใหญ่เน้นการกำจัดลิกนินที่เป็นอุปสรรคในการทำงานของเอนไซม์ และเพิ่มประสิทธิภาพการสลายเซลลูโลสเพื่อให้เกิดปริมาณน้ำตาลที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามพบรายงานการศึกษาเส้นใยฝ้ายที่มีเซลลูโลสบริสุทธิ์เปอร์เซ็นต์สูง ซึ่งไม่มีลิกนินและเฮมิเซลลูโลส มีค่าโครงสร้างผลึกสูง ทำให้การสลายเส้นใยฝ้ายด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพต่ำ (144, 145) ซึ่งค่าดัชนีโครงสร้างผลึก (crystallinity index) สามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนของส่วนที่เป็นโครงสร้างผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐาน และประสิทธิภาพการสลายโครงสร้างผลึกด้วยเอนไซม์จะมีค่าต่ำ (146)

ค่าดีกรีของพอลิเมอร์เซลลูโลสมีผลต่อการสลายด้วยเอนไซม์ โดยการลดลงของค่าดีกรีของพอลิเมอร์ทำให้การสลายด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เนื่องจากจำนวนปลายสายเซลลูโลสมีค่าเพิ่มขึ้นส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลสและจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงปลายสายเซลลูโลสได้มากขึ้น (27, 56, 147-150) ดังนั้นการปรับสภาพชีวมวลจึงส่งผลให้ดีกรีของพอลิเมอร์เซลลูโลสลดลง เพิ่มจำนวนปลายของสายเซลลูโลส และเอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นจึงได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลปริมาณสูงขึ้น ซึ่งวิธีการปรับสภาพแต่ละวิธีส่งผลต่อดีกรีพอลิเมอร์เซลลูโลสแตกต่างกัน เช่น สภาวะค่ากรด-เบส (pH) ต่ำ ทำให้ค่าดีกรีพอลิเมอร์เซลลูโลสต่ำลงมากกว่าการใช้แอมโมเนียในการปรับสภาพชีวมวล (151)

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่ป้องกันเซลลูโลสจากการสลายด้วยเอนไซม์และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และจุลินทรีย์ เนื่องจากลิกนินทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (30) สำหรับไม้เนื้อแข็งพบว่าย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ง่ายกว่าไม้เนื้ออ่อนหรือพีชล้มลุกทั่วไป เนื่องจากไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณ guaiacyl lignin สูงกว่า ทำให้พองตัวได้น้อยและเอนไซม์เข้าถึงเซลลูโลสได้น้อย (152) เมื่อเปรียบเทียบกับไม้เนื้อแข็งที่มี syringyl lignin ผสมร่วมกับ guaiacyl lignin (69) การกำจัดลิกนินช่วยให้ชีวมวลมีการพองตัว ทำลายโครงสร้างลิกนินเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและเพิ่มการสัมผัสกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น (33)

หมู่อะเซทิลที่อยู่บนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีความสำคัญต่อการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ (30) ซึ่งหมู่อะเซทิลที่พบบนเยื่อไม้ทำให้เกิดการยับยั้งการจับกันระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสและเซลลูโลส เนื่องจากเกิดการเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลลูโลสและเอนไซม์ละลายน้ำได้

น้อยลง (153) และยับยั้งการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเซลลูโลสและเอนไซม์เซลลูเลส (154) ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยลง ดังนั้นการกำจัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลสูงขึ้น อย่างไรก็ตามพบรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงการกำจัดหมู่อะเซทิลส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เมื่อปริมาณลิกนินต่ำ และ/หรือโครงสร้างผลึกเซลลูโลสสูง (32) ซึ่งนับเป็นผลกระทบทางอ้อมเนื่องจากการกำจัดหมู่อะเซทิลจากไซแลน ทำให้ไซแลนถูกสลายด้วยเอนไซม์ไซลาเนสได้ดีขึ้น ส่งผลให้สลายเซลลูโลสได้มากขึ้น (155) ดังนั้นการเพิ่มเอนไซม์ไซลาเนส จึงมีส่วนสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการสลายชีวมวลภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดหมู่อะเซทิลโดยการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ (alkaline) (32)

การใช้อัลคาไลน์ในกระบวนการปรับสภาพด้วยชีวมวลจะช่วยให้เกิดการกำจัดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนิน ซึ่งโครงสร้างของลิกนินที่เปลี่ยนแปลงมีความสำคัญกว่าปริมาณลิกนินที่ลดลง ในการปรับสภาพลำต้นข้าวโพดด้วยปูนขาวและโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่ามีปริมาณลิกนินเท่ากัน แต่การใช้ปูนขาวปรับสภาพทำให้เกิดการสลายด้วยเอนไซม์ได้ดีกว่า (156) ซึ่งการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ยังทำให้เกิดการสูญเสียไซแลนที่ไม่ต้องการด้วย (157) นอกจากนี้ยังพบว่าการกำจัดเฮมิเซลลูโลสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์ เช่น การใช้กรดซัลฟิวริกเจือจางในการปรับสภาพลำต้นข้าวโพด พบว่าเฮมิเซลลูโลสลดลงและประสิทธิภาพการสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์สูงขึ้น (158) การใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพที่ต่างกันด้วย ทำให้เกิดการกำจัดไซแลน 70-80% ส่งผลต่อการสลายด้วยเอนไซม์พบว่าได้กลูโคสมากกว่า 80% (157) อย่างไรก็ตามการกำจัดไซแลนในสภาวะรุนแรงทำให้ประสิทธิภาพการสลายด้วยเอนไซม์ต่ำ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกนิน โดยเกิดการรวมตัวที่บริเวณพื้นผิวของเซลลูโลสทำให้เอนไซม์เข้าถึงพื้นผิวของเซลลูโลสได้น้อยลง (157, 159)

ปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลต่อการสลายชีวมวลลิกเซลลูโลส เช่น ความหนาของผนังเซลล์ และความพรุน ซึ่งการปรับสภาพชีวมวลทำให้ความพรุนเพิ่มขึ้นและการสลายชีวมวลเกิดได้ดีขึ้น (15) พบว่าขนาดของรูพรุนในชีวมวลมีสัมพันธ์กับขนาดของเอนไซม์เซลลูเลสและส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (160) เมื่อชีวมวลมีพื้นที่ภายในของช่องว่างขนาดใหญ่ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสสามารถเข้าสู่ภายในช่องว่างของชีวมวลได้ (27)

พหุ ประสิทธิภาพ ชีวะ

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 3.1.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.1.4 เครื่องปั่นกวน (magnetic stirrer)
- 3.1.5 ตู้อบแห้ง (drying oven)
- 3.1.6 โถดูดความชื้น (desiccator)
- 3.1.7 ปีกเกอร์ (beaker)
- 3.1.8 กระบอกลวด (cylinder)
- 3.1.9 กระดาษกรอง (filter paper)
- 3.1.10 ผ้าขาวบาง
- 3.1.11 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.1.12 เตาเผา (muffle furnace)
- 3.1.13 เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 3.1.14 ถ้วยครุชชีเบล (crucible)
- 3.1.15 หลอดทดลอง (test tube)
- 3.1.16 คิวเวทพลาสติก (plastic cuvette)
- 3.1.17 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; model JSM-6460LV, JEOL, Inc.)
- 3.1.18 เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier Transform Infrared spectroscopy; FT-IR PERKIN ELMER, Spectrum GX FT-IR system)
- 3.1.19 เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-rays Powder Diffraction; Bruker D8 Advance)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 ACCELLERASE1500 ; Genecore (Dupont, Singapore)
- 3.2.2 Acetone (C_3H_6O) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.3 Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.4 Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.5 Potassium bromide (KBr) ; FT-IR Grade, Merck (Sigma-Aldrich)

- 3.2.6 Sodium hydroxide (NaOH) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.7 Sodium lauryl sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.8 Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.9 Sodium sulfite anhydrous (Na_2SO_3) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.10 Sulfuric acid (H_2SO_4) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.11 Triethylene glycol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$) ; Merck (Sigma-Aldrich)
- 3.2.12 3,5-dinitrosalicylic acid ; Merck (Sigma-Aldrich)

3.3 วิธีการดำเนินงาน

3.3.1 การเตรียมผักตบชวาและวิเคราะห์องค์ประกอบ (Sluiter *et al.*, 2008) (161)

ผักตบชวาที่นำมาศึกษาได้จากสถานีปฏิบัติการบ้านเก็ง ตำบลเก็ง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งมีอายุประมาณ 1-2 เดือน และความยาวประมาณ 20-35 เซนติเมตร โดยผักตบชวาที่เก็บมาได้จะนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน แล้วทำการตัดแยกส่วนของรากออกจากใบและลำต้น แล้วทำการหั่นใบและลำต้นให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วทำการอบแห้งภายในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของแข็งรวม (total solid)

$$\% \text{ ของแข็งรวม} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

3.3.1.1 การวิเคราะห์ acid soluble lignin นำตัวอย่างผักตบชวาที่ผ่านการอบแห้ง น้ำหนัก 0.3 กรัม เติม 72% H_2SO_4 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเจือจางกรดซัลฟิวริกโดยการล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปอบด้วยเครื่องนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการกรองเพื่อแยกส่วนของเหลวและของแข็ง นำส่วนของเหลวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่าลิกนินที่ละลายในกรด

3.3.1.2 การวิเคราะห์ acid insoluble lignin นำตัวอย่างส่วนของแข็งที่ได้จากขั้นตอน 3.3.1.1 มาทำการวิเคราะห์ปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด โดยการล้างส่วนของแข็งด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง (จนกระทั่งน้ำหนักคงที่) จากนั้นนำมาเผาที่อุณหภูมิ 575 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหา ค่าลิกนินที่ไม่ละลายในกรด

3.3.1.3 การวิเคราะห์ Neutral Detergent Fiber (NDF) นำตัวอย่างผักตบชวาที่แห้งและบดละเอียด ขนาด 1 มิลลิลิตร น้ำหนัก 1 กรัม แล้วเติมสารละลาย Neutral Detergent Fiber

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการ reflux ระยะเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรอง แล้วล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งไม่มีฟอง และนำตัวอย่างมาล้างด้วยอะซิโตน (จนกระทั่งไม่มีสี) จึงนำตัวอย่างไปอบให้แห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาค่า NDF

3.3.1.4 การวิเคราะห์ Acid Detergent Fiber (ADF) นำตัวอย่างผักตบชวาที่แห้งและบดละเอียด ขนาด 1 มิลลิลิตร น้ำหนัก 1 กรัม แล้วเติมสารละลาย Acid Detergent Fiber ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการ reflux ระยะเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการกรอง แล้วล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งไม่มีฟอง และนำตัวอย่างมาล้างด้วยอะซิโตน (จนกระทั่งไม่มีสี) จึงนำตัวอย่างไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาค่า ADF

3.3.2 การปรับสภาพผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3.3.2.1 การปรับสภาพผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกและวิเคราะห์องค์ประกอบ

นำผักตบชวามาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ปรับสภาวะกรด-ด่างให้มีค่าประมาณ 7 แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพมาวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และการทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบของผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีของ Sluiter และคณะ (2008)

3.3.2.2 การปรับสภาพผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกและวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

- ก. กำหนดสภาวะการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง
- ข. กำหนดสภาวะการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v) อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง
- ค. กำหนดสภาวะการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง
- ง. กำหนดสภาวะการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนการปรับสภาพ

- 1) นำผักตบชวา น้ำหนัก 1 กรัม ผสมร่วมกับกรดซัลฟิวริกในอัตราส่วน 1:10 (กรัมต่อมิลลิลิตร)
- 2) นำตัวอย่างผักตบชวาที่เตรียมได้มาทำการแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 3) ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS

3.3.3 การสลายผักตบชวาด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

การย่อยสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.3 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กำหนดระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 และ 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ของ Miller และคณะในปี 1959

3.3.4 การย่อยสลายผักตบชวาโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้นที่แตกต่างกันและวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

การสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M acetate pH 5.0 ทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้เทคนิค 3,5-dinitrosalicylic (DNS) method (Miller, 1959) (162)

นำตัวอย่างสารละลายที่ได้จากการปรับสภาพหรือการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการลดอุณหภูมิของตัวอย่าง แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ได้

3.3.6 การวิเคราะห์พื้นผิวผักตบชวากับกล้องจุลทรรศน์ (SEM)

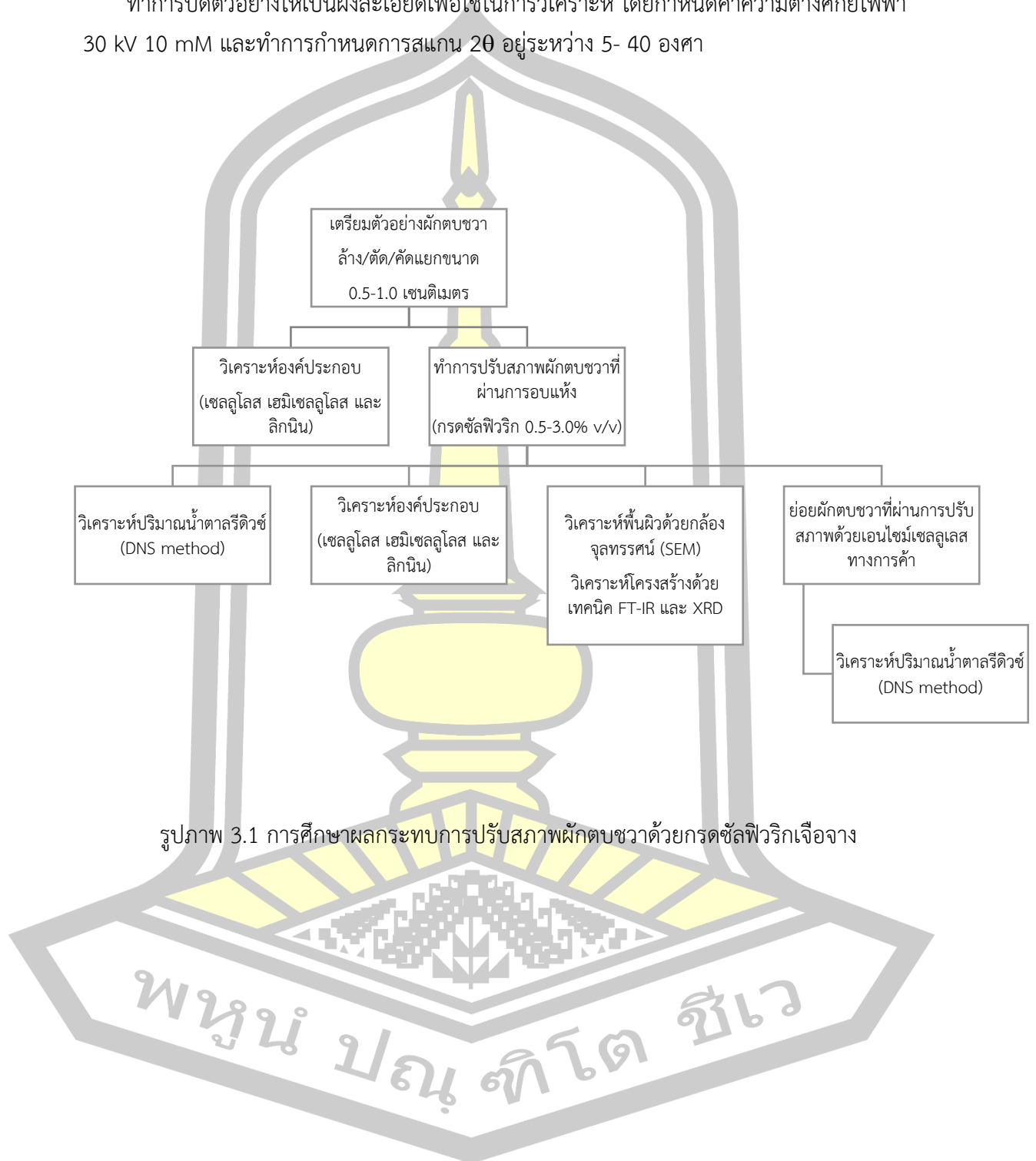
นำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง มาทำการวิเคราะห์พื้นผิวและศึกษาโครงสร้างทางกายภาพของเส้นใยผักตบชวาก่อน และหลังการปรับสภาพ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง

3.3.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผักตบชวาด้วย FT-IR

ทำการผสมผักตบชวาร่วมกับ KBr แล้วทำการบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นนำมาอัดให้เป็นแผ่นด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก เพื่อนำมาวิเคราะห์ที่ช่วง wave number 4,000 ถึง 400 cm^{-1} โดยกำหนดช่วงคลื่นเท่ากับ 4 cm^{-1} เพื่อความละเอียดของการสแกนตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์สเปกตรัมที่เกิดขึ้น

3.3.8 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผักตบชวาด้วย XRD

ทำการบดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยกำหนดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 30 kV 10 mA และทำการกำหนดการสแกน 2θ อยู่ระหว่าง 5- 40 องศา



รูปภาพ 3.1 การศึกษาผลกระทบการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง

พหุ ประถมศึกษา

บทที่ 4 ผลการศึกษา

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาก่อนการปรับสภาพ

การวิเคราะห์องค์ประกอบผักตบชวาก่อนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก โดยการใช้ตัวอย่างผักตบชวอบแห้ง (จนกระทั่งน้ำหนักคงที่) แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ได้ทำการบั่นเพื่อลดขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แล้วทำการผสมส่วนของใบและลำต้นในอัตราส่วน 1:1 (ของน้ำหนักแห้ง) ผลการวิเคราะห์พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผักตบชวามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 32.11 ± 2.31 และ 38.45 ± 3.34 (% w/w) ตามลำดับ ในขณะที่ลิกนินมีค่า 11.02 ± 1.42 (% w/w) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสพบว่าลิกนินมีเปอร์เซ็นต์ค่อนข้างต่ำ

ตาราง 4.1 องค์ประกอบของผักตบชวา (เปอร์เซ็นต์ % w/w)

องค์ประกอบ (% w/w)	ลำต้นและใบ
เซลลูโลส	32.11 ± 2.31
เฮมิเซลลูโลส	38.45 ± 3.34
ลิกนิน	11.02 ± 1.42

4.2 การปรับสภาพผักตบชวด้วยกรดซัลฟิวริก

4.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 (% v/v) สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

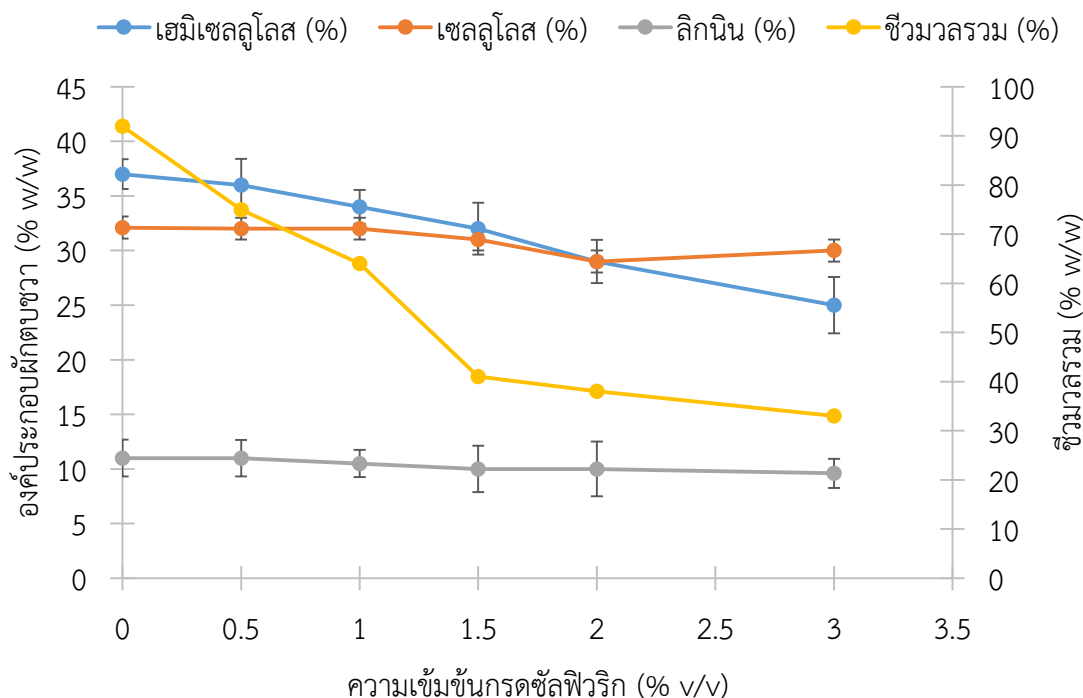
การเปรียบเทียบองค์ประกอบของผักตบชวาก่อนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก และหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 (% v/v) โดยทำการปรับสภาพในสภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ยกเว้นตัวอย่างชุดควบคุม จะใช้น้ำกลั่นแทนการใช้กรดซัลฟิวริก และการวิเคราะห์องค์ประกอบในส่วนของแข็งที่ผ่านการกรองแยกส่วนไฮโดรไลสผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1

ตาราง 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของผักตบชวาพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพ มีปริมาณของเซลลูโลสเท่ากับ 27-32 % (w/w) ซึ่งค่อนข้างใกล้เคียงกันกับชุดควบคุม และผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ แม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกจะไม่ส่งผลโดยตรงต่อการลดลงของปริมาณลิกนิน แต่ส่งผลต่อการลดลงของเฮมิเซลลูโลส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 3 % (v/v) ส่งผลให้ปริมาณของเฮมิเซลลูโลสลดลงเหลือ 25 % (w/w) เมื่อเปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เนื่องจากสารละลายกรดสามารถสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมต่อน้ำโมเลกุลเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ ดังนั้นการสลายเฮมิเซลลูโลสจึงเกิดขึ้นได้ดีกว่าการสลายเซลลูโลส ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของลิกนินมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างต่ำ

เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพค่อนข้างต่ำ ซึ่งไม่สามารถละลายลิกนินได้ รวมไปถึงความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกและระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพไม่เพียงพอ จึงทำให้การละลายลิกนินเกิดขึ้นได้ไม่ดี

ตาราง 4.2 องค์ประกอบฝักรับสภาพผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก (เปอร์เซ็นต์ % w/w)

ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (% v/v)	เซลลูโลส (% w/w)	เฮมิเซลลูโลส (% w/w)	ลิกนิน (% w/w)	ชีวมวลรวม (% w/w)
ฝักรับสภาพ (ก่อนการปรับสภาพ)	32.11±2.31	38.45±3.34	11.02±1.42	100
ฝักรับสภาพ (น้ำกลั่น)	32±2.64	37±1.36	11±1.68	92
0.5	32±2.10	36±2.41	11±1.67	75
1.0	31±3.14	34±1.56	10±1.24	64
1.5	29±2.55	32±2.37	10±2.12	41
2.0	30±2.21	29±1.97	10±2.53	38
3.0	27±1.26	25±2.58	9.6±1.33	33



รูปภาพ 4.1 เปอร์เซ็นต์องค์ประกอบฝักรับสภาพผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

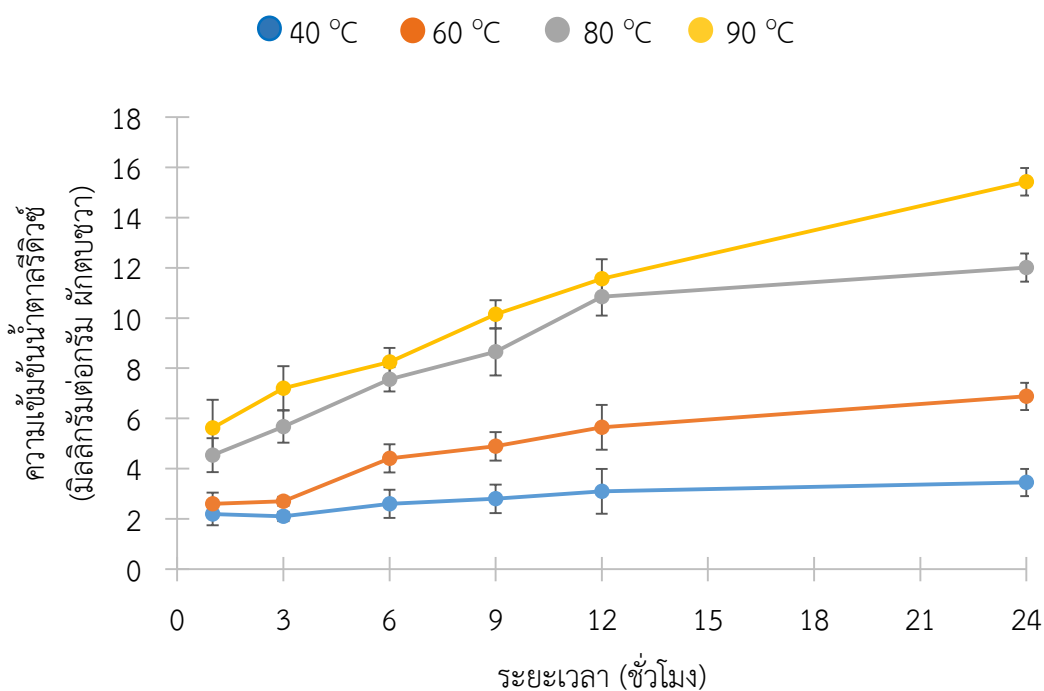
4.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง (ตาราง 4.4) โดยการนำไฮโดรไลสที่ผ่านการกรองแล้วทำการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าการเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5 % (v/v) ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นสูงขึ้น มีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และการปรับสภาพในสภาวะอุณหภูมิต่ำพบว่าได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ เนื่องจากระยะเวลาในการแช่ผักตบชวาไม่เพียงพอ จึงเกิดการสลายพันธะระหว่างหน่วยย่อยของน้ำตาลเกิดขึ้นไม่ดี และรายงานการใช้อุณหภูมิสูงสามารถส่งเสริมการเกิดไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) จากการแตกตัวของกรดซัลฟิวริกได้ดี จึงให้เกิดผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น (ตาราง 4.3 และรูปภาพ 4.2)

ตาราง 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัม ผักตบชวา)			
	40 °C	60 °C	80 °C	90 °C
1	2.23±0.45	2.67±0.54	4.54±0.68	5.62±1.12
3	2.17±0.18	2.71±0.58	5.68±0.65	7.21±0.87
6	2.61±0.56	4.41±0.89	7.56±0.48	8.25±0.66
9	2.82±0.69	4.89±0.65	8.65±0.94	10.15±0.56
12	3.12±0.89	5.65±0.68	10.85±0.75	11.56±0.78
24	3.45±0.54	6.88±0.67	12.01±0.56	15.42±0.55

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ



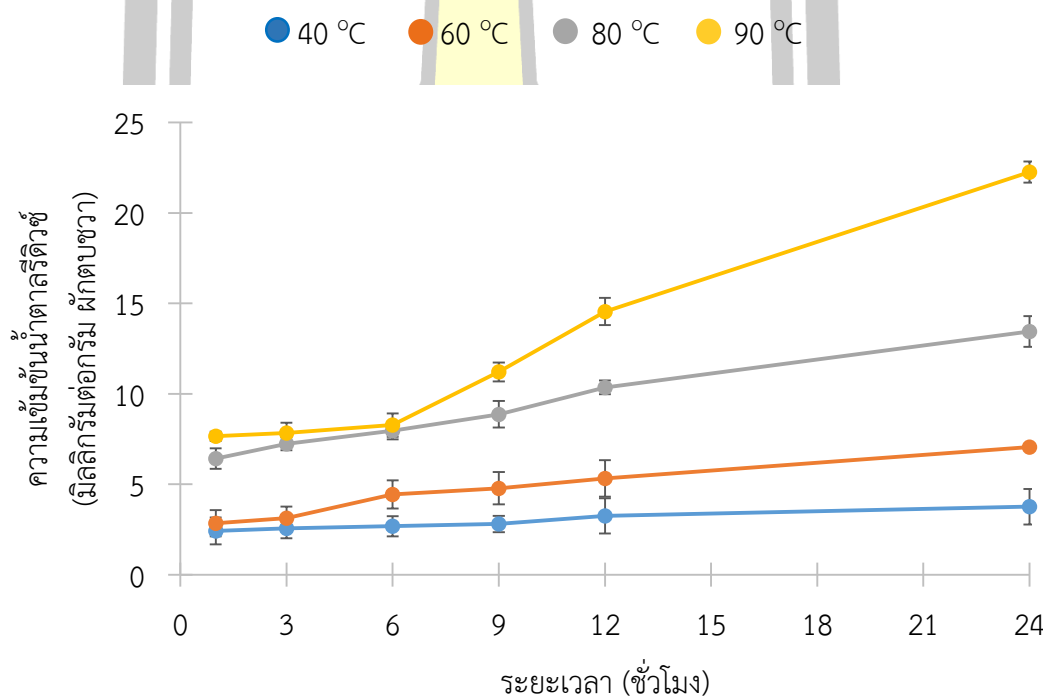
รูปภาพ 4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

4.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง (ตาราง 4.4) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงขึ้นที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และการปรับสภาพผักตบชวาในสภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 % (v/v) พบว่ามีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน เนื่องจากความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกต่ำ ส่งผลให้การสลายพันธะระหว่างหน่วยย่อยของน้ำตาลในสายโพลีเมอร์เกิดขึ้นได้ต่ำ จึงเกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเซสปริมาณต่ำเช่นกัน

ตาราง 4.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัม ผักตบชวา)			
	40 °C	60 °C	80 °C	90 °C
1	2.425±0.75	2.84±0.73	6.42±0.56	7.65±0.26
3	2.56±0.54	3.12±0.65	7.23±0.35	7.84±0.56
6	2.68±0.56	4.43±0.78	7.96±0.48	8.27±0.52
9	2.80±0.45	4.78±0.89	8.87±0.74	11.21±0.75
12	3.25±0.98	5.32±1.01	10.35±0.38	14.55±0.58
24	3.76±0.87	7.06±0.74	13.30±0.85	22.26±0.52



รูปภาพ 4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

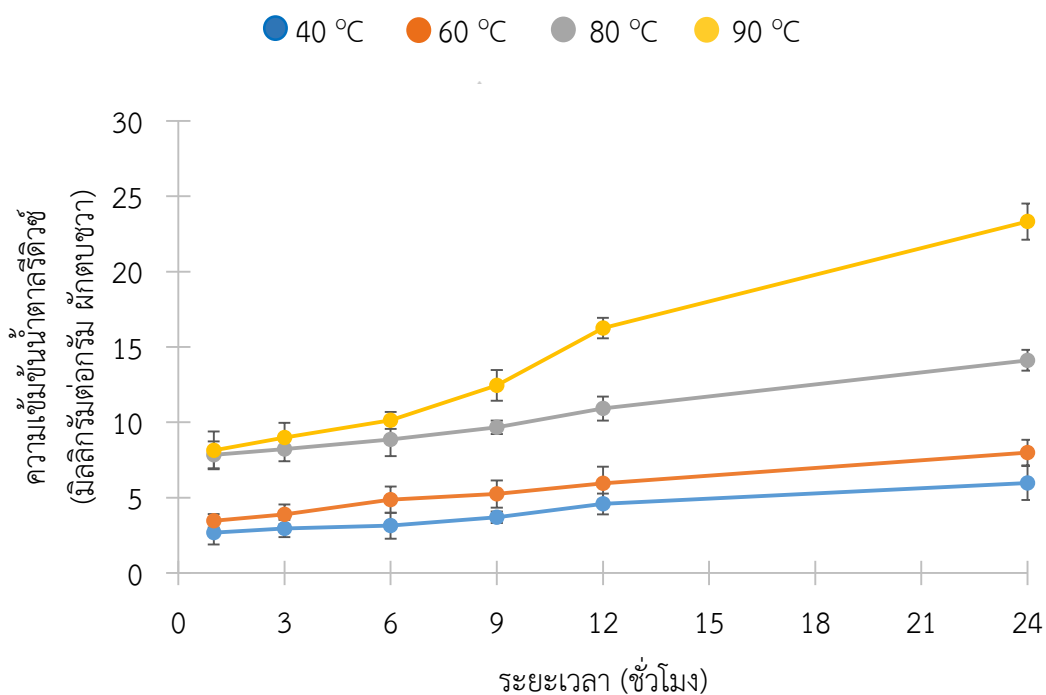
4.2.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง (ตาราง 4.5) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกส่งผลให้น้ำตาลรีดิวซ์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 % (v/v) อย่างไรก็ตามผลการเปรียบเทียบพบว่าความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 2.5 % (v/v) ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสสูงกว่า ซึ่งแสดงถึงการสลายพันธะระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นได้ดีกว่าเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นสูง

ตาราง 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัม ผักตบชวา)			
	40 °C	60 °C	80 °C	90 °C
1	2.68±0.78	3.47±0.45	7.84±0.91	8.14±0.126
3	2.95±0.57	3.89±0.65	8.22±0.87	8.98±0.98
6	3.14±0.86	4.87±0.87	8.85±1.12	10.13±0.56
9	3.69±0.38	5.24±0.91	9.67±0.62	12.44±1.02
12	4.58±0.69	5.96±1.09	10.91±0.81	16.25±0.68
24	5.97±1.13	7.98±0.85	14.11±0.69	23.32±1.2

พหุ ประถมศึกษา ชีวะ



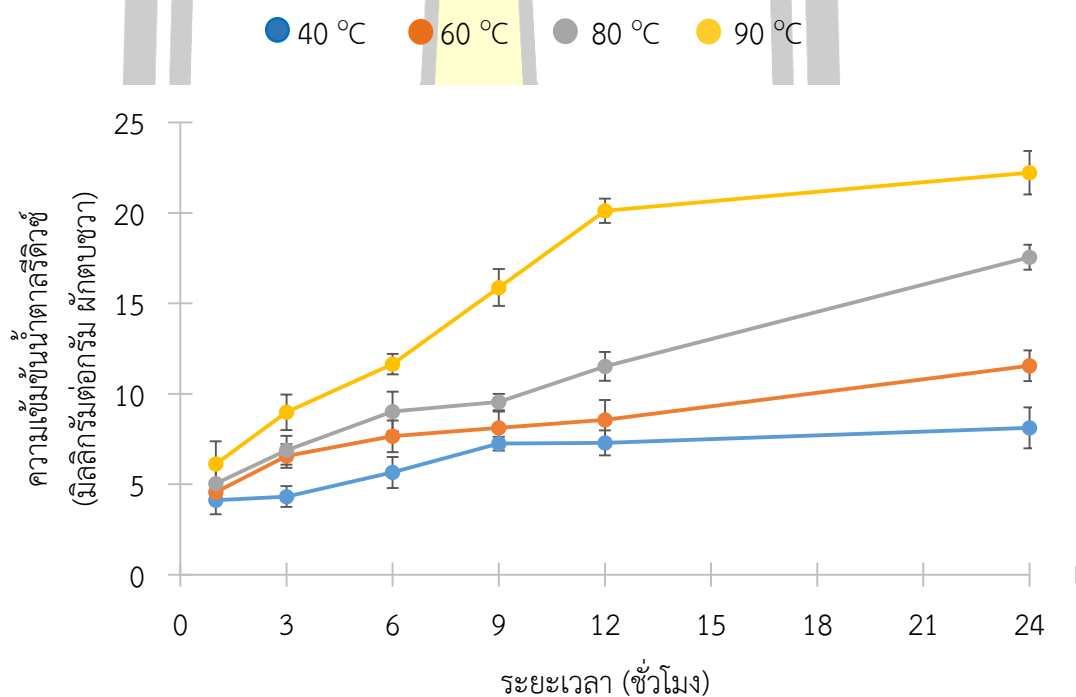
รูปภาพ 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีตวซในไฮโดรไลสเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

4.2.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีตวซในไฮโดรไลสเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีตวซในไฮโดรไลสเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง (ตาราง 4.7) พบว่าการเพิ่มระยะเวลาและอุณหภูมิในการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกทำให้น้ำตาลรีตวซมีความเข้มข้นสูงขึ้น รูปแบบการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีตวซมีลักษณะคล้ายกับการใช้กรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0 และ 2.5 % (v/v) ในการปรับสภาพผักตบชวา เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีตวซ พบว่าการใช้กรดซัลฟิวริก 3 % (v/v) พบน้ำตาลรีตวซในไฮโดรไลสเสทมากกว่าการใช้กรดซัลฟิวริกที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า อย่างไรก็ตามการเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพ พบว่าน้ำตาลรีตวซมีปริมาณลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีตวซและโปรตอนที่ได้จากการแตกตัวของกรดซัลฟิวริก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของน้ำตาลรีตวซบางส่วนแล้วส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีตวซด้วยเทคนิค DNS

ตาราง 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากผักตบชวาในขั้นตอนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อกรัม ผักตบชวา)			
	40 °C	60 °C	80 °C	90 °C
1	4.12±0.98	4.56±1.12	5.03±0.92	6.11±1.26
3	4.32±0.87	6.56±0.84	6.88±0.87	8.98±0.85
6	5.65±0.90	7.65±0.78	8.11±1.14	11.64±0.56
9	7.25±0.65	8.12±0.91	9.55±0.45	15.88±0.83
12	7.29±0.78	8.56±0.56	11.52±1.04	20.12±0.77
24	8.12±0.65	11.56±0.85	17.56±1.52	22.23±1.20

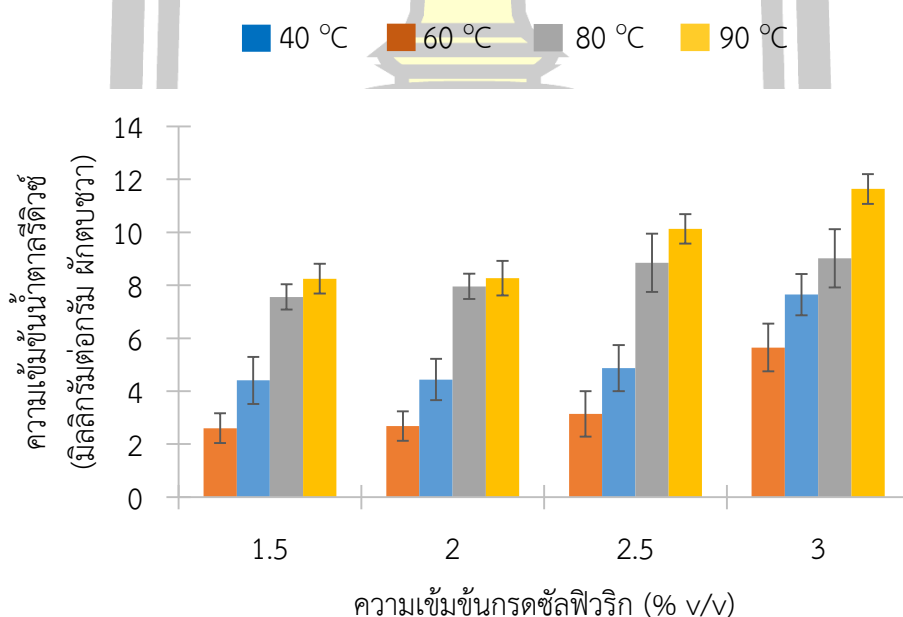


รูปภาพ 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

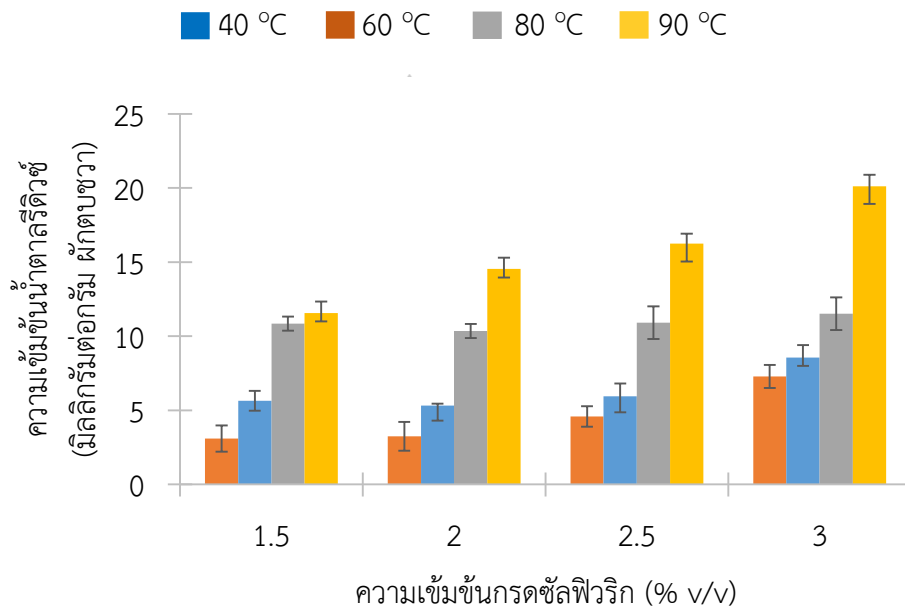
4.3 การเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริก

4.3.1 เปรียบเทียบการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

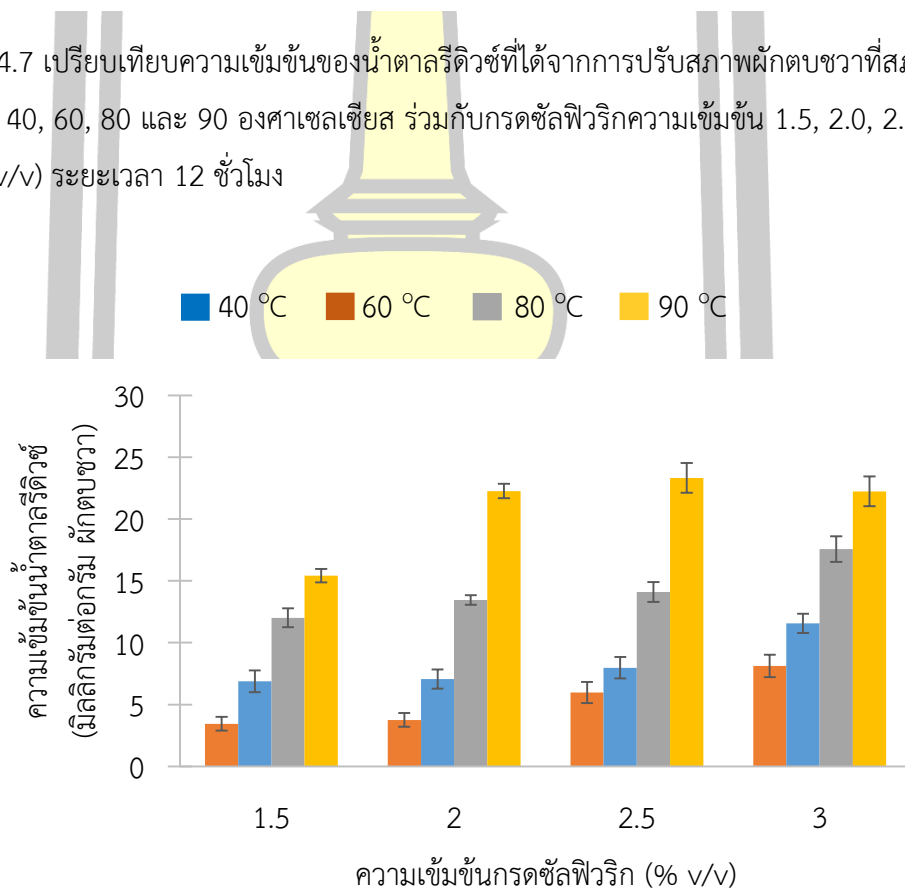
ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 % (v/v) สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียสระยะเวลา 6 ชั่วโมง (ภาพ 4.6) พบว่าการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.0 (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น เท่ากับ 11.64 มิลลิกรัมต่อกรัม (ผักตบชวา) เมื่อเปรียบเทียบการปรับสภาพที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง (ภาพ 4.7 และ 4.8) พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.12 และ 22.23 มิลลิกรัมต่อกรัม (ผักตบชวา) ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการปรับสภาพระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามที่ระยะเวลาการปรับสภาพ 12 และ 24 ชั่วโมง ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกัน



รูปภาพ 4.6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 6 ชั่วโมง



รูปภาพ 4.7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีตีวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 12 ชั่วโมง



รูปภาพ 4.8 เปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีตีวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพผักตบชวาที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

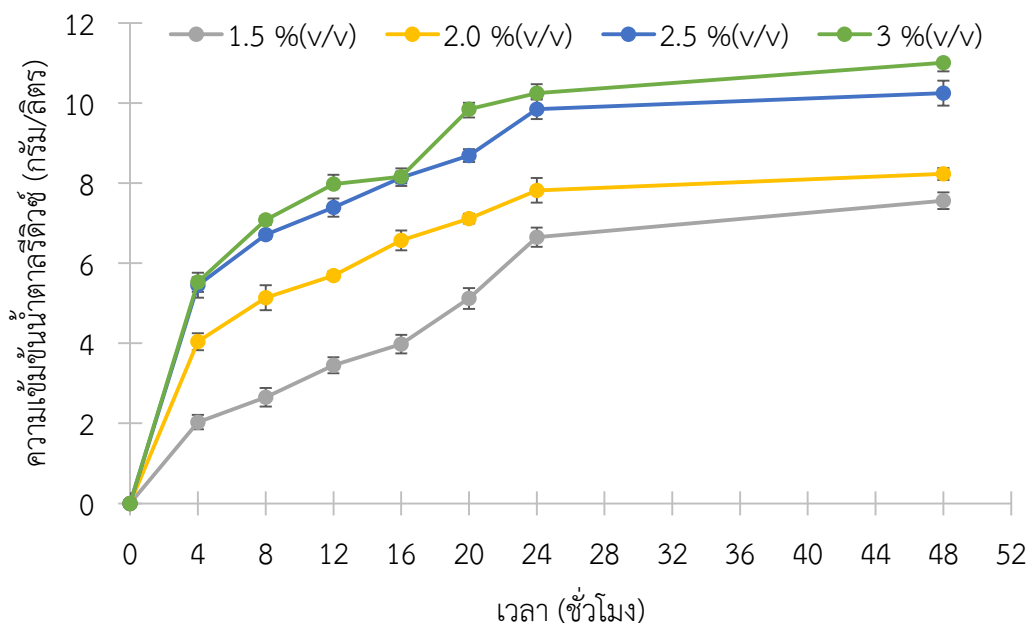
4.4 การสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

4.4.1 การใช้เอนไซม์เซลลูเลสสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.3 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M acetate pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 และ 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายผักตบชวาด้วยเอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการปรับสภาพ และการเพิ่มระยะเวลาในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ส่งผลให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น โดยความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 11.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และระยะเวลาในการสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ตาราง 4.7)

ตาราง 4.7 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (% v/v)			
	1.5	2.0	2.5	3.0
0	0	0	0	0
4	2.03±0.18	4.04±0.24	5.45±0.31	5.53±0.25
8	2.65±0.23	5.14±0.31	6.71±0.13	7.08±0.12
12	3.45±0.21	5.69±0.16	7.39±0.23	7.98±0.11
16	3.98±0.30	6.57±0.25	8.14±0.25	8.16±0.23
20	5.12±0.26	7.11±0.12	8.69±0.19	9.85±0.21
24	6.65±0.24	7.82±0.33	9.85±0.26	10.25±0.17
48	7.56±0.22	8.23±0.17	10.25±0.32	11.01±0.22



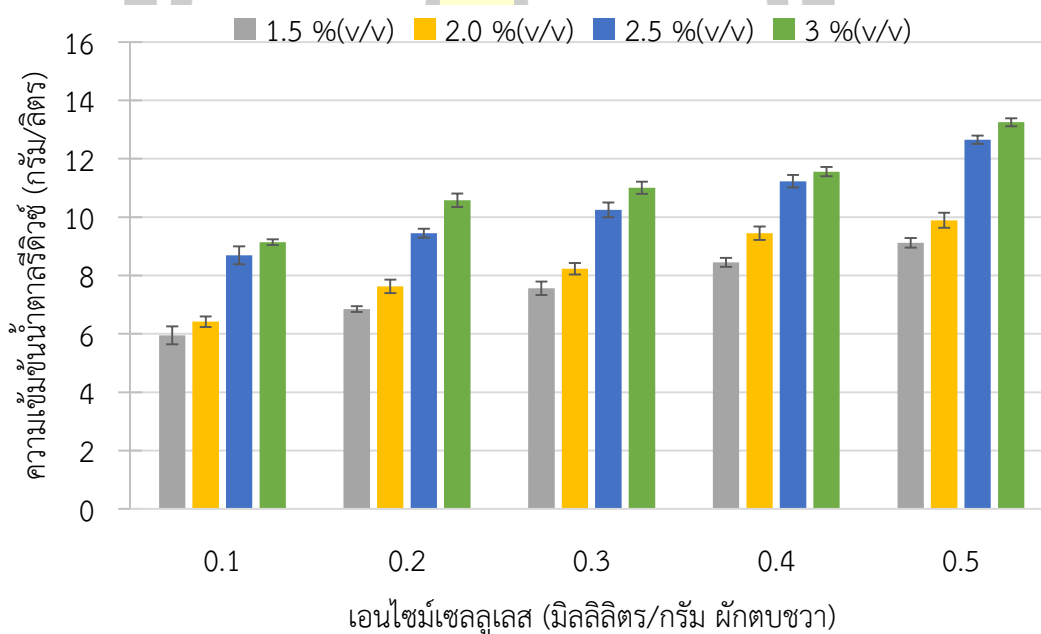
รูปภาพ 4.9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์โดยการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ด้วย เอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.3 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา)

4.4.2 การใช้เอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม สลาย ผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ร่วมกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M acetate pH 5.0 ทำ การเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดขึ้นจากการสลายด้วยเอนไซม์มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ ใช้ในการปรับสภาพ และการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์เซลลูเลสส่งผลให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 13.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการปรับสภาพ ผักตบชวากับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ตาราง 4.8)

ตาราง 4.8 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ปริมาณแตกต่างกันในสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นต่าง ๆ

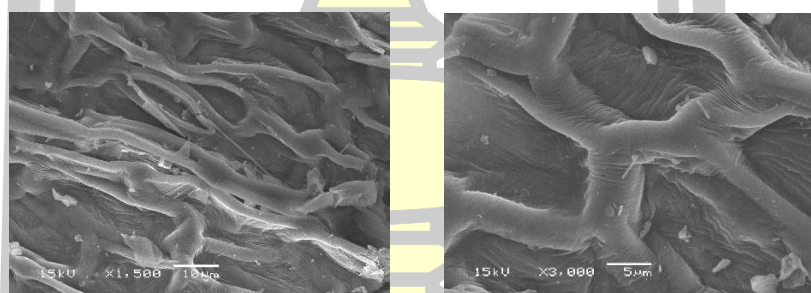
ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (มิลลิลิตร/กรัม ผักตบชวา)	ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (% v/v)			
	1.5	2.0	2.5	3.0
0.1	5.95±0.31	6.42±0.18	8.69±0.37	9.14±0.20
0.2	6.85±0.11	7.63±0.23	9.45±0.15	10.58±0.23
0.3	7.56±0.23	8.23±0.28	10.25±0.25	11.01±0.21
0.4	8.45±0.15	9.45±0.24	11.23±0.21	11.56±0.16
0.5	9.12±0.16	9.89±0.26	8.69±0.14	13.25±0.14



รูปภาพ 4.10 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์โดยการสลายผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร/กรัม (ผักตบชวา)

4.5 การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ (SEM)

การศึกษาวิเคราะห์ตัวอย่างผักตบชวาก่อนการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะโครงสร้างของพื้นผิวก่อนข้างเรียบ มีความขรุขระน้อย ไม่พบการแตกหักของพื้นผิว (รูปภาพ 4.11) เมื่อทำการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกที่สภาวะแตกต่างกัน โดยทำการเปรียบเทียบผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส (รูปภาพ 4.12-4.15) พบว่าลักษณะของพื้นผิวมีรอยแตกหัก ไม่เรียบ และมีช่องว่างเกิดขึ้น ซึ่งพบความขรุขระของพื้นผิวและช่องว่างเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ ดังนั้นการปรับสภาพผักตบชวาด้วยกรดซัลฟิวริกส่งผลต่อลักษณะพื้นผิวเส้นใยเมื่อเปรียบเทียบกับผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ

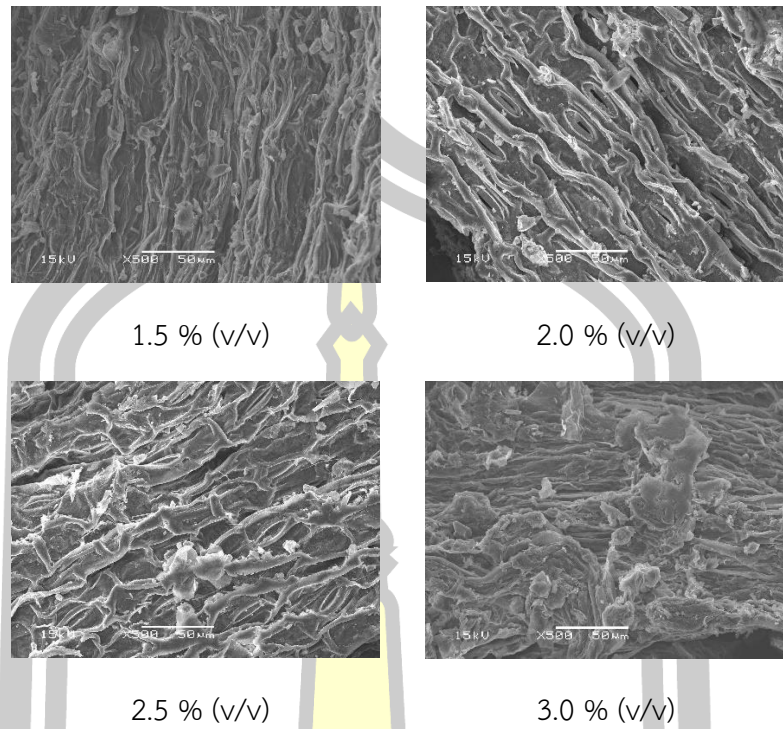


ก)

ข)

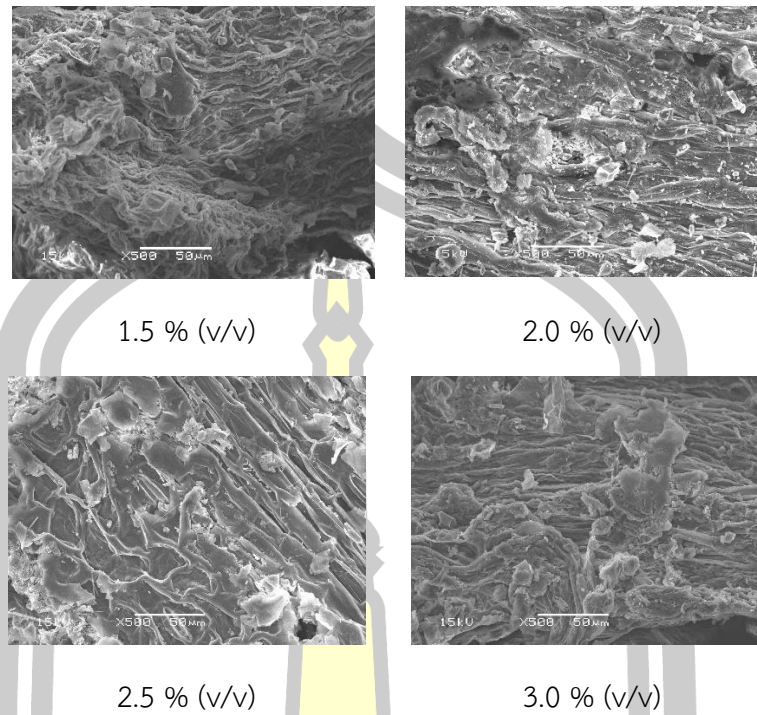
รูปภาพ 4.11 พื้นผิวของผักตบชวาที่ไม่ผ่านการปรับสภาพโดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) ก) กำลังขยาย 1,500 เท่า ข) กำลังขยาย 3,000 เท่า

พหุ ประ โท ชีวะ



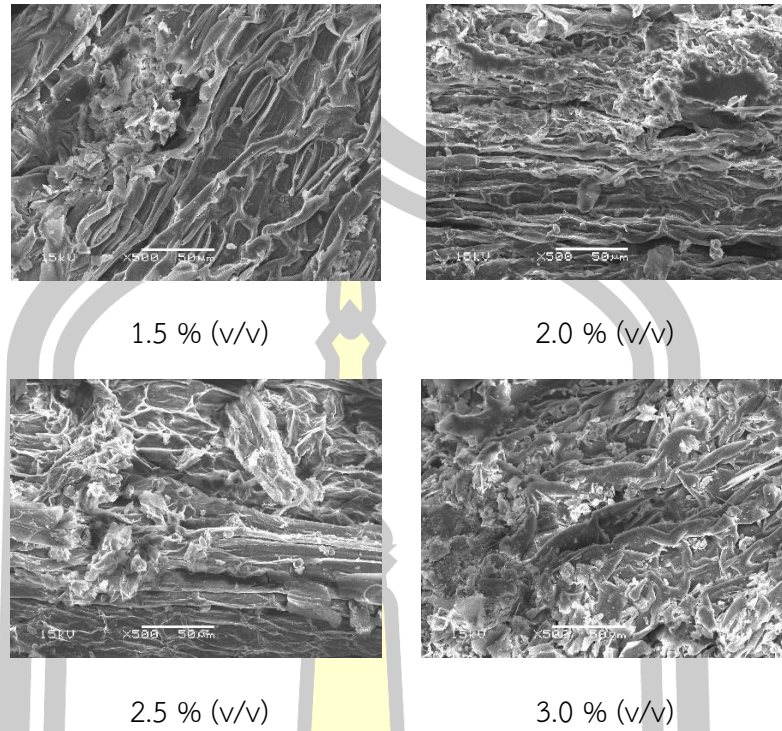
รูปภาพ 4.12 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า





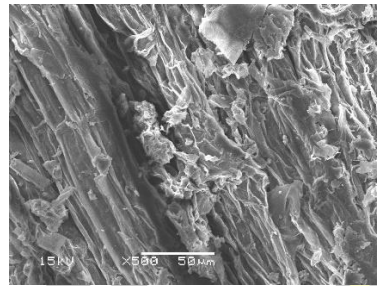
รูปภาพ 4.13 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า



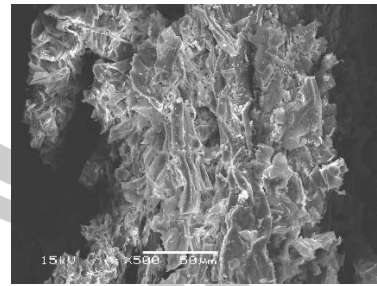


รูปภาพ 4.14 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า

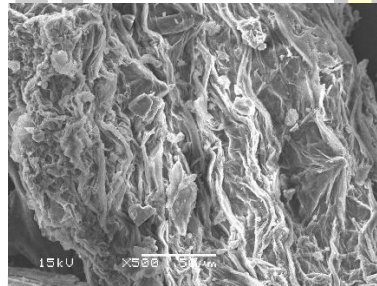
พหุ ประถมศึกษา ชีวะ



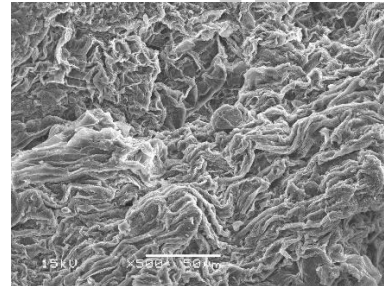
1.5 % (v/v)



2.0 % (v/v)



2.5 % (v/v)



3.0 % (v/v)

รูปภาพ 4.15 พื้นผิวของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยกล้องจุลทรรศน์ (SEM) กำลังขยาย 500 เท่า

พหุพันธ์ ปณฺ ทิโต ชีเว

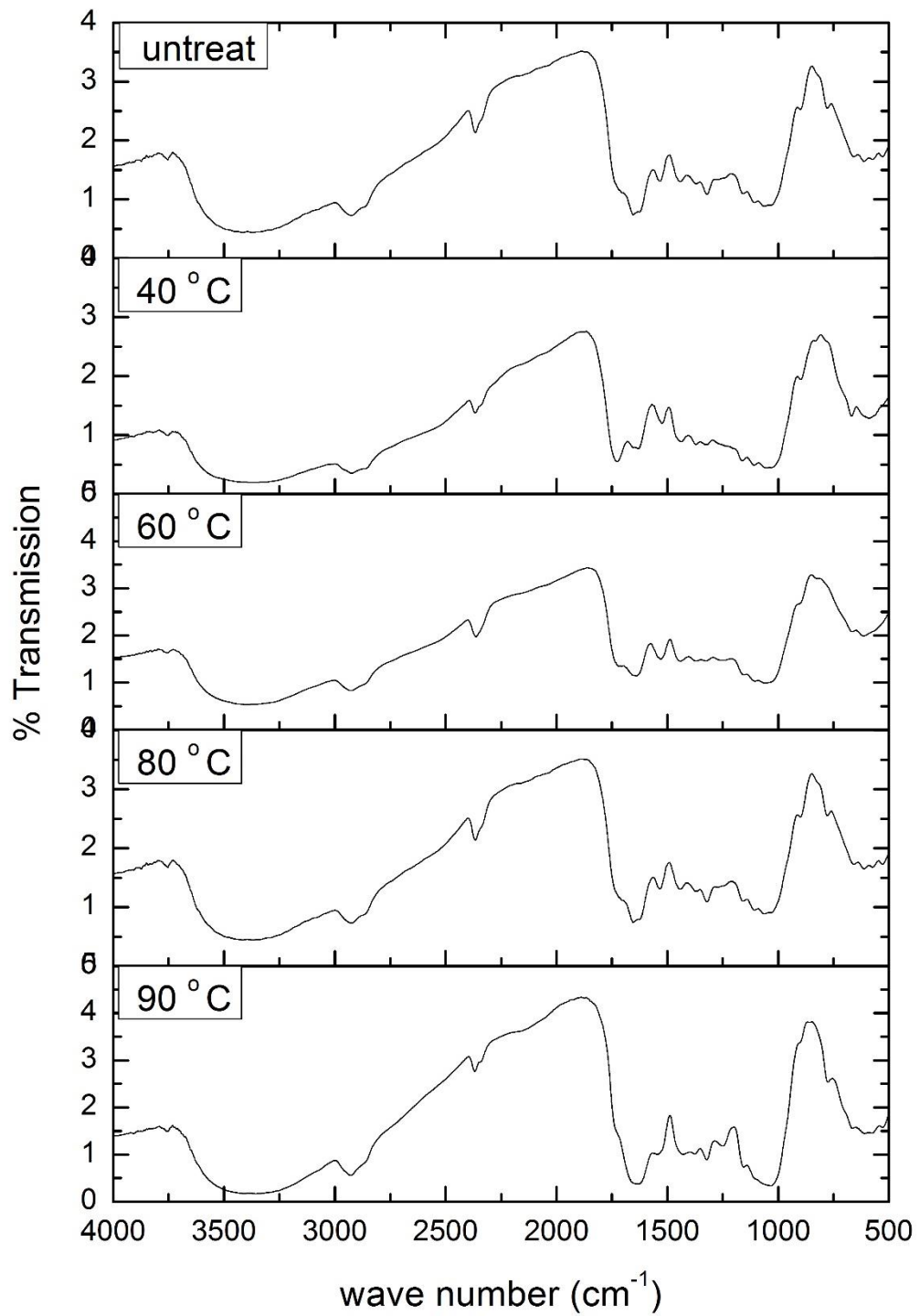
4.6 การวิเคราะห์โครงสร้างของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

การวิเคราะห์โครงสร้างและชนิดของสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในผักตบชวาด้วยเทคนิค FT-IR โดยอาศัยการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในผักตบชวา แล้วทำให้เกิดการสั่นและหมุนที่ความถี่การสั่นที่จำเพาะกับโมเลกุลของสารนั้นๆ แสดงผลเป็นสเปกตรัมที่มีพีค (peak) ที่จำเพาะ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 60 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของพีค 1030-1150 cm^{-1} หมายถึงการเปลี่ยนแปลงของเฮมิเซลลูโลส (Moretti *et al.* 2014) และพีค 1510 และ 1560 cm^{-1} หมายถึงหมู่เอโรมาติกของลิกนิน ในขณะที่พีค 1720-1740 cm^{-1} หมายถึงหมู่คาร์บอนิลของเซลลูโลส (รูปภาพ 4.16)

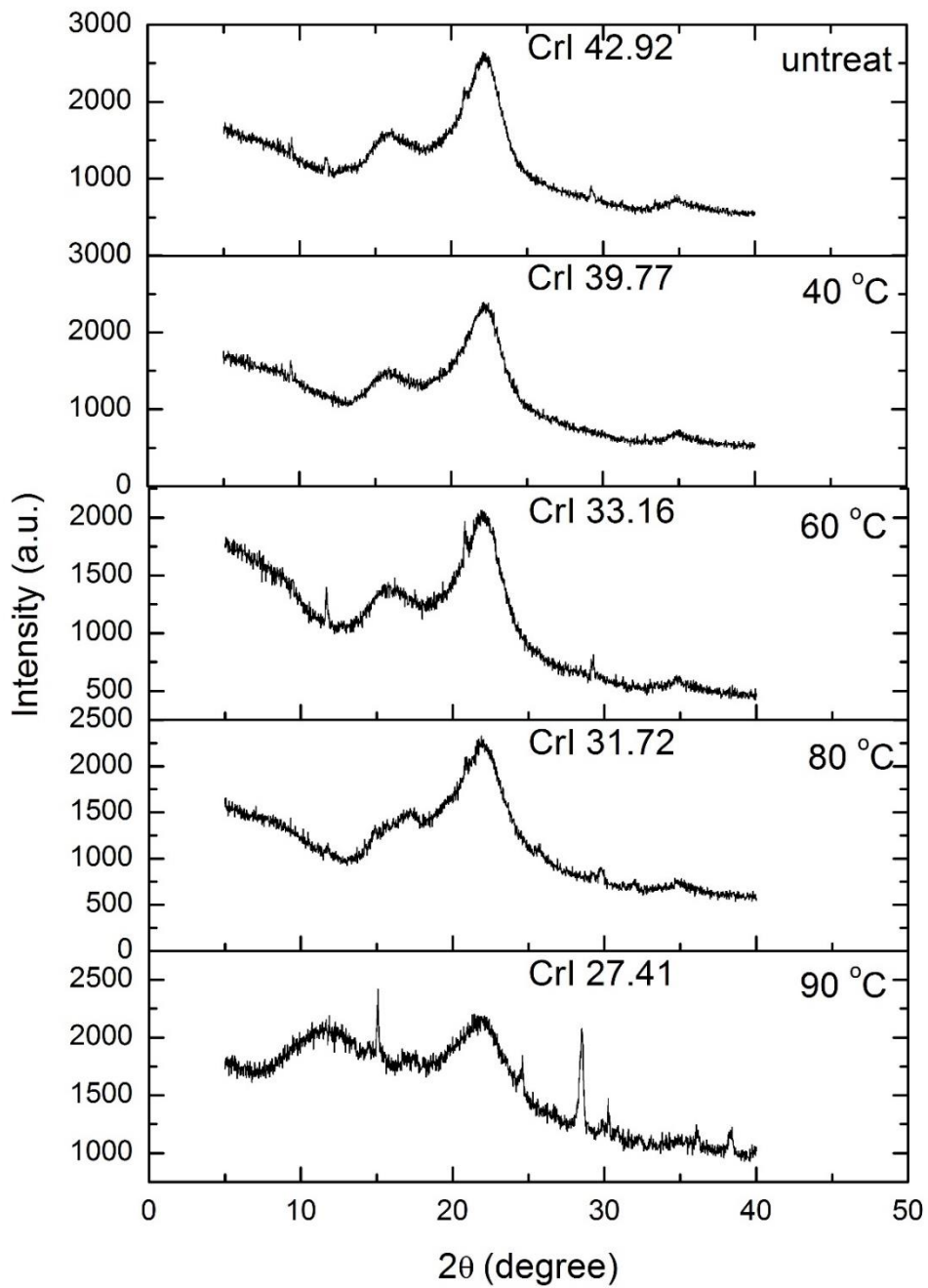
4.7 การวิเคราะห์โครงสร้างของผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (X-Ray Diffractometer; XRD)

เทคนิค XRD สามารถวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของผักตบชวา โดยอาศัยรังสีเอ็กซ์ที่ทราบความยาวคลื่นส่งไปกระทบตัวอย่าง ทำให้เกิดการเลี้ยวเบนของรังสีที่มุมต่าง ๆ กัน และวิเคราะห์ข้อมูลของสารประกอบแต่ละชนิดได้ สำหรับองค์ประกอบของเซลลูโลสภายในผักตบชวาสามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างได้ 2 แบบ คือ โครงสร้างผลึกและอสัณฐาน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์ค่าความเข้มของรังสีเอ็กซ์ที่เกิดจากการเลี้ยวเบนของรังสีที่มุม 2θ เท่ากับ 18 และ 22 องศา สำหรับโครงสร้างอสัณฐานและโครงสร้างผลึก ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ผักตบชวาก่อนการปรับสภาพมีค่าดัชนีผลึกเท่ากับ 42.92 ซึ่งมีค่าสูงกว่าผักตบชวาที่ผ่านการปรับสภาพ เมื่อเปรียบเทียบผักตบชวาหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 3.0 % (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่าความเข้มของรังสีเอ็กซ์และดัชนีผลึกมีค่าลดลง เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพสูงขึ้น (รูปภาพ 4.17)

พหุ ประถมศึกษา

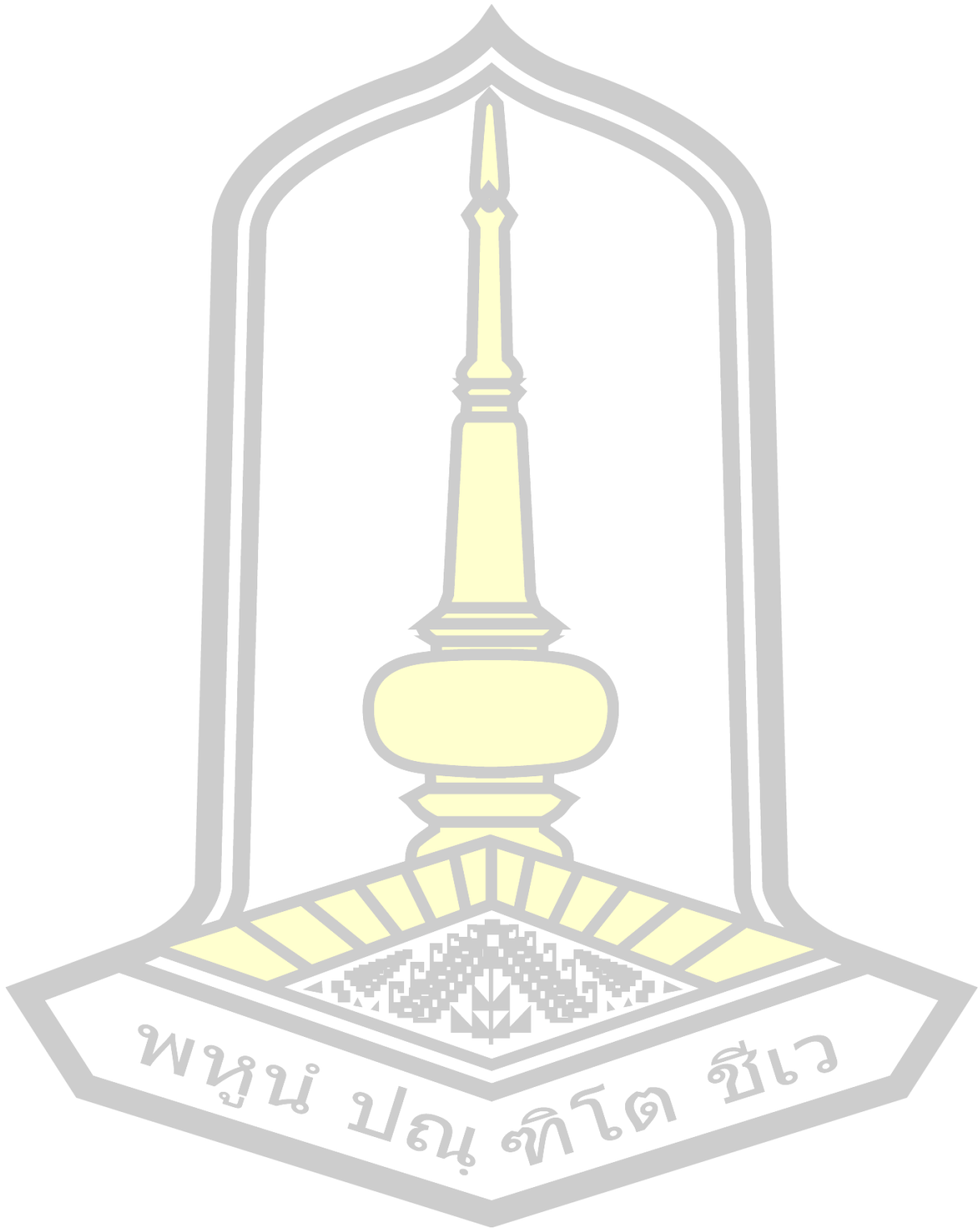


รูปภาพ 4.16 การวิเคราะห์ FT-IR ของผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง



รูปภาพ 4.17 การวิเคราะห์ XRD ของผักตบชวาก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 3.0 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 40, 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

1. Xie H, Shen H, Gong Z, Wang Q, Zhao ZK, Bai F. Enzymatic hydrolysates of corn stover pretreated by a N-methylpyrrolidone–ionic liquid solution for microbial lipid production. *Green Chemistry*. 2012;14(4):1202-10.
2. Kumar A, Singh L, Ghosh S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*. 2009;100(13):3293-7.
3. Mishima D, Kuniki M, Sei K, Soda S, Ike M, Fujita M. Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Bioresource Technology*. 2008;99(7):2495-500.
4. Gunnarsson CC, Petersen CM. Water hyacinths as a resource in agriculture and energy production: A literature review. *Waste Management*. 2007;27(1):117-29.
5. Nigam J. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose–fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*. 2002;97(2):107-16.
6. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*. 2009;27(2):185-94.
7. Dirar H, El Amin H. Methane fermentation of water hyacinth: effect of solids concentration and inoculum source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1988;4(3):299-312.
8. Malik A. Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. *Environment international*. 2007;33(1):122-38.
9. Forrest AK, Hernandez J, Holtzapple MT. Effects of temperature and pretreatment conditions on mixed-acid fermentation of water hyacinths using a mixed culture of thermophilic microorganisms. *Bioresource technology*. 2010;101(19):7510-5.
10. Hendriks A, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 2009;100(1):10-8.

11. Teghammar A, Yngvesson J, Lundin M, Taherzadeh MJ, Horváth IS. Pretreatment of paper tube residuals for improved biogas production. *Bioresource Technology*. 2010;101(4):1206-12.
12. Silverstein RA, Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Boyette MD, Osborne J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource technology*. 2007;98(16):3000-11.
13. da Costa Sousa L, Chundawat SP, Balan V, Dale BE. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current opinion in biotechnology*. 2009;20(3):339-47.
14. Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*. 2016;199:49-58.
15. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*. 2010;101(13):4851-61.
16. Galbe M, Zacchi G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *biomass and bioenergy*. 2012;46:70-8.
17. Janga KK, Hägg M-B, Moe ST. Influence of acid concentration, temperature, and time on decrystallization in two-stage concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and aspenwood: a statistical approach. *BioResources*. 2012;7(1):391-411.
18. Miller S, Hester R. Concentrated acid conversion of pine softwood to sugars. Part I: Use of a twin-screw reactor for hydrolysis pretreatment. *Chemical Engineering Communications*. 2007;194(1):85-102.
19. Hsu T-C, Guo G-L, Chen W-H, Hwang W-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4907-13.
20. Harun M, Radiah AD, Abidin ZZ, Yunus R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource technology*. 2011;102(8):5193-9.

21. Ma F, Yang N, Xu C, Yu H, Wu J, Zhang X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. *Bioresource technology*. 2010;101(24):9600-4.
22. Karapatsia A, Pappas I, Penloglou G, Kotrotsiou O, Kiparissides C. Optimization of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Phalaris aquatica* L. lignocellulosic biomass in batch and fed-batch processes. *BioEnergy Research*. 2017;10(1):225-36.
23. Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, Welton T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*. 2013;15(3):550-83.
24. Desvaux M. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS microbiology reviews*. 2005;29(4):741-64.
25. Fengel D, Wegener G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. 1984;613:1960-82.
26. Delmer DP, Amor Y. Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*. 1995;7(7):987-1000.
27. Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*. 2004;88(7):797-824.
28. Ha MA, Apperley DC, Evans BW, Huxham IM, Jardine WG, Viëtor RJ, et al. Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *The Plant Journal*. 1998;16(2):183-90.
29. Atalla RH, VanderHart DL. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*. 1984;223:283-6.
30. Chang VS, Holtzapple MT. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2000;84(1):5-37.
31. Nanda S, Mohammad J, Reddy SN, Kozinski JA, Dalai AK. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2014;4(2):157-91.
32. Zheng Y, Shi J, Tu M, Cheng Y-S. Chapter One-Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. *Advances in Bioenergy*. 2017;2:1-68.

33. Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*. 2011;29(6):675-85.
34. Singh P, Suman A, Tiwari P, Arya N, Gaur A, Shrivastava A. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008;24(5):667-73.
35. Teleman A, Harjunpää V, Tenkanen M, Buchert J, Hausalo T, Drakenberg T, et al. Characterisation of 4-deoxy- β -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*. 1995;272(1):55-71.
36. Teleman A, Tenkanen M, Jacobs A, Dahlman O. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono) xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate research*. 2002;337(4):373-7.
37. Brown ME, Chang MC. Exploring bacterial lignin degradation. *Current opinion in chemical biology*. 2014;19:1-7.
38. Itoh H, Wada M, Honda Y, Kuwahara M, Watanabe T. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 2003;103(3):273-80.
39. Gírio FM, Fonseca C, Carneiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*. 2010;101(13):4775-800.
40. Ran H, Zhang J, Gao Q, Lin Z, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for biofuels*. 2014;7(1):51.
41. Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*. 1999;65(1):24-33.
42. Alonso DM, Wettstein SG, Dumesic JA. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(24):8075-98.
43. Christopher LP, Yao B, Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Frontiers in Energy Research*. 2014;2:12.

44. Liu L, Sun J, Li M, Wang S, Pei H, Zhang J. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by FeCl_3 pretreatment. *Bioresource technology*. 2009;100(23):5853-8.
45. Stoklosa RJ, Hodge DB. Fractionation and improved enzymatic deconstruction of hardwoods with alkaline delignification. *Bioenergy Research*. 2015;8(3):1224-34.
46. Kang KE, Park D-H, Jeong G-T. Effects of NH_4Cl and MgCl_2 on pretreatment and xylan hydrolysis of miscanthus straw. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(2):1321-6.
47. Chandra RP, Gourelay K, Kim C-S, Saddler JN. Enhancing hemicellulose recovery and the enzymatic hydrolysis of cellulose by adding lignosulfonates during the two-stage steam pretreatment of poplar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2015;3(5):986-91.
48. Kim S, Park JM, Seo J-W, Kim CH. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. *Bioresource technology*. 2012;109:229-33.
49. Soudham VP, Raut DG, Anugwom I, Brandberg T, Larsson C, Mikkola J-P. Coupled enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation: ionic liquid pretreatment for enhanced yields. *Biotechnology for biofuels*. 2015;8(1):135.
50. Yoon LW, Ngoh GC, Chua M, Seak A, Hashim M. Comparison of ionic liquid, acid and alkali pretreatments for sugarcane bagasse enzymatic saccharification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2011;86(10):1342-8.
51. Karp EM, Resch MG, Donohoe BS, Ciesielski PN, O'Brien MH, Nill JE, et al. Alkaline pretreatment of switchgrass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2015;3(7):1479-91.
52. Toquero C, Bolado S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource technology*. 2014;157:68-76.
53. Kumar R, Mago G, Balan V, Wyman CE. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource technology*. 2009;100(17):3948-62.
54. Koullas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, Koukios EG. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. *Biotechnology and bioengineering*. 1992;39(1):113-6.

55. Laureano-Perez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE, editors. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Twenty-sixth symposium on biotechnology for fuels and chemicals; 2005: Springer.
56. Puri VP. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnology and bioengineering*. 1984;26(10):1219-22.
57. Gamage J, Lam H, Zhang Z. Bioethanol production from lignocellulosic biomass, a review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2010;4(1):3-11.
58. Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(9):1621-51.
59. Fan L, Lee YH, Beardmore DH. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*. 1980;22(1):177-99.
60. Zeng M, Mosier NS, Huang CP, Sherman DM, Ladisch MR. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*. 2007;97(2):265-78.
61. Shafiei M, Zilouei H, Zamani A, Taherzadeh MJ, Karimi K. Enhancement of ethanol production from spruce wood chips by ionic liquid pretreatment. *Applied Energy*. 2013;102:163-9.
62. Zhu J, Pan X. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*. 2010;101(13):4992-5002.
63. Kumakura M, Kaetsu I. Effect of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. *Biomass*. 1983;3(3):199-208.
64. Bak JS, Ko JK, Han YH, Lee BC, Choi I-G, Kim KH. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresource technology*. 2009;100(3):1285-90.
65. Yang C, Shen Z, Yu G, Wang J. Effect and aftereffect of γ radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource technology*. 2008;99(14):6240-5.

66. Karunanithy C, Muthukumarappan K. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(1):264-79.
67. Mtui GY. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(8).
68. Prasad S, Singh A, Joshi H. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 2007;50(1):1-39.
69. Sánchez M, Menéndez J, Domínguez A, Pis J, Martínez O, Calvo L, et al. Effect of pyrolysis temperature on the composition of the oils obtained from sewage sludge. *biomass and bioenergy*. 2009;33(6):933-40.
70. Bonelli P, Della Rocca P, Cerrella E, Cukierman A. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil Nut shells. *Bioresource technology*. 2001;76(1):15-22.
71. Zheng Y, Zhao J, Xu F, Li Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2014;42:35-53.
72. Pan X, Xie D, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2005;124(1):1069-79.
73. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 2005;96(6):673-86.
74. Van Walsum GP, Allen SG, Spencer MJ, Laser MS, Antal Jr MJ, Lynd LR, editors. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Seventeenth symposium on biotechnology for fuels and chemicals*; 1996: Springer.
75. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*. 2002;83(1):1-11.
76. Yang B, Wyman CE. Dilute acid and autohydrolysis pretreatment. *Biofuels: Methods and protocols*. 2009:103-14.

77. Esteghlalian A, Hashimoto AG, Fenske JJ, Penner MH. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource technology*. 1997;59(2-3):129-36.
78. Shi J, Ebrik MA, Wyman CE. Sugar yields from dilute sulfuric acid and sulfur dioxide pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresource technology*. 2011;102(19):8930-8.
79. Xiang Q, Lee Y, Pettersson PO, Torget RW. Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of α -cellulose. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*: Springer; 2003. p. 505-14.
80. Digman MF, Shinnors KJ, Casler MD, Dien BS, Hatfield RD, Jung H-JG, et al. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource technology*. 2010;101(14):5305-14.
81. Li C, Knierim B, Manisseri C, Arora R, Scheller HV, Auer M, et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*. 2010;101(13):4900-6.
82. Du B, Sharma LN, Becker C, Chen SF, Mowery RA, van Walsum GP, et al. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. *Biotechnology and bioengineering*. 2010;107(3):430-40.
83. Xu J, Thomsen MH, Thomsen AB. Pretreatment on corn stover with low concentration of formic acid. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(8):845-50.
84. Shuai L, Yang Q, Zhu J, Lu F, Weimer P, Ralph J, et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. *Bioresource technology*. 2010;101(9):3106-14.
85. Kumar R, Wyman CE. Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biotechnology Progress*. 2009;25(3):807-19.
86. Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee Y, et al. Comparative sugar recovery and fermentation data following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress*. 2009;25(2):333-9.

87. Sun Y, Cheng JJ. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource technology*. 2005;96(14):1599-606.
88. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005;40(12):3693-700.
89. Cheng Y-S, Zheng Y, Yu CW, Dooley TM, Jenkins BM, VanderGheynst JS. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(6):1768-84.
90. Ibrahim MM, El-Zawawy WK, Abdel-Fattah YR, Soliman NA, Agblevor FA. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carbohydrate polymers*. 2011;83(2):720-6.
91. McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology*. 2010;101(17):6718-27.
92. Sills DL, Gossett JM. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. *Bioresource technology*. 2011;102(2):1389-98.
93. Kumar R, Wyman CE. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*. 2009;25(2):302-14.
94. Zhu J, Wan C, Li Y. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. *Bioresource technology*. 2010;101(19):7523-8.
95. Schmidt A, Mallon S, Thomsen AB, Hvilsted S, Lawther J. Comparison of the chemical properties of wheat straw and beech fibers following alkaline wet oxidation and laccase treatments. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2002;22(1):39-53.
96. Ping L, Brosse N, Sannigrahi P, Ragauskas A. Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products*. 2011;33(1):200-4.
97. Freemantle M. *An Introduction to Ionic Liquids*; RSC Pub. Cambridge, UK. 2010.

98. Cao Y, Li H, Zhang Y, Zhang J, He J. Structure and properties of novel regenerated cellulose films prepared from cornhusk cellulose in room temperature ionic liquids. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010;116(1):547-54.
99. Wang Z-M, Li L, Xiao K-J, Wu J-Y. Homogeneous sulfation of bagasse cellulose in an ionic liquid and anticoagulation activity. *Bioresource technology*. 2009;100(4):1687-90.
100. Li Q, He Y-C, Xian M, Jun G, Xu X, Yang J-M, et al. Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment. *Bioresource technology*. 2009;100(14):3570-5.
101. Kuo C-H, Lee C-K. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. *Bioresource technology*. 2009;100(2):866-71.
102. Shi J, Chinn MS, Sharma-Shivappa RR. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*. 2008;99(14):6556-64.
103. Meza JC, Sigoillot J-C, Lomascolo A, Navarro D, Auria R. New process for fungal delignification of sugar-cane bagasse and simultaneous production of laccase in a vapor phase bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(11):3852-8.
104. Arora D, Sharma R. Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2009;18(1):151-61.
105. Yu H, Guo G, Zhang X, Yan K, Xu C. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresource technology*. 2009;100(21):5170-5.
106. Hastrup ACS, Green F, Lebow PK, Jensen B. Enzymatic oxalic acid regulation correlated with wood degradation in four brown-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012;75:109-14.
107. Schilling JS, Ai J, Blanchette RA, Duncan SM, Filley TR, Tschirner UW. Lignocellulose modifications by brown rot fungi and their effects, as pretreatments, on cellulolysis. *Bioresource technology*. 2012;116:147-54.

108. Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*. 2009;5(6):578.
109. Akhtar N, Sharma A, Deka D, Jawed M, Goyal D, Goyal A. Characterization of cellulase producing *Bacillus* sp. for effective degradation of leaf litter biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2013;32(4):1195-201.
110. Kurakake M, Ide N, Komaki T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Current microbiology*. 2007;54(6):424-8.
111. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable energy*. 2012;37(1):19-27.
112. Banerjee S, Sen R, Pandey R, Chakrabarti T, Satpute D, Giri BS, et al. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. *biomass and bioenergy*. 2009;33(12):1680-6.
113. Bunnell K, Martin E, Lau C, Pelkki M, Patterson D, Clausen E, et al., editors. Hot water and dilute acid pretreatment from high and low specific gravity *Populus* sp. Bioengineering Research Lab University of Arkansas Poster Biofuels conference, Tampa, FL; 2010.
114. Dien B, Li X-L, Iten L, Jordan D, Nichols N, O'Bryan P, et al. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(5):1137-44.
115. Taherzadeh MJ, Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*. 2007;2(3):472-99.
116. Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran K, Ramakrishnan S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*. 2011;2011.
117. Samayam IP, Schall CA. Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. *Bioresource technology*. 2010;101(10):3561-6.
118. Pooornejad N, Karimi K, Behzad T. Improvement of saccharification and ethanol production from rice straw by NMMO and [BMIM][OAc] pretreatments. *Industrial Crops and Products*. 2013;41:408-13.

119. Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*. 2015;5(5):597-609.
120. Sindhu R, Binod P, Pandey A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource technology*. 2016;199:76-82.
121. Abraham M, Kurup GM. Bioconversion of tapioca (*Manihot esculenta*) waste and water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)—influence of various physico-chemical factors. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1996;82(3):259-63.
122. Sornvoraweat B, Kongkiattikajorn J. Separated Hydrolysis and Fermentation of Water Hyacinth Leaves for Ethanol Production. *KKU Res J*. 2010;15(9):794-802.
123. Reales-Alfaro J-G, Trujillo-Daza L-T, Arzuaga-Lindado G, Castaño-Peláez H-I, Polo-Córdoba Á-D. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. *CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro*. 2013;5(2):101-11.
124. Patra S, Sittijunda S. Optimization of factors affecting acid hydrolysis of water hyacinth stem (*Eichhornia Crassipes*) for bio-hydrogen production. *Energy Procedia*. 2015;79:833-7.
125. Idrees M, Adnan A, Qureshi FA. Optimization of sulfide/sulfite pretreatment of lignocellulosic biomass for lactic acid production. *BioMed research international*. 2013;2013.
126. Bhattacharya A, Sadhukhan A, Ganguly A, Chatterjee P. Dilute Acid Induced Changes on Microscopic and Tomographic Structure of Water Hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] Biomass during Bioconversion Process to Xylitol. *Indian Journal of Science and Technology*. 2016;9(6).
127. Ahn DJ, Kim SK, Yun HS. Optimization of pretreatment and saccharification for the production of bioethanol from water hyacinth by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2012;35(1-2):35-41.
128. Kalhorinia S, Naseeruddin S, Yadav K, Goli J, Rao L. Optimization of acid and enzymatic saccharification of lignocellulosic substrate Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *ISRJ*. 2013;3(9):1-10.

129. Xia A, Cheng J, Song W, Yu C, Zhou J, Cen K. Enhancing enzymatic saccharification of water hyacinth through microwave heating with dilute acid pretreatment for biomass energy utilization. *Energy*. 2013;61:158-66.
130. Ganguly A, Das S, Bhattacharya A, Dey A, Chatterjee PK. Enzymatic hydrolysis of water hyacinth biomass for the production of ethanol: Optimization of driving parameters. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2013;51:556-66.
131. Singh A, Bishnoi NR. Comparative study of various pretreatment techniques for ethanol production from water hyacinth. *Industrial Crops and Products*. 2013;44:283-9.
132. Cheng J, Wang X, Huang R, Liu M, Yu C, Cen K. Producing ethanol from water hyacinth through simultaneous saccharification and fermentation with acclimatized yeasts. *BioResources*. 2014;9(4):7666-80.
133. Yan J, Wei Z, Wang Q, He M, Li S, Irbis C. Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioresource technology*. 2015;193:103-9.
134. Lin R, Cheng J, Song W, Ding L, Xie B, Zhou J, et al. Characterisation of water hyacinth with microwave-heated alkali pretreatment for enhanced enzymatic digestibility and hydrogen/methane fermentation. *Bioresource technology*. 2015;182:1-7.
135. Zhang Q, Weng C, Huang H, Achal V, Wang D. Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process. *Frontiers in microbiology*. 2016;6:1411.
136. Das A, Ghosh P, Paul T, Ghosh U, Pati BR, Mondal KC. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech*. 2016;6(1):70.
137. Das SP, Gupta A, Das D, Goyal A. Enhanced bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by statistical optimization of fermentation process parameters using Taguchi orthogonal array design. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2016;109:174-84.

138. Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009;48(8):3713-29.
139. Fileto-Pérez HA, Rutiaga-Quiñones JG, Aguilar-González CN, Paéz JB, López J, Rutiaga-Quiñones OM. Evaluation of *Eichhornia crassipes* as an alternative raw material for reducing sugars production. *BioResources*. 2013;8(4):5340-8.
140. Idrees M, Adnan A, Bokhari S, Qureshi F. Production of fermentable sugars by combined chemo-enzymatic hydrolysis of cellulosic material for bioethanol production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2014;31(2):355-63.
141. Satyanagalakshmi K, Sindhu R, Binod P, Janu KU, Sukumaran RK, Pandey A. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2011;70:156-61.
142. Aswathy U, Sukumaran RK, Devi GL, Rajasree K, Singhanian RR, Pandey A. Bioethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource technology*. 2010;101(3):925-30.
143. Guragain YN, De Coninck J, Husson F, Durand A, Rakshit SK. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresource technology*. 2011;102(6):4416-24.
144. Hall M, Bansal P, Lee JH, Realff MJ, Bommarius AS. Cellulose crystallinity—a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *The FEBS journal*. 2010;277(6):1571-82.
145. Jeihanipour A. Waste textiles bioprocessing to ethanol and biogas: Chalmers University of Technology; 2011.
146. Yoshida M, Liu Y, Uchida S, Kawarada K, Ukagami Y, Ichinose H, et al. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2008;72(3):805-10.
147. Martínez JM, Reguant J, Montero MÁ, Montané D, Salvadó J, Farriol X. Hydrolytic pretreatment of softwood and almond shells. Degree of polymerization and enzymatic digestibility of the cellulose fraction. *Industrial & engineering chemistry research*. 1997;36(3):688-96.

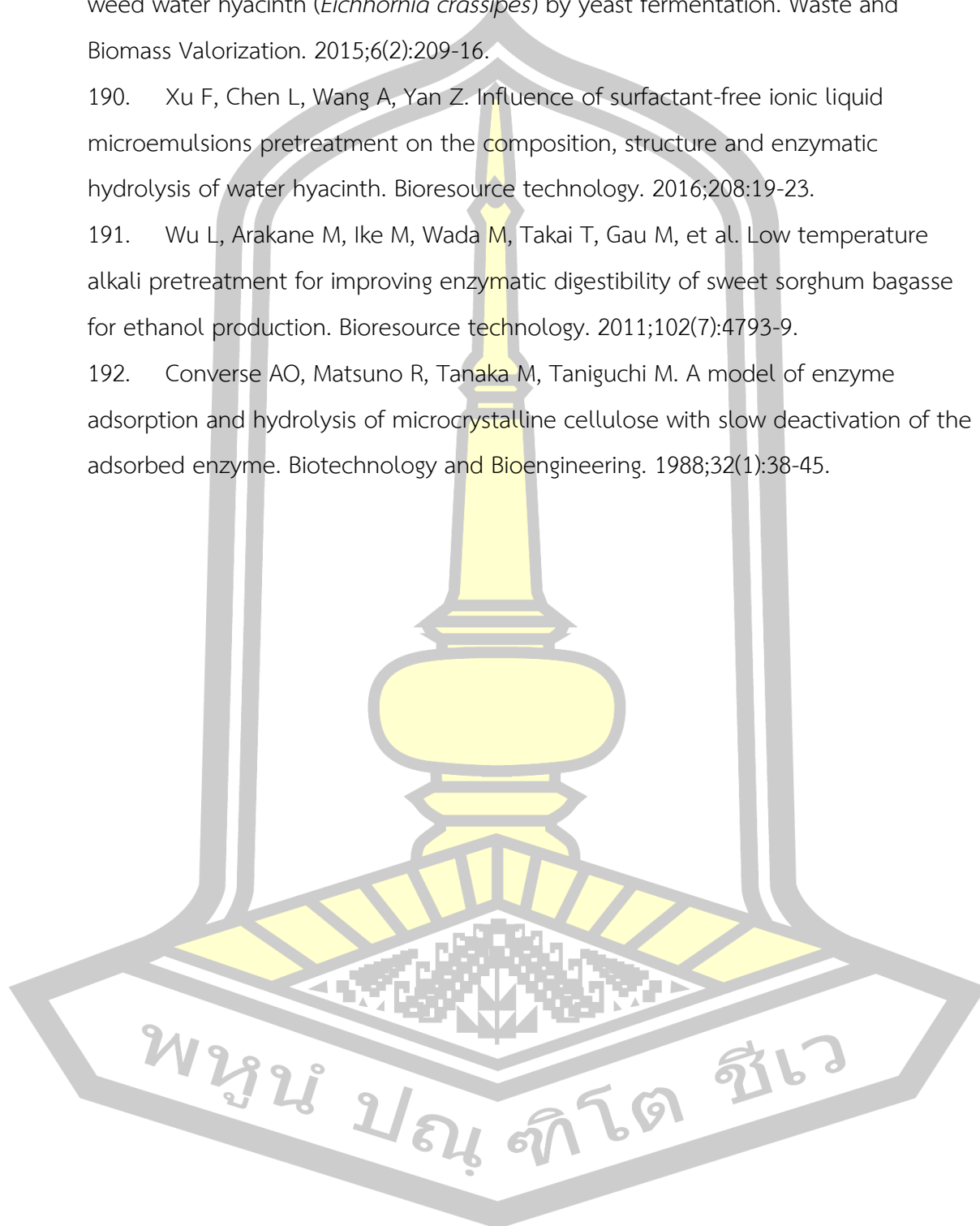
148. Pan X, Xie D, Yu RW, Saddler JN. The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. *Biotechnology and bioengineering*. 2008;101(1):39-48.
149. Sinitsyn A, Mitkevich O, Gusakov A, Klyosov A. Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate polymers*. 1989;10(1):1-14.
150. Zhang Y-HP, Lynd LR. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*. 2005;6(3):1510-5.
151. Kumar R, Wyman CE. Cellulose adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnology and bioengineering*. 2009;103(2):252-67.
152. Ramos L, Breuil C, Saddler J. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*. 1992;34(1):37-48.
153. Pan X, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Gregg D, et al. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnology and bioengineering*. 2006;94(5):851-61.
154. Teixeira LC, Linden JC, Schroeder HA. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2000;84(1-9):111-27.
155. Yang B, Dai Z, Ding S-Y, Wyman CE. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*. 2011;2(4):421-49.
156. Yan Z, Li J, Li S, Chang S, Cui T, Jiang Y, et al. Impact of lignin removal on the enzymatic hydrolysis of fermented sweet sorghum bagasse. *Applied Energy*. 2015;160:641-7.
157. Martínez PM, Bakker R, Harmsen P, Gruppen H, Kabel M. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2015;64:88-96.

158. Yang B, Wyman CE. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and bioengineering*. 2004;86(1):88-98.
159. Ding S-Y, Liu Y-S, Zeng Y, Himmel ME, Baker JO, Bayer EA. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? *Science*. 2012;338(6110):1055-60.
160. Chandra RP, Bura R, Mabee W, Berlin dA, Pan X, Saddler J. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels*: Springer; 2007. p. 67-93.
161. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure. 2008;1617:1-16.
162. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 1959;31(3):426-8.
163. Robertson J, Van Soest P. *The Analysis of Dietary Fiber in Foods*. WPT James and O. Theander, ed. Marcel Dekker Inc., New York, NY; 1981.
164. Sindhu R, Kuttiraja M, Binod P, Janu KU, Sukumaran RK, Pandey A. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource technology*. 2011;102(23):10915-21.
165. Umagiliyage AL, Choudhary R, Liang Y, Haddock J, Watson DG. Laboratory scale optimization of alkali pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Industrial Crops and Products*. 2015;74:977-86.
166. Pei Y, Li Y, Zhang Y, Yu C, Fu T, Zou J, et al. G-lignin and hemicellulosic monosaccharides distinctively affect biomass digestibility in rapeseed. *Bioresource technology*. 2016;203:325-33.
167. Thi BTN, Ong LK, Thi DTN, Ju Y-H. Effect of subcritical water pretreatment on cellulose recovery of water hyacinth (*Eichhornia crassipe*). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017;71:55-61.
168. Rabemanolontsoa H, Saka S. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*. 2016;199:83-91.

169. Chen W-H, Ye S-C, Sheen H-K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Applied Energy*. 2012;93:237-44.
170. Vásquez MP, da Silva JNC, de Souza MB, Pereira N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: Springer; 2007. p. 141-53.
171. Taherzadeh MJ, Eklund R, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 1997;36(11):4659-65.
172. Satyanagalakshmi K, Sindhu R, Binod P, Janu KU, Sukumaran RK, Pandey A. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. 2011.
173. Zhu L, O'Dwyer JP, Chang VS, Granda CB, Holtzaple MT. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource technology*. 2008;99(9):3817-28.
174. Krishna SH, Prasanthi K, Chowdary G, Ayyanna C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry*. 1998;33(8):825-30.
175. Rahikainen JL, Evans JD, Mikander S, Kalliola A, Puranen T, Tamminen T, et al. Cellulase–lignin interactions—The role of carbohydrate-binding module and pH in non-productive binding. *Enzyme and Microbial Technology*. 2013;53(5):315-21.
176. Qi B, Chen X, Shen F, Su Y, Wan Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. *Industrial & engineering chemistry research*. 2009;48(15):7346-53.
177. Zheng Y, Pan Z, Zhang R, Wang D, Jenkins B. Non-ionic surfactants and non-catalytic protein treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2008;146(1-3):231-48.
178. Jongmeesuk A, Sanguanchaipaiwong V. Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *KMITL SCIENCE AND TECHNOLOGY JOURNAL*. 2015;14(2).
179. Sornvoraweat B, Kongkiattikajorn J. Separated hydrolysis and fermentation of water hyacinth leaves for ethanol production. *J Life Sci*. 2011;5:212-9.

180. Cheng N, Koda K, Tamai Y, Yamamoto Y, Takasuka TE, Uraki Y. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipathic lignin derivatives for concentrated bioethanol production. *Bioresource technology*. 2017;232:126-32.
181. Rezende CA, de Lima MA, Maziero P, Ribeiro deAzevedo E, Garcia W, Polikarpov I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*. 2011;4(1):54.
182. Lin Y-C, Shangdiar S, Chen S-C, Chou F-C, Lin Y-C, Cho C-A. Microwave irradiation with dilute acid hydrolysis applied to enhance the saccharification rate of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Renewable Energy*. 2018;125:511-7.
183. Liu X, Zu X, Liu Y, Sun L, Yi G, Lin W, et al. Conversion of Waste Water Hyacinth into High-Value Chemicals by Iron (III) Chloride under Mild Conditions. *BioResources*. 2018;13(2):2293-303.
184. da Costa Correia JA, Júnior JEM, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. *Bioresource technology*. 2013;139:249-56.
185. de Souza Moretti MM, Bocchini-Martins DA, Nunes CdCC, Villena MA, Perrone OM, da Silva R, et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*. 2014;122:189-95.
186. He Z, Wang Z, Zhao Z, Yi S, Mu J, Wang X. Influence of ultrasound pretreatment on wood physiochemical structure. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;34:136-41.
187. Poletto M, Pistor V, Zattera AJ. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. *Cellulose-fundamental aspects: InTech*; 2013.
188. Rezania S, Din MFM, Taib SM, Mohamad SE, Dahalan FA, Kamyab H, et al. Ethanol Production from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Using Various Types of Enhancers Based on the Consumable Sugars. *Waste and Biomass Valorization*. 2017:1-8.

189. Manivannan A, Narendhirakannan R. Bioethanol production from aquatic weed water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by yeast fermentation. *Waste and Biomass Valorization*. 2015;6(2):209-16.
190. Xu F, Chen L, Wang A, Yan Z. Influence of surfactant-free ionic liquid microemulsions pretreatment on the composition, structure and enzymatic hydrolysis of water hyacinth. *Bioresource technology*. 2016;208:19-23.
191. Wu L, Arakane M, Ike M, Wada M, Takai T, Gau M, et al. Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresource technology*. 2011;102(7):4793-9.
192. Converse AO, Matsuno R, Tanaka M, Taniguchi M. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*. 1988;32(1):38-45.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวเอื้องฟ้า บุญธรรม
วันเกิด วันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2533
สถานที่เกิด อำเภอหนองบัวระเหว จังหวัดชัยภูมิ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 129 หมู่ 3 ตำบล โคกสะอาด อำเภอหนองบัวระเหว จังหวัดชัยภูมิ 36250
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2549 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบ้านโคกสะอาด อำเภอหนองบัวระเหว จังหวัดชัยภูมิ
พ.ศ. 2552 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนหนองบัวระเหววิทยาคาร อำเภอหนองบัวระเหว จังหวัดชัยภูมิ
พ.ศ. 2556 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
พ.ศ. 2561 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูนุ่ ปณุ่ ทีโตะ ชีเว