ผลของอุณหภูมิต่อการปรับสภาพเบื้องต้นของฟางข้าวและกากมันสำปะหลังโดยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต

Effect of Temperature on Pretreatment of Rice Straw and Cassava Waste by Subcritical Water

ปุณณวิทย์ หาญไพบูลย์ [1] สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ [2]
และเรืองวิทย์ สว่างแก้ว [3]

บทคัดย่อ

การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (subcritical water pretreatment) เป็นกระบวนการหนึ่งที่ช่วยให้เซลลูโลสในชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้มากขึ้นเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ข้อดีของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้คือความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้สารเคมี และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในของเหลวหลังการปรับสภาพมีปริมาณต่ำ อุณหภูมิของการปรับสภาพเบื้องต้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการปรับสภาพชีวมวลผสมระหว่างฟางข้าวและกากมันสำปะหลังที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักแห้ง กระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นจะดำเนินการในเครื่องปฏิกรณ์ความดันสูงที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 120 ถึง 200 องศาเซลเซียส ความดัน 20 บาร์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากชีวมวลผ่านการปรับสภาพแล้วจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการปรับสภาพชีวมวลผสมคือ 160 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาจากร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้น ที่อุณหภูมินี้ปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้นน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกระบวนการแสดงค่าร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดเท่ากับ 39.64

คำสำคัญ : เอนไซม์เซลลูเลส เซลลูโลส ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต

[1] ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีปิโตรเคมีและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[3] สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABSTRACT

Subcritical water pretreatment is one of the methods, improving the enzymatic saccharification of cellulose in lignocellulosic biomass. The main advantages of this process are environmentally friendly because of its chemical free process and low inhibitor production. The pretreatment temperature is the most important influence on pretreatment efficiency so the aim of this research is to investigate the effects of temperature on subcritical water pretreatment of rice straw mixed with cassava waste in the ratio of 1:1 on a dry basis. Pretreatment was carried out in the high pressure reactor with temperature varied from 120 to 200 °C, at 20 bar pressure for 30 minutes. After pretreatment process, the pretreated solid was subjected to enzymatic saccharification using cellulose. It was found that the optimum pretreatment temperature of rice straw mixed with cassava waste was 160 °C when considering both overall glucose yield and inhibitor formation. At this temperature, the inhibitor concentration produced less than 1 mg/ml and the process provided the overall glucose yield of 39.64%

Keywords : cellulase, cellulose, lignocellulosic biomass, subcritical water pretreatment

บทนำ

ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulosic biomass) เป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงและเคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากและราคาถูกโดยเฉพาะในประเทศเกษตรกรรมอย่างเช่นประเทศไทย ชีวมวลประเภทนี้ส่วนมากเป็นชีวมวลเหลือทิ้งทางการเกษตรภายหลังจากการเก็บเกี่ยวหรือการแปรรูป เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น (Chum et al., 2001) การใช้ชีวมวลเป็นแหล่งผลิตพลังงานทางเลือกมีข้อดีคือ ชีวมวลถือเป็นพลังงานที่ไม่มีวันหมดเนื่องจากวงจรการผลิตชีวมวลมีระยะเวลาสั้นเมื่อเทียบกับแหล่งพลังงานจากฟอสซิล เช่น ถ่านหินและน้ำมัน นอกจากนี้ยังส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากปริมาณกำมะถันในชีวมวลมีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงฟอสซิลและการใช้พลังงานจากชีวมวลไม่เป็นการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์สุทธิในชั้นบรรยากาศ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2554) ชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นแหล่งเซลลูโลสที่สำคัญ มีศักยภาพเพียงพอต่อการผลิตกลูโคส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าได้หลายชนิดซึ่งหนึ่งในนั้นคือเอทานอล (Ethanol) ที่สามารถนำไปใช้ทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิลได้โดยตรง สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้น (Pretreatment) ขั้นตอนการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส (Saccharification) และขั้นตอนการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (Fermentation) เมื่อพิจารณาถึงกระบวนการผลิตเอทานอลทั้งระบบ ขั้นตอนการปรับสภาพเบื้องต้นถือเป็นขั้นตอนที่มีค่าใช้จ่ายสูงสุดและถือเป็นขั้นตอนที่กำหนดประสิทธิภาพโดยรวมของกระบวนการ (Hendriks et al., 2009) จุดประสงค์หลักของการปรับสภาพเบื้องต้นคือการเตรียมวัตถุดิบให้เหมาะสมก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ เนื่องจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมีความซับซ้อนมาก ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นจึงไม่ใช่กระบวนการที่ทำได้โดยง่ายเช่นกัน การปรับสภาพเบื้องต้นช่วยเปลี่ยนสมบัติทั้งทางกายภาพและเคมีของชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นตัวขัดขวางการย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์ เช่น การเพิ่มพื้นที่ผิวที่เอนไซม์เข้าถึงได้ การกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส และการลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส เป็นต้น ทำให้ปริมาณกลูโคสที่ผลิตได้เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Walker, 2010)

การปรับสภาพเบื้องต้นที่มีประสิทธิภาพในปัจจุบันมีหลากหลายกระบวนการ เช่น การปรับสภาพ

เบื้องต้นด้วยกระบวนการทางกายภาพ การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกระบวนการทางความร้อน การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกระบวนการทางเคมี และการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกระบวนการทางชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งแต่ละกระบวนการมีขั้นตอน ภาวะและปัจจัยที่ต้องควบคุมและมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน (Viikari et al., 2012) การปรับสภาพเบื้องต้นด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต (น้ำร้อนอัดความดันหรือออโตไฮโดรไลซิส) เป็นหนึ่งในกระบวนการที่มีประสิทธิภาพ โดยการให้ความร้อนแก่ชีวมวลด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและความดันสูงกว่าความดันอิ่มตัวเพื่อให้น้ำคงสภาพเป็นของเหลว น้ำภาวะกึ่งวิกฤตสามารถผ่านเข้าไปภายในโครงสร้างของชีวมวล เฮมิเซลลูโลสในชีวมวลเกือบทั้งหมดและลิกนินบางส่วนจะถูกกำจัดออกมาอยู่ในน้ำที่ใช้ในกระบวนการปรับสภาพ ทำให้ชีวมวลภายหลังการปรับสภาพเป็นชีวมวลที่มีปริมาณของเซลลูโลสสูงขึ้น (Cellulose-enriched material) นอกจากนี้ความร้อนยังทำให้โครงสร้างชีวมวลเกิดการบวมตัวและพื้นที่ผิวที่เข้าถึงได้ของเอนไซม์มีมากขึ้น (Taherzadeh et al., 2008 และ Mosier et al., 2005) ปัจจัยสำคัญที่สุดต่อประสิทธิภาพของการปรับสภาพด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตคืออุณหภูมิ เนื่องจากถ้าใช้อุณหภูมิการปรับสภาพต่ำเฮมิเซลลูโลสจะสลายตัวไม่สมบูรณ์ แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะเกิดสารยับยั้งขึ้นในปริมาณสูง โดยสารยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นสารประกอบกลุ่มฟูแรน (Furanic compounds) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล เช่น เฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม และ 6 อะตอม ตามลำดับ สารยับยั้งที่เกิดขึ้นจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และยีสต์ในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและขั้นตอนการหมัก (Sanchez et al., 2004)

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพเบื้องต้นของฟางข้าวและกากมันสำปะหลังด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤต ตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิการปรับสภาพเบื้องต้น ประสิทธิภาพของกระบวนการปรับสภาพเบื้องต้นประเมินจากร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดจากการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลของชีวมวลที่อุณหภูมิการปรับสภาพต่าง ๆ และปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในของเหลวภายหลังการปรับสภาพเป็นสำคัญ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมชีวมวลตั้งต้น

ฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัยได้มาจากจังหวัดปทุมธานี นำมาบดโดยเครื่องบดอย่างหยาบเพื่อให้ได้ฟางข้าวที่มีขนาดประมาณ 1 - 3 เซนติเมตร ส่วนกากมันสำปะหลังได้มาจากบริษัท เอี่ยม บูรพา จำกัด ซึ่งเป็นโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในจังหวัดสระแก้ว นำชีวมวลทั้งสองมาวิเคราะห์หาความชื้น และปริมาณเถ้า จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และองค์ประกอบอื่น ๆ ในฟางข้าวใช้วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน TAPPI ขณะที่กากมันสำปะหลังวิเคราะห์ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Van Soest และคณะ (1983) เนื่องจากในกากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักทำให้ผลจากการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน TAPPI มีความคลาดเคลื่อน การวิเคราะห์ชีวมวลแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 5 ครั้ง ผลที่ได้จะแสดงไว้ในรูปค่าเฉลี่ย ที่ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 5

การปรับสภาพเบื้องต้น

การปรับสภาพเบื้องต้นของฟางข้าวดำเนินการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ความดันสูง (High pressure reactor) ขนาด 1.2 ลิตร จากบริษัท Parr Instrument Company รุ่น 4571 ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยชั่งน้ำหนักชีวมวลผสมระหว่างฟางข้าวและกากมันสำปะหลังในสัดส่วน 1:1 โดยน้ำหนักแห้ง และน้ำหนักน้ำที่สัดส่วนของของแข็งต่อของเหลวในสารป้อนมีค่าเท่ากับร้อยละ 7 ของผสมจากฟางข้าวและกากมันสำปะหลังที่สัดส่วนดังกล่าวเป็นของผสมซึ่งสามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่จะทำการศึกษาในงานวิจัยลำดับถัดไป น้ำหนักที่แน่นอนของฟางข้าวและกากมันสำปะหลังได้จากร้อยละของความชื้นในชีวมวลซึ่งมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละวันที่ทำการทดลองใส่ชีวมวลและน้ำที่เตรียมไว้ลงไปในเครื่องปฏิกรณ์ ตั้งโปรแกรมการให้ความร้อน กำหนดอุณหภูมิและระยะเวลาทำปฏิกิริยา เมื่อการทำปฏิกิริยาครบตามเวลาที่กำหนด เครื่องปฏิกรณ์จะถูกหล่อเย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างและนำมากรองแยกด้วยระบบสุญญากาศ

การเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส

นำของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้น จำนวน 1.2 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง (dry basis) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิตริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร จำนวน 50 มิลลิลิตร และเอนไซม์เซลลูเลส 1 มิลลิลิตรลงในขวด ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยแผ่นอะลูมิเนียม จากนั้นนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ตั้งอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ

การวิเคราะห์

นำของเหลวที่กรองแยกภายหลังการปรับสภาพเบื้องต้นและการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล มากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.4 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลและสารยับยั้งด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph: HPLC) ใช้คอลัมน์รุ่น Aminex HPX-87H จากบริษัท Bio–Rad ขนาด 7.8 มิลลิเมตร ยาว 300 มิลลิเมตร วิธีการวิเคราะห์ดำเนินการตามมาตรฐาน NREL (Sluiter et al., 2008) โดยใช้ตัวพาเป็นกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลและสารยับยั้งจะใช้เครื่องรับสัญญาณของการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีหักเหของแสง (Refractive index detector) และค่าความเข้มแสงอัลตราไวโอเลต (UV detector) ตามลำดับ

ของแข็งที่ได้ภายหลังการปรับสภาพนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยใช้วิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Van Soest (Van Soest, 1983) และนำไปวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างพื้นผิวที่เปลี่ยนแปลงไปของชีวมวลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละน้ำหนักที่สูญเสียของชีวมวล} = \frac{\text{น้ำหนักของชีวมวลที่หายไปในระหว่างการปรับสภาพ} \times 100}{\text{น้ำหนักของชีวมวลเริ่มต้น}}$$

$$\text{ร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมด} = \frac{\text{น้ำหนักของกลูโคสทั้งหมดในของเหลวภายหลังการย่อย} \times 100}{\text{น้ำหนักของชีวมวลแห้งที่ใช้ในการปรับสภาพเบื้องต้น}}$$

ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลตั้งต้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ร้อยละเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและเถ้าในชีวมวลตั้งต้น พบว่าองค์ประกอบหลักในฟางข้าวมีเซลลูโลสร้อยละ 38.19 โดยน้ำหนักแห้ง เซลลูโลสในชีวมวลสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ เนื่องจากในฟางข้าวจะมีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินซึ่งขัดขวางการย่อยเซลลูโลสของเอนไซม์ ดังนั้นการปรับสภาพด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากการปรับสภาพด้วยเทคนิคนี้ ณ ภาวะที่เหมาะสมจะสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสออกมาจากชีวมวลได้อย่างสมบูรณ์ (Mosier et al., 2005) สำหรับองค์ประกอบหลักในกากมันสำปะหลังประกอบด้วย องค์ประกอบอื่น ๆ ร้อยละ 55.32 โดยน้ำหนักแห้ง องค์ประกอบดังกล่าวเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่เส้นใย (Non – structural carbohydrate) ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกแป้ง และมีสารแทรก (Extractive) เล็กน้อย คิดเป็นร้อยละ 53.09 และ 2.23 ตามลำดับ ในกากมันสำปะหลังจะมีเซลลูโลสอยู่ร้อยละ 25.51 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลของ Pitcha และคณะ (2012) สำหรับการวิเคราะห์ร้อยละองค์ประกอบของชีวมวลผสมระหว่างฟางข้าวและกากมันสำปะหลังในสัดส่วน 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนักแห้ง) แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยแสดงตารางเปรียบเทียบระหว่างค่าที่ได้จากการวิเคราะห์และค่าที่ได้จากการคำนวณ ซึ่งพบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 1 ร้อยละองค์ประกอบของฟางข้าวและกากมันสำปะหลัง (โดยน้ำหนักแห้ง)

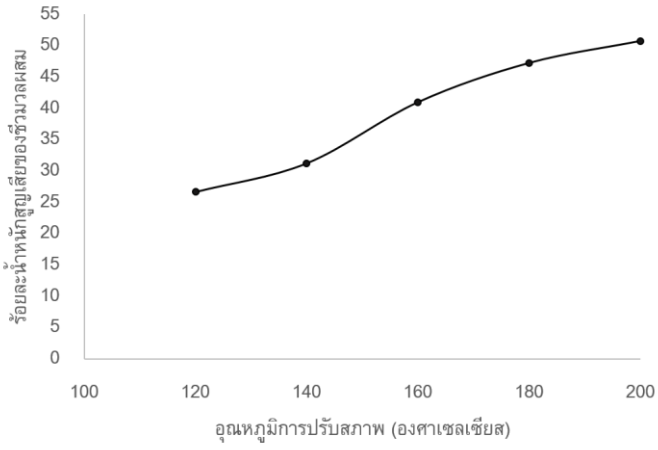
องค์ประกอบ	ตัวอย่าง (ร้อยละ)			
	ฟางข้าว	กากมันสำปะหลัง	ชีวมวลผสม*	ชีวมวลผสม**
เซลลูโลส	38.19	25.51	30.85	31.85
เฮมิเซลลูโลส	32.15	12.45	22.96	22.30
ลิกนิน	12.68	4.29	7.93	8.48
เถ้า	12.02	2.43	4.24	7.23
อื่น ๆ	4.96	55.32	34.02	30.14

* ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ ณ สัดส่วนของฟางข้าวต่อกากมันสำปะหลังเท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนักแห้ง)

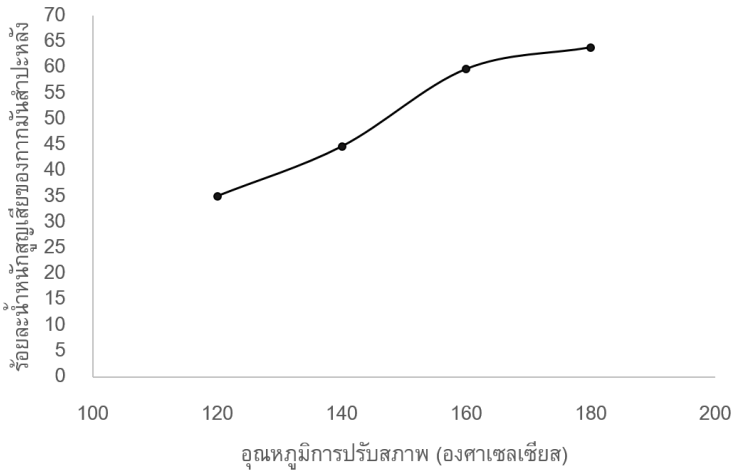
** ค่าที่ได้จากการคำนวณ ณ สัดส่วนของฟางข้าวต่อกากมันสำปะหลังเท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนักแห้ง)

ผลของอุณหภูมิการปรับสภาพเบื้องต้นต่อร้อยละน้ำหนักสูญเสียของชีวมวล

ภาพที่ 1 แสดงร้อยละน้ำหนักสูญเสียของชีวมวลหลังผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิตั้งแต่ 120 ถึง 200 องศาเซลเซียส โดยค่าร้อยละน้ำหนักสูญเสียมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพ และมีค่ามากกว่าร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิการปรับสภาพ 200 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละน้ำหนักสูญเสียของชีวมวลที่สูงขึ้นนี้ อาจเกิดจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสที่ต้องการกำจัดออกจากชีวมวลและการสลายตัวขององค์ประกอบจำพวกแป้ง เพื่อยืนยันสมมติฐานดังกล่าวจึงทำการทดลองการปรับสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิ 120 ถึง 180 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนจากชีวมวลผสมเป็นกากมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวซึ่งในกากมันสำปะหลังจะประกอบด้วยแป้งมากกว่าร้อยละ 50 ผลการทดลองแสดงตามภาพที่ 2 ซึ่งพบว่าในช่วงอุณหภูมิการปรับสภาพ 120 ถึง 160 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละน้ำหนักสูญเสียของกากมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่ออุณหภูมิการปรับสภาพเพิ่มเป็น 180 องศาเซลเซียส ร้อยละน้ำหนักสูญเสียของกากมันสำปะหลัง จะมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ร้อยละ 3-5) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในกากมันสำปะหลังจะสลายตัวอย่างสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิการปรับสภาพเท่ากับ 160 องศาเซลเซียส (Wajira et al., 2008) การเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพสูงกว่า 160 องศาเซลเซียส จึงส่งผลให้ร้อยละการสูญเสียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ค่าร้อยละน้ำหนักสูญเสียที่เพิ่มขึ้นของชีวมวลผสมเป็นผลมาจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (Ando et al., 2000 และ Yu et al., 2010) ขณะที่การเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพมากกว่า 180 องศาเซลเซียส ร้อยละน้ำหนักสูญเสียของชีวมวลจะยังคงเพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการสลายตัวของเซลลูโลสซึ่งเกิดขึ้นดีที่อุณหภูมิสูง (Weil et al., 1998)



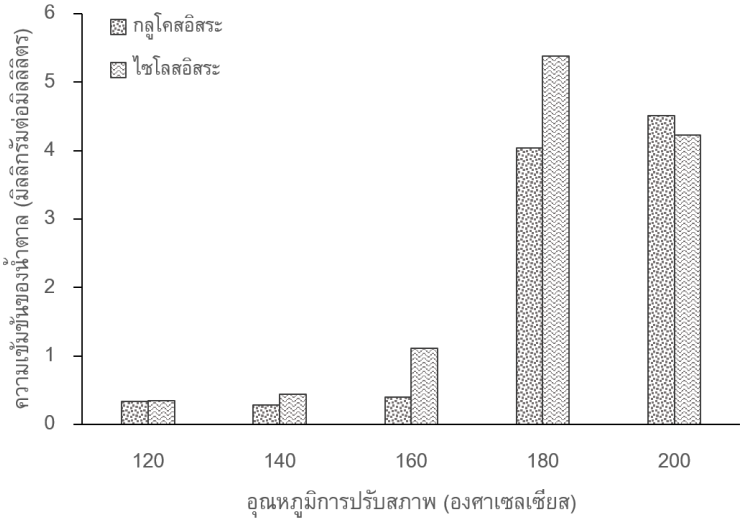
ภาพที่ 1 ร้อยละน้ำหนักสูญเสียของชีวมวลผสมภายหลังที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 2 ร้อยละน้ำหนักสูญเสียของกากมันสำปะหลังภายหลังที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลของอุณหภูมิการปรับสภาพต่อองค์ประกอบในของเหลวหลังปรับสภาพ

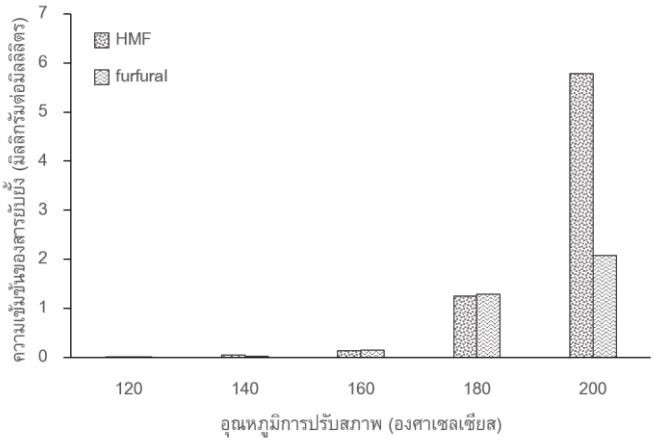
ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสอิสระในของเหลวหลังการปรับสภาพชีวมวลผสมในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์ เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกลูโคสอิสระพบว่า ที่ช่วงอุณหภูมิ 120 ถึง 160 องศาเซลเซียส ปริมาณกลูโคสอิสระค่อนข้างคงที่และมีค่าน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพชีวมวลในช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่ยาวไม่ถูกย่อยเป็นกลูโคส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพเป็น 180 องศาเซลเซียส ปริมาณของกลูโคสอิสระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากเกิดไฮโดรไลซ์สายโซ่โมเลกุลแป้งและเซลลูโลสให้สั้นลงจนกระทั่งกลายเป็นกลูโคสอิสระ (Öhgren et al., 2007 และ Carvalheiro et al., 2009) อย่างไรก็ตามกลูโคสอิสระที่เกิดขึ้นในของเหลวอาจเกิดการไฮโดรไลซ์ต่อเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์



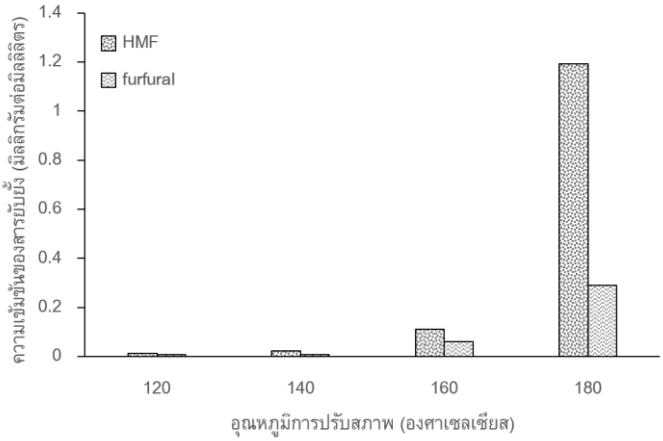
ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของกลูโคสอิสระและไซโลสอิสระในของเหลวภายหลังการปรับสภาพชีวมวลผสมในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อพิจารณาปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ในของเหลวที่อุณหภูมิการปรับสภาพเท่ากับ 180 องศาเซลเซียสในภาพที่ 4 พบว่าความเข้มข้นของ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์มีค่าที่สูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่งบอกถึงความไม่เหมาะสมของการปรับสภาพชีวมวลที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส Sanchez และคณะ (2004) ยังพบว่าความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอลและอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอลมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และยีสต์ในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและขั้นตอนการหมักตามลำดับ ภาพที่ 5 แสดงปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในของเหลวภายหลังการปรับสภาพกากมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการปรับสภาพกากมันสำปะหลัง คือ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ และเมื่อเทียบปริมาณที่เกิดขึ้น ณ อุณหภูมิเดียวกันกับการปรับสภาพเบื้องต้นของชีวมวลผสม (รูปที่ 4) จะพบว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ ที่เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิการปรับสภาพระหว่าง 120 ถึง 180 องศาเซลเซียส เกิดจากแป้งที่อยู่ในกากมันสำปะหลังเป็นหลัก ขณะที่การสลายตัวของเซลลูโลสในชีวมวลเกิดน้อยมาก เนื่องจากเซลลูโลสซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่มีเสถียรภาพต่อความร้อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Garrote และคณะ (2002) โดยกล่าวว่ากลูโคสที่พบในของเหลวภายหลังจากการปรับสภาพที่อุณหภูมิไม่สูงนั้นเกิดจากแป้งในชีวมวล ซึ่งถูกย่อยเป็นกลูโคสได้ง่าย นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพเบื้องต้นของชีวมวลผสมจาก 180 องศาเซลเซียส เป็น 200 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของกลูโคสอิสระในของเหลวจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมินี้เซลลูโลสในชีวมวลถูกย่อยเป็นกลูโคสในปริมาณสูงขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกลูโคสในของเหลวเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อยอาจเนื่องจากกลูโคสอิสระเกิดการสลายตัวต่ออย่างรวดเร็วไปเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ ซึ่งสังเกตจากค่าความเข้มข้นของ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ ที่เพิ่มขึ้นอีกประมาณห้าเท่าเมื่อเทียบกับ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ ที่ตรวจพบในของเหลวภายหลังการปรับสภาพที่อุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของไซโลสอิสระในของเหลวหลังปรับสภาพแสดงไว้ในภาพที่ 3 ไซโลสที่เกิดขึ้นในของเหลวนี้เกิดมาจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส โดยความเข้มข้นไซโลสอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามอุณหภูมิการปรับสภาพที่เพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิการปรับสภาพเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส การที่ของเหลวมีไซโลสอิสระมากส่งผลให้โอกาสเกิดเฟอร์ฟูรอลสูงขึ้นเช่นกันดังแสดงในภาพที่ 4 อย่างไรก็ตามปริมาณของไซโลสอิสระในของเหลวจะมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิการปรับสภาพเพิ่มจาก 180 องศาเซลเซียสเป็น 200 องศาเซลเซียส เนื่องจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสในชีวมวลไปเป็นไซโลสเกิดขึ้นได้ดีเมื่ออุณหภูมิการปรับสภาพเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส (Ando et al., 2000 และ Yu et al., 2010) ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิการปรับสภาพต่อไปจึงส่งผลให้เกิดการสลายตัวของไซโลสอิสระ โดยงานวิจัยของ Pérez และคณะ (2008) รายงานว่าการสลายตัวของไซโลสไปเป็นเฟอร์ฟูรอลจะเกิดอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้อุณหภูมิการปรับสภาพเบื้องต้นเท่ากับ 220 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้จะไม่พบไซโลสอิสระอยู่ในของเหลวหลังปรับสภาพเลย และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นสารยับยั้งทั้งสองชนิดในของเหลวภายหลังการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จะพบว่าความเข้มข้นของ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์มีค่ามากกว่าความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอล ประมาณ 3 เท่า เนื่องจาก 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์เกิดจากกลูโคสซึ่งได้มาจากทั้งการสลายตัวของเซลลูโลสและแป้งในชีวมวล



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ในของเหลวภายหลังการปรับสภาพชีวมวลผสมในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

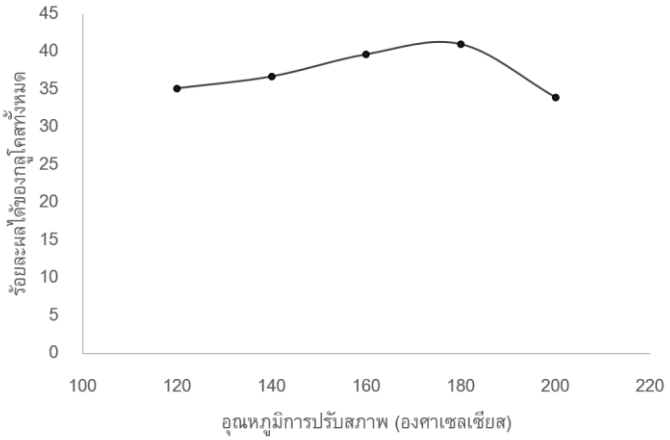


ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของเฟอร์ฟูรอลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์ฟูราลดีไฮด์ในของเหลวภายหลังการปรับสภาพกากมันสำปะหลังในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

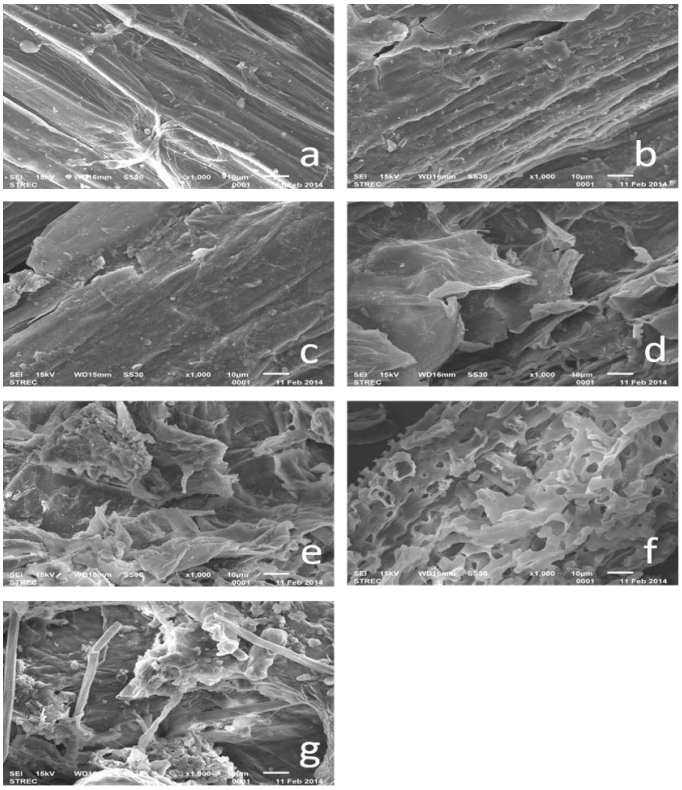
ผลของอุณหภูมิการปรับสภาพต่อประสิทธิภาพของการย่อยด้วยเอนไซม์

ภาพที่ 6 แสดงร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดภายหลังจากการย่อยชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์ที่ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 120 ถึง 200 องสาเซลเซียส พบว่าร้อยละผลได้ของกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิการปรับสภาพ และมีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 40.98 ที่อุณหภูมิการปรับสภาพเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นผลมาจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสที่เกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมินี้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์เชิงโครงสร้างพื้นผิวของชีวมวลทั้งที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเทียบกับที่ผ่านการปรับสภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000 เท่า ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าการปรับสภาพส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเชิงโครงสร้างพื้นผิวของชีวมวลอย่างมาก โดยชีวมวลที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ (a และ b) จะมีลักษณะพื้นผิวที่เรียบ เส้นใยยึดกันอย่างหนาแน่น แต่เมื่อผ่านการปรับสภาพเส้นใยในชีวมวลจะถูกทำลายให้แตกออกจนเกิดรูพรุนบริเวณพื้นผิว และจะเกิดมากขึ้นตามการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพโดยเฉพาะเมื่อปรับสภาพที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (f) และเมื่อใช้อุณหภูมิการปรับสภาพที่ 200 องศาเซลเซียส (g) จะเกิดเป็นโพรงขนาดใหญ่บนพื้นผิวชีวมวลเป็นจำนวนมากช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของชีวมวลซึ่งส่งผลดีต่อการเข้าถึงของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากร้อยละน้ำหนักที่สูญเสียไปของชีวมวลและพื้นผิวของชีวมวลภายหลังการปรับสภาพพบว่าการปรับสภาพ

เบื้องต้นที่อุณหภูมิสูงให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงร้อยละผลได้ของกลูโคสจะเห็นว่าการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลของชีวมวลภายหลังการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าของชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียสเพียงประมาณร้อยละ 1 เท่านั้น ซึ่งเป็นผลมาจากชีวมวลเปียกที่นำมาเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลมีสารยับยั้งปนเปื้อนมาก ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังยืนยันได้จากการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลของชีวมวลภายหลังการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่พบสารยับยั้งในของเหลวมากที่สุด ส่งผลให้ร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง นอกจากผลของการปนเปื้อนของสารยับยั้งแล้วร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดที่ลดลงยังเป็นผลจากการสูญเสียเซลลูโลสซึ่งเกิดการสลายตัวระหว่างการปรับสภาพที่อุณหภูมิสูง (Yu et al., 2010) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการปรับสภาพชีวมวลด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตคือ 160 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดเท่ากับ 39.64 ค่าที่ได้ต่ำกว่าร้อยละ 68.08 ซึ่งเป็นค่าที่ควรได้ตามทฤษฎี (คำนวณจากน้ำหนักของเซลลูโลสและแป้งในสารป้อน) เนื่องจากที่อุณหภูมิการปรับสภาพนี้การสลายตัวออกมาของเฮมิเซลลูโลสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในของเหลวภายหลังการปรับสภาพมีค่าต่ำ (รูปที่ 5) ทำให้สามารถนำของเหลวภายหลังการปรับสภาพไปผลิตเอทานอลได้อีกทางหนึ่งโดยผ่านกระบวนการย่อยด้วยเทคนิคที่เหมาะสม เนื่องจากองค์ประกอบในของเหลวภายหลังการปรับสภาพส่วนมากจะมาจากการสลายตัวของแป้งซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของกลูโคสและสามารถถูกย่อยเป็นกลูโคสอิสระได้โดยใช้กรดอ่อนหรือเอนไซม์อะไมเลส นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม โดยเฉพาะไซโลสที่เกิดจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส การนำของเหลวหลังปรับสภาพมาใช้ผลิตเป็นเอทานอลมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพโดยรวมของกระบวนการผลิตเอทานอลให้ดีขึ้น



ภาพที่ 6 ร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดในของเหลวภายหลังจากนำชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพที่ภาวะต่าง ๆ มาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นของกลูโคสจากการย่อยเซลลูโลสบริสุทธิ์จำนวน 1.2 กรัม เท่ากับ 22.90 กรัมต่อลิตร (enzyme activity = 23.85 FPU/ml)



ภาพที่ 8 ลักษณะโครงสร้างพื้นผิวของชีวมวลทั้งที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพที่กำลังขยาย 1000 เท่า
a) ฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ
b) ชีวมวลผสมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ
c) ชีวมวลผสมผ่านการปรับสภาพที่ 120 องศาเซลเซียส
d) ชีวมวลผสมผ่านการปรับสภาพที่ 140 องศา
e) ชีวมวลผสมผ่านการปรับสภาพที่ 160 องศาเซลเซียส
f) ชีวมวลผสมผ่านการปรับสภาพที่ 180 องศาเซลเซียส
g) ชีวมวลผสมผ่านการปรับสภาพที่ 200 องศาเซลเซียส

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิการปรับสภาพโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบแบตช์สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการ การปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงทำให้เฮมิเซลลูโลสและแป้งสลายตัวออกมาจากชีวมวลได้มากขึ้นส่งผลให้เกิดรูพรุนบริเวณพื้นผิว ทำให้การทำงานของเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสที่อยู่ในชีวมวลไปเป็นกลูโคสเกิดได้ดียิ่งขึ้น แต่การปรับสภาพที่อุณหภูมิสูงเกินไปก่อให้เกิดสารยับยั้งมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงการนำกลูโคสหลังการเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลและการนำของเหลวหลังปรับสภาพไปใช้ผลิตเอทานอลร่วมกัน การปรับสภาพชีวมวลผสมด้วยน้ำภาวะกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส มีข้อได้เปรียบกว่าการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าร้อยละผลได้ของกลูโคสทั้งหมดเท่ากับ 39.64

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีปิโตรเคมีและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน)

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2554. พลังงานชีวมวล. กรุงเทพฯ. มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม.

Ando, H., Sakaki, T., Kokusho, T., Shibata, M., Uemura, Y. and Hatate, Y. 2000. Decomposition Behavior of Plant Biomass in Hot-Compressed Water. Industrial and Engineering Chemistry Research. 39(10): 3688-3693.

Chum, H.L. and Overend, R.P. 2001. Biomass and renewable fuels. Fuel Processing Technology 71(1–3): 187-195.

Garrote, G., Domínguez, H. and Parajó, J.C. 2002. Interpretation of deacetylation and hemicellulose hydrolysis during hydrothermal treatments on the basis of the severity factor. Process Biochemistry. 37(10): 1067-1073.

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

Mosier, N., Ho, N., Hendrickson, R., Sedlak, M. and Ladisch, M.R. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. Bioresource Technology. 96(18): 1986-1993.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 96(6): 673-686.

Pérez, J. A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M. J. and Manzanares, P. 2008. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. Fuel. 87(17–18): 3640-3647.

Pitcha, W., Pramoch, R. and Sumaeth, C. 2012. Production of Glucose from the Hydrolysis of Cassava Residue using Bacteria Isolates from Thai Higher Termites. World Academy of Science, Engineering & Technology. 64: 353.

Sanchez, G., Pilcher, L., Roslander, C., Modig, T., Galbe, M. and Liden, G. 2004. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. Bioresource Technology. 93(3): 249-256.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Templeton, D. 2008, Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples NREL/TP-510-42623. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

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

Van Soest, P.J. and Goering, H.K. 1983. FORAGE FIBER ANALYSES (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agriculture Handbook.

Viikari, L., Vehmaanperä, J. and Koivula, A. 2012. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. Biomass and Bioenergy. 46(0): 13-24.

Wajira, S. R. and David, S. J. 2008. Starch Gelatinization. Advances in Food and Nutrition Research. 55: 221–268.

Walker, G. 2010. Bioethanol : science and technology of fuel alcohol. Ventus publishing Aps.

Weil, J., Brewer, M., Hendrickson, R., Sarikaya, A. and Ladisch, M. 1998. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. Applied Biochemistry and Biotechnology, 70-72(1): 99-111.

Yu, G., Yano, S., Inoue, H., Inoue, S., Endo, T. and Sawayama, S. 2010. Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 160(2): 539-551.