

Research Article

# การปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยตัวทำละลายเพื่อย่อยด้วย เอนไซม์

## Organosolv pretreatment of oil palm trunk for enzymatic hydrolysis

พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์<sup>1,2,\*</sup>

Pongsak Noparat<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี

<sup>2</sup>หน่วยวิจัยพลังงานทดแทนและสิ่งแวดล้อมเพื่อชุมชน มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี

<sup>1</sup>Program in Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Suratthani 84100, Thailand

<sup>2</sup>Renewable Energy and Environment Research for Local Community Unit (REERCU), Suratthani Rajabhat University, Suratthani 84100, Thailand

\*E-mail: pongsak@sru.ac.th

Received: 09/03/2018; Accepted: 15/05/2018

### บทคัดย่อ

ลำต้นปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสปริมาณสูงเหมาะสำหรับการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล การปรับสภาพชีวมวลลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยตัวทำละลายทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ งานวิจัยนี้ศึกษาการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริก โดยศึกษาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1-3 เอทานอลร้อยละ 40-60 และอุณหภูมิ 170-190 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อย 30 นาที ผลการทดลอง พบว่า การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร่วมกับเอทานอลร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณชีวมวลหลังการปรับสภาพกลับคืนมาร้อยละ 66.1 สามารถกำจัดลิกนินและไซโลสได้ร้อยละ 18.2 และ 93.9 ตามลำดับ เมื่อย่อยชีวมวลหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 15 FPU/กรัมเซลลูโลส ร่วมกับเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase ที่ความเข้มข้น 30 CBU/กรัมเซลลูโลส สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

**คำสำคัญ:** ลำต้นปาล์มน้ำมัน, เอนไซม์, การปรับสภาพ, เอทานอล

### Abstract

Oil palm trunk (OPT) an abundant agriculture waste was evaluated as an alternative lignocellulosic biomass resource for bioethanol production. Organosolv pretreatment was applied to the OPT to enhance its enzymatic saccharification. The pretreatment conditions were optimized through a designed experiment within the initial H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrations 1-3% (w/w), 40-60% Ethanol and 170-190°C for 30 min. The results indicated that 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50% Ethanol at 170°C, the recoveries of biomass was 66.1%. Organosolv pretreatment removed were 18.2% lignin and 93.9% xylose. OPT pretreated for enzymatic hydrolysis with a cellulase loading of 15 FPU/g cellulose with β-glucosidase (30 CBU/g cellulose), the cellulose to glucose conversion yields was 100% at 24 h.

**Keywords:** oil palm trunk, enzyme, pretreatment, ethanol

### บทนำ

เมื่อต้นปาล์มน้ำมันอายุประมาณ 25-30 ปี จะให้ผลผลิตน้ำมันที่น้อยลง ชาวสวนปาล์มจึงต้องโค่นต้นปาล์มเหล่านั้นทิ้งเพื่อปลูกปาล์มใหม่ ปาล์มที่ถูกโค่นเหล่านั้นจะถูกทำลายด้วยหลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการเผาหรืออัดสารเคมีให้ปาล์มขึ้นต้นตายซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นการทำให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม ดังนั้นถ้ามีวิธีการนำต้นปาล์มน้ำมันไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเป็นการช่วยลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ต้นปาล์มที่ตัดทิ้งหลังจากต้นปาล์มมีอายุมาก (>25 ปี) และมีผลผลิตน้อย (70 ตันน้ำหนักแห้งต่อเฮกเตอร์ของพื้นที่ปลูกปาล์ม) (Kee, 2004) เมื่อพิจารณาพบว่าองค์ประกอบของต้นปาล์มน้ำมันมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส (ร้อยละ 31.3-42.5) เฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 19.7-31.0) และลิกนิน (ร้อยละ 10.74-18.5) (Chin et al., 2010; Noparat et al., 2011) จากองค์ประกอบเหล่านี้สามารถนำมาผลิตเป็นน้ำตาลโดยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ โดยก่อนนำต้นปาล์มน้ำมันไปผลิตน้ำตาลด้วยเอนไซม์นั้นต้องมีการปรับสภาพหลายกระบวนการทั้งกระบวนการทางกายภาพ (physical pretreatment) โดยการใช้แรงกล เช่น การบด การตัด เป็นต้น การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ (physical-chemical pretreatment) เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion) เป็นต้น การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (chemical pretreatment) เช่น การใช้กรด (acid hydrolysis) การใช้ด่าง (alkaline hydrolysis) (Mosier et al., 2005; Obama et al., 2012) การใช้สารละลายอินทรีย์ (organosolv) การใช้โอโซน การกำจัดลิกนินในเซลลูโลสด้วยซัลไฟท์ (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose, SPORL) การใช้ของเหลวไอออนิก (ionic liquid)

และการปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biological pretreatment) เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์จำพวกรา ได้แก่ ราขาว ราน้ำตาล เป็นต้น (Noparat et al., 2017) อย่างไรก็ตามแต่ละกระบวนการปรับสภาพจะส่งผลต่อโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกกระบวนการปรับสภาพมาใช้ในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุชีวมวลนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิด โครงสร้างทางเคมี และองค์ประกอบอื่น ๆ ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดก่อน ทำการเลือกกระบวนการปรับสภาพให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Megawati et al., 2010)

ดังนั้น งานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์ (organosolv) เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถเก็บเกี่ยวเอทานอลโดยการกลั่นแล้วนำกลับมาใช้ปรับสภาพในครั้งต่อไปได้ นอกจากนี้ลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายอินทรีย์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ (Pan et al., 2005; Zhao et al., 2009)

## วิธีการทดลอง

งานวิจัยเป็นแบบเป็นการวิจัยแบบทดลอง (experimental research) โดยมีวิธีดำเนินงานวิจัยดังนี้

1. วิเคราะห์องค์ประกอบลำต้นปาล์มน้ำมัน โดยนำลำต้นปาล์มน้ำมันสดอายุ 25 ปี จากสวนปาล์มน้ำมันบ้านไทรทอง ตำบลบางวัน อำเภอกระบุรี จังหวัดพังงา มาตัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณท่อนละ 50 เซนติเมตร แล้วนำแต่ละท่อนมาบดด้วยเครื่องข่อยปุยพืชสดให้มีขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตรแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้เหลือความชื้นประมาณร้อยละ 10 แล้วนำไปบดให้ละเอียดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องบด (hammer mill) หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของลำต้นปาล์มน้ำมัน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ชนิดของน้ำตาล และเถ้า (AOAC, 2012)

2. ศึกษาการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง โดยนำลำต้นปาล์มน้ำมันมาปรับสภาพด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูงโดยออกแบบการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 โดยศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (ร้อยละ 1-3 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ 40-60 โดยน้ำหนัก) และอุณหภูมิ (170-190 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาในการย่อย 30 นาที (Noparat et al., 2015)

**ตารางที่ 1.** ปัจจัยและระดับของการทดลองแบบ Fractional factorial design

ปัจจัย	ระดับ		
กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	1	2	3
เอทานอล (ร้อยละ)	40	50	60
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	170	180	190

การปรับสภาพในการทดลองนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้ไมโครเวฟ ในการให้ความร้อน ประกอบด้วยถังย่อย 6 ถัง มีปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณลำต้นปาล์มน้ำมัน 10 กรัม และสารละลายกรดกับเอทานอลที่อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยทำการผสมที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) (Noparat et al., 2015)

ชุดการทดลองแบบ Fractional factorial design ประกอบด้วย 9 ชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2 หลังจากปรับสภาพแล้วกรองแยกของเหลวออกจากของแข็ง นำส่วนของของเหลวไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลรวมทั้งกรดฟอร์มิก (formic acid) ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural, HMF) เฟอร์ฟูรัล (furfural) กรดแอซีติก (acetic acid) และกรดเลวูลินิก (levulinic acid) ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) สำหรับในส่วนหนึ่งของของแข็งนำไปหาความชื้นและผลผลิตที่ได้รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบแล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ (Shuai et al., 2010)

**ตารางที่ 2.** ชุดการทดลองแบบ Fractional factorial design

ชุดการทดลอง	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	เอทานอล (ร้อยละ)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
1	1	40	170
2	3	50	170
3	2	60	170
4	3	40	180
5	2	50	180
6	1	60	180
7	2	40	190
8	1	50	190
9	3	60	190

\*เวลาที่ใช้ย่อย 30 นาที

3. ศึกษาการย่อยลำต้นปาล์มหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าประกอบด้วย เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเบต้ากลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) ของ Novozymes North America (Franklinton, NC, USA) โดยศึกษาการย่อยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ใช้ปริมาณ เซลลูโลสที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 0.8 กรัม ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 4.8) ที่ความเข้มข้น 0.05 M ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม Tetracycline chloride ร้อยละ 5 เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ระหว่างการย่อยด้วยเอนไซม์ (Noparat et al., 2015) ปริมาณของเอนไซม์ Cellulase ที่ใช้ เท่ากับ 15 FPU (Filter Paper Unit) ต่อกรัมเซลลูโลส และ  $\beta$ -glucosidase เท่ากับ 30 CBU (Cellobiase Unit) ต่อกรัมเซลลูโลส โดยเติม เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วย เครื่อง HPLC

4. วิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (SPSS 16.0) วิเคราะห์ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบของลำต้นปาล์มน้ำมัน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ชนิดของน้ำตาล และเถ้า (AOAC, 2012) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC (ICS-3000) โดยใช้ Amperometry detector และ Carbopac™ PA1 guard (Shuai et al., 2010) และวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งด้วยเครื่อง HPLC (ICS-3000) โดยใช้คอลัมน์ Supelcogel C-610H ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและใช้ UV detector ที่ 210 นาโนเมตร (Shuai et al., 2010)

### ผลการทดลอง

ลำต้นปาล์มน้ำมันอายุ 25 ปี มีความยาว 12 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร โดยใช้ส่วนปลายของ ลำต้นห่างจากยอดลงมา 3 เมตร จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของลำต้นปาล์มน้ำมัน พบว่า มีความชื้นร้อยละ 12.44 เซลลูโลสร้อยละ 38.8 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 23.7 ลิกนินร้อยละ 21.4 และเถ้าร้อยละ 2.94

จากการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง โดย ทำการศึกษาจำนวน 9 ชุดการทดลอง พบว่า ปริมาณชีวมวลลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการปรับสภาพมีปริมาณอยู่ใน ช่วงร้อยละ 44.67-66.11 โดยชุดการทดลองที่ให้ปริมาณชีวมวลลำต้นปาล์มน้ำมันสูงสุด คือ ชุดการทดลองที่ 1 (ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 เอทานอลร้อยละ 40 และอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส) ให้ปริมาณชีวมวล สูงสุดร้อยละ 66.11 เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ 6 (ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 เอทานอลร้อยละ 60 และอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส) ให้ปริมาณชีวมวลร้อยละ 63.54 พบว่า ปริมาณชีวมวลไม่มีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 3) สำหรับปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่า ชุดการทดลองที่ 1-8 ให้ปริมาณน้ำตาล กลูโคสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 53.05-61.43 ในขณะที่ ปริมาณลิกนินหลังการปรับสภาพ พบว่า ชุดการทดลองที่ 1-3 ให้ปริมาณลิกนินไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยให้ปริมาณลิกนินร้อยละ 26.47-28.16

**ตารางที่ 3.** ปริมาณชีวมวล น้ำตาลกลูโคส และลิกนินในส่วนของแข็งหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง

ชุดการทดลอง	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	เอทานอล (ร้อยละ)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชีวมวล (ร้อยละ)	กลูโคส (ร้อยละ)	ลิกนิน (ร้อยละ)
1	1	40	170	66.11 ± 1.01 <sup>d</sup>	59.82 ± 5.64 <sup>b</sup>	26.47 ± 1.48 <sup>a</sup>
2	3	50	170	56.94 ± 2.88 <sup>c</sup>	61.43 ± 5.36 <sup>b</sup>	28.16 ± 2.03 <sup>a</sup>
3	2	60	170	58.72 ± 0.17 <sup>c</sup>	59.78 ± 3.61 <sup>b</sup>	27.22 ± 0.93 <sup>a</sup>
4	3	40	180	50.04 ± 2.41 <sup>b</sup>	56.24 ± 3.99 <sup>b</sup>	29.98 ± 1.37 <sup>b</sup>
5	2	50	180	57.74 ± 2.79 <sup>c</sup>	59.62 ± 2.53 <sup>b</sup>	28.88 ± 1.05 <sup>b</sup>
6	1	60	180	63.54 ± 1.67 <sup>d</sup>	58.02 ± 2.71 <sup>b</sup>	29.94 ± 1.84 <sup>b</sup>
7	2	40	190	56.84 ± 1.15 <sup>c</sup>	53.05 ± 3.58 <sup>b</sup>	29.39 ± 0.66 <sup>a</sup>
8	1	50	190	63.11 ± 0.09 <sup>d</sup>	55.58 ± 2.09 <sup>b</sup>	28.53 ± 1.43 <sup>b</sup>
9	3	60	190	44.67 ± 1.90 <sup>a</sup>	28.47 ± 2.35 <sup>a</sup>	30.63 ± 1.10 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อศึกษาการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง พบว่า หลังจากการปรับสภาพมีชนิดและปริมาณของน้ำตาลในไฮโดรไลเสท ประกอบด้วยน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ อะราบิโนส กาแลคโตส กลูโคส และไซโลส โดยน้ำตาลแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก ปริมาณเอทานอล และอุณหภูมิที่ใช้ (ตารางที่ 4) ชุดการทดลองที่ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในไฮโดรไลเสทสูงสุด (ร้อยละ 11.55) คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 3 เอทานอลร้อยละ 60 และอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทที่ได้จากการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง ประกอบด้วย กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดแอซติก (acetic acid) กรดเลวูลินิก (levulinic acid) เฟอ์ฟูรัล (furfural) และ ไฮดรอกซีเมทิลเฟอ์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural, HMF) โดยปริมาณสารยับยั้งแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก ปริมาณเอทานอล และอุณหภูมิที่ใช้

**ตารางที่ 4.** ชนิดและปริมาณน้ำตาลในไฮโดรไลเสทที่ได้จากหลังการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง

ชุดการทดลอง	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	เอทานอล (ร้อยละ)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำตาล (ร้อยละ)			
				อะราบินอส	แกลแลคโตส	กลูโคส	ไซโลส
1	1	40	170	0.46 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.43 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.88 ± 0.13 <sup>b</sup>
2	3	50	170	0.79 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>bc</sup>	4.46 ± 0.28 <sup>de</sup>	5.23 ± 0.69 <sup>c</sup>
3	2	60	170	0.67 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>bc</sup>	2.16 ± 0.21 <sup>bc</sup>	4.49 ± 0.90 <sup>c</sup>
4	3	40	180	0.41 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>d</sup>	6.57 ± 1.65 <sup>f</sup>	4.63 ± 0.56 <sup>c</sup>
5	2	50	180	0.31 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>cd</sup>	2.91 ± 0.10 <sup>cd</sup>	4.04 ± 0.22 <sup>c</sup>
6	1	60	180	0.20 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.25 <sup>b</sup>
7	2	40	190	0.17 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>ab</sup>	4.90 ± 0.42 <sup>c</sup>	2.28 ± 0.68 <sup>b</sup>
8	1	50	190	0.19 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>ab</sup>	2.39 ± 0.40 <sup>b</sup>
9	3	60	190	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	11.55 ± 1.18 <sup>g</sup>	1.04 ± 0.09 <sup>a</sup>

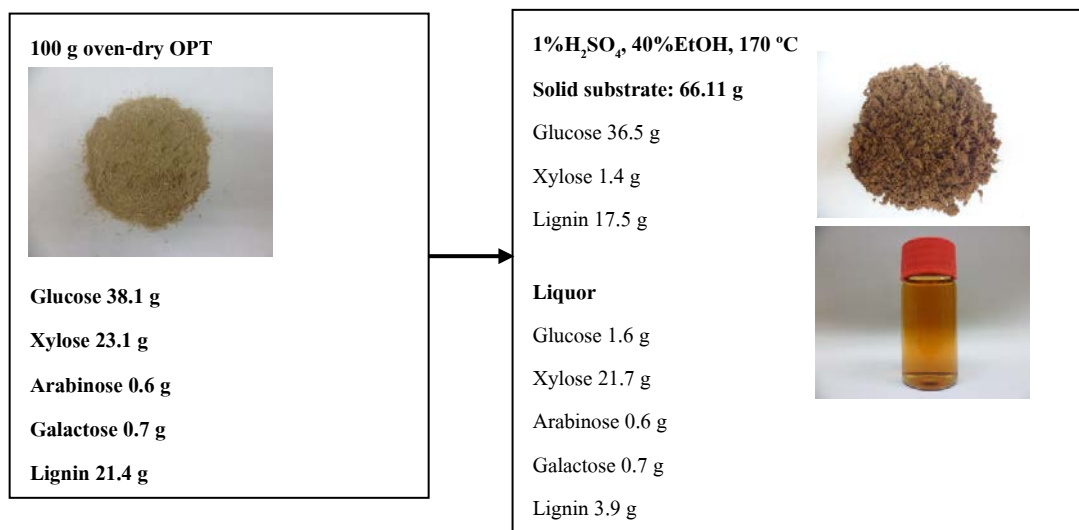
หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**ตารางที่ 5.** ชนิดและปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลเสทที่ได้จากหลังการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยสารละลายเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง

ชุดการทดลอง	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	เอทานอล (ร้อยละ)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณสารยับยั้ง (ร้อยละ)				
				Formic acid	Acetic acid	Levulinic acid	HMF	Furfural
1	1	40	170	0.46 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.88 ± 0.13 <sup>c</sup>	2.88 ± 0.13 <sup>c</sup>
2	3	50	170	0.79 ± 0.05 <sup>f</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>c</sup>	4.46 ± 0.28 <sup>f</sup>	5.23 ± 0.69 <sup>f</sup>	5.23 ± 0.69 <sup>f</sup>
3	2	60	170	0.67 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>c</sup>	2.16 ± 0.21 <sup>c</sup>	4.49 ± 0.90 <sup>d</sup>	4.49 ± 0.90 <sup>d</sup>
4	3	40	180	0.41 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.35 ± 0.04 <sup>d</sup>	6.57 ± 1.65 <sup>e</sup>	4.63 ± 0.56 <sup>d</sup>	4.63 ± 0.56 <sup>d</sup>
5	2	50	180	0.31 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>d</sup>	2.91 ± 0.10 <sup>d</sup>	4.04 ± 0.22 <sup>cd</sup>	4.04 ± 0.22 <sup>cd</sup>
6	1	60	180	0.20 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.61 ± 0.25 <sup>c</sup>	2.61 ± 0.25 <sup>c</sup>
7	2	40	190	0.17 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.42 <sup>f</sup>	2.28 ± 0.68 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.68 <sup>b</sup>
8	1	50	190	0.19 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>ab</sup>	2.39 ± 0.40 <sup>b</sup>	2.39 ± 0.40 <sup>b</sup>
9	3	60	190	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.55 ± 1.18 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.09 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อศึกษาสมมูลมวลของลำต้นปาล์มน้ำมันก่อนและหลังปรับสภาพโดยวิเคราะห์องค์ประกอบของลำต้นปาล์มน้ำมันก่อนการปรับสภาพ และหลังการปรับสภาพแยกออกเป็นส่วนของของแข็งและของเหลวซึ่งทั้งสองส่วนนี้ประกอบด้วยน้ำตาลและลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพ โดยเริ่มต้นจากลำต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ปริมาณ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 38.1 กรัม ไซโลส 23.1 กรัม อะราบินอส 0.6 กรัม กาแลคโตส 0.7 กรัม และลิกนิน 21.4 กรัม เมื่อผ่านการแปรสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับลำต้นปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิสูง พบว่า ปริมาณชีวมวลที่เหลือเท่ากับ 66.11 กรัม ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 36.5 กรัม ไซโลส 1.4 กรัม และลิกนิน 17.5 กรัม คิดเป็นการกำจัดลิกนินและไซโลสได้ร้อยละ 18.2 และ 93.9 ตามลำดับ สำหรับในส่วนของไฮโดรไลสประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 1.6 กรัม ไซโลส 21.7 กรัม อะราบินอส 0.6 กรัม กาแลคโตส 0.7 กรัม และลิกนิน 3.9 กรัม (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. สมมูลมวลลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เอทานอลร้อยละ 40 และอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อศึกษาการย่อยชีวมวลลำต้นปาล์มน้ำมันหลังการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ พบว่า การใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกในช่วงร้อยละ 1-3 เอทานอลร้อยละ 40-60 และอุณหภูมิ 170-190 องศาเซลเซียสนั้น เอนไซม์เซลลูเลส และ  $\beta$ -glucosidase สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้ร้อยละ 100 ในเวลา 24 ชั่วโมง ในชุดการทดลองที่ 2 (ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 3 เอทานอลร้อยละ 50 และอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส) ชุดการทดลองที่ 3 (ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 2 เอทานอลร้อยละ 60 และอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส) และชุดการทดลองที่ 7 (ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 2 เอทานอลร้อยละ 40 และอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 6)



ตารางที่ 6. ร้อยละการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสของชีวมวลหลังการปรับสภาพ

ชุดการทดลอง	กรดซัลฟิวริก (ร้อยละ)	เอทานอล (ร้อยละ)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ร้อยละการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส	
				24 h	48 h
1	1	40	170	85.53	92.95
2	3	50	170	100	100
3	2	60	170	100	100
4	3	40	180	97.96	100
5	2	50	180	99.62	100
6	1	60	180	92.83	100
7	2	40	190	100	100
8	1	50	190	93.16	100
9	3	60	190	84.12	93.60

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การปรับสภาพด้วยเอทานอลทำให้สามารถเก็บเกี่ยวตัวเอทานอลโดยการกลั่นแล้วนำกลับมาใช้ปรับสภาพในครั้งต่อไปได้ นอกจากนี้เทคนิคที่ได้จากการปรับสภาพสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ (Pan et al., 2005; Zhao et al., 2009) ผลจากการปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลโดยใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 เอทานอลร้อยละ 40 และอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณชีวมวลร้อยละ 66.11 หรือคิดเป็นปริมาณชีวมวลที่ได้จากหลังการปรับสภาพเท่ากับ 66.11 กรัมต่อลำต้นปาล์มน้ำมันแห้ง 100 กรัม โดยปริมาณชีวมวลที่ได้จากการปรับสภาพนั้น สามารถนำมาวิเคราะห์สมดุลชีวมวลลำต้นปาล์มน้ำมันก่อนและหลังการปรับสภาพซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่ใช้ในการประเมินความเหมาะสมในการเลือกวิธีการปรับสภาพชีวมวล (Qin et al., 2012; Li et al., 2010; Lau & Dale, 2009) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์สมดุลชีวมวลนั้นไม่สามารถทำได้ง่ายเนื่องจากต้องวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการปรับสภาพให้ครบถ้วนทุกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a; Garlock et al., 2011)

องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในส่วนของเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสบางส่วนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกให้ปริมาณน้ำตาลที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้ นอกจากนี้ น้ำตาลบางส่วนเปลี่ยนเป็นสารยับยั้ง ได้แก่ น้ำตาลเพนโทสซัยคลายเป็นสารเฟอร์ฟูรัล (furfural) และน้ำตาลเฮกโซสซัยคลายเป็นไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลดีไฮด์ (hydroxy methylfurfural, HMF) สำหรับในส่วนของไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลดีไฮด์สามารถย่อยสลายได้เป็นกรดเลวูลินิก (levulinic acid) (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000a; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000b) จากการทดลองนี้ชนิดและปริมาณสารยับยั้งในไฮโดรไลสเสสที่ได้จากการปรับ

สภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง ประกอบด้วยกรดฟอร์มิก กรดแอซีติก กรดเลวูลินิก เฟอร์ฟูรัล และและไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล โดยปริมาณสารยับยั้งแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก ปริมาณเอทานอล และอุณหภูมิที่ใช้ ทั้งนี้การนำไฮโดรไลสไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตเอทานอลนั้นต้องมีการกำจัดสารยับยั้งก่อนนำไปหมัก เนื่องจากสารยับยั้งเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Chandel et al., 2007)

คุณลักษณะของชีวมวลหลังจากย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ พบว่า ในส่วนของปริมาณเอมิเซลลูโลส และโครงสร้างของลิกนิน บางส่วนถูกทำลายโดยขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเซลลูโลส ค่า degree of polymerization (DP) พื้นที่ผิว ขนาดของรูพรุน และขนาดของชีวมวล (Shuai et al., 2010; Mansfield et al., 1999; Zhu et al., 2009) จากการศึกษาการย่อยลำต้นปาล์มน้ำมันโดยการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที พบว่า มีความสามารถในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสได้ร้อยละ 80 (Noparat et al., 2015) และการปรับสภาพชีวมวลด้วยโซเดียมซัลไฟด์ด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โซเดียมซัลไฟด์ร้อยละ 9 อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสร้อยละ 90 (Shuai et al., 2010) เมื่อเปรียบเทียบการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่า การใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกในช่วงร้อยละ 1-3 เอทานอลร้อยละ 40-60 และอุณหภูมิ 170-190 องศาเซลเซียสนั้น เอนไซม์เซลลูเลสและ  $\beta$ -glucosidase สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้ร้อยละ 100 ในเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากลักษณะของชีวมวลหลังการปรับสภาพด้วยเอทานอลนั้นทำให้ประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Pan et al., 2005)

### สรุปผลการทดลอง

การปรับสภาพลำต้นปาล์มน้ำมันด้วยเอทานอลร่วมกับกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูงได้น้ำตาลเฮกโซสและเพนโตสหลังการปรับสภาพกลับคืนมาร้อยละ 66.1 สามารถกำจัดลิกนินและไซโลสได้ร้อยละ 18.2 และ 93.9 ตามลำดับ การปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร่วมกับเอทานอลร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส สามารถเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคสได้ร้อยละ 100 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีสำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณ หมวดเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

### เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC* (19th ed.) Gaithersburg, MD: AOAC International.
- Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A. & Kuhad, R. C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, 98, 1947-1950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.047>
- Chin, K. L., H'ng, P. S., Wong, L. J., Tey B. T. & Paridah, M. T. (2010). Optimization study of ethanolic fermentation from oil palm trunk, rubberwood and mixed hardwood hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101, 3287-3291. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.036
- Garlock, R. J., Balan, V., Dale, B. E., Pallapolu, V. R., Lee, Y. Y., Kim, Y. et al. (2011). Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. *Bioresource Technology*, 102, 11063-11071. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.002>
- Kee, K. K. (2004). *Nutrient reserves and recycling from oil palm trunks at replanting*. pp. 1-6. In the 4th International Crop Science Congress, 26 September-1 October 2004, Brisbane, Australia.
- Lau, M. W. & Dale, B. E. (2009). Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 1368-1373.
- Li, B. Z., Balan, V., Yuan, Y. J. & Dale, B. E. (2010). Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*, 101, 1285-1292. doi: 10.1016/j.biortech.2009.09.044
- Mansfield, S. D., Mooney, C. & Saddler, J. N. (1999) Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15, 804-816. doi: 10.1021/bp9900864
- Megawati, H., Sediawan, W. B., Sulisty, H. & Hidayat M. (2010). Pseudo-homogeneous kinetic of dilute-acid hydrolysis of rice husk for ethanol production: effect of sugar degradation. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 41, 5-23.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple M. et al. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, 673-686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Noparat, P., Prasertsan, P. & O-Thong, S. (2011). Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 14086-14092. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.143>

- Noparat, P., Prasertsan, P., O-Thong, S. & Pan, X. (2015). Dilute acid pretreatment of oil palm trunk biomass at high temperature for enzymatic hydrolysis. *Energy Procedia*, 79, 924-929. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.588>
- Noparat, P., Prasertsan, P., O-Thong, S. & Pan, X. (2017). Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose for enzymatic hydrolysis of oil palm trunk. *Energy Procedia*, 138, 1122-1127. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.209>
- Obama, P., Ricochon, G., Muniglia, L. & Brosse, N. (2012). Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: Effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresource Technology*, 112, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.080>
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25-33. doi: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K. et al. (2005). Biorefining of Softwoods Using Ethanol Organosolv Pulping: Preliminary Evaluation of Process Streams for Manufacture of Fuel-Grade Ethanol and Co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(4), 473-481. doi: 10.1002/bit.20453
- Qin, L., Liu, Z. H., Li, B. Z., Dale, B. E. & Yuan, Y. J. (2012). Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids. *Bioresource Technology*, 112, 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.134>
- Shuai, L., Yang, Q., Zhu, J. Y., Lu, F. C., Weimer, P. J., Ralph, J. et al. (2010). Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 101, 3106-3114. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.044>
- Zhao, X., Cheng, K. & Liu, D. (2009). Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 815-827. doi: 10.1007/s00253-009-1883-1
- Zhu, J. Y., Wang, G. S., Pan, X. J. & Gleisner, R. (2009). Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*, 64, 474-485. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.09.026>