

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากทะลายปาล์มเปล่าด้วยเอนไซม์

เซลล์จาก *Aspergillus niger* C-1184

Optimization of Sugar Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch

by Cellulase from *Aspergillus niger* C-1184

ปิยาภรณ์ วังศิริกุล^{1*}, ธีรภัทร วังศิริกุล²

Piyaporn Wangsirikul^{1*}, Teerapat Wangsirikul²

(Received: January 2, 2020; Revised: February 3, 2020; Accepted: March 23, 2020)

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากทะลายปาล์มเปล่า การปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เส้นใยหลังปรับสภาพมีปริมาณเซลลูโลส 83.73% โอลิโกเซลลูโลส 92.33% และลิกนิน 19.33% ซึ่งก่อนปรับสภาพจะมีปริมาณเซลลูโลส 78.22% โอลิโกเซลลูโลส 97.78% และลิกนิน 27.00% นำตัวอย่างทะลายปาล์มที่ไม่ปรับสภาพและปรับสภาพส่องด้วยเครื่อง Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM) เพื่อดูพื้นผิว พบว่าตัวอย่างทะลายปาล์มเปล่าก่อนและหลังการปรับสภาพแตกต่างกัน ก่อนปรับสภาพพื้นผิวจะเรียบ หลังปรับสภาพพื้นผิวมีลักษณะรุขระ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยทะลายปาล์มเปล่า ใช้เอนไซม์เซลล์จาก *Aspergillus niger* C-1184 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลล์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่าง 30 กรัม ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาล 14088.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบชนิดของน้ำตาลด้วย เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) จะได้กลูโคส

คำสำคัญ: ทะลายปาล์มเปล่า เซลล์จาก FE-SEM HPLC

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์

¹Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University

²วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีราชภัฏวราชนครินทร์

²Naradhiwat College of Agriculture and Technology, Princess of Naradhiwas University

*Corresponding Author: piyaporn.v@pnu.ac.th



Abstract

This research investigated sugar production from oil palm empty fruit bunch. The steam explosion assisted with 3 M NaOH for 30 minutes was used for pretreatment. After pretreatment, the chemical content of pretreated fiber contained 83.73% cellulose 92.33% holocellulose and 19.33% lignin. In fact, raw material before pretreatment contained 78.22% cellulose 97.78% holocellulose and 27.00% lignin. Then the morphology of treated and untreated fiber were brought to observe by Field Emission Scanning Electron Microscopy Analysis (FE-SEM). It found that there were significant differences in the fiber surface morphology for both treated and untreated oil palm empty fruit bunch. The untreated oil palm empty fruit bunch had a smooth surface while the pretreatment ones had a porous surface. In this study, the oil palm empty fruit bunch was converted into sugar by hydrolysis oil palm empty fruit bunch with 10 mg/ml cellulose from *Aspergillus niger* C-1184. With 30 g of pretreated oil palm empty fruit bunch, It took 12 hours to process which were able to convert into sugar 14088.33 $\mu\text{g/ml}$. In addition, the sugar was tested by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), it appeared to be glucose.

Keywords: Oil palm empty fruit bunch, Cellulase, FE-SEM, HPLC

บทนำ

ปาล์มเป็นพืชเศรษฐกิจในสามจังหวัดชายแดนใต้ โดยสำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดนราธิวาสได้เก็บรวบรวมข้อมูล จากหน่วยงานที่ส่งเสริมปลูกปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิภพทอสงฯ สถานีพัฒนาที่ดินนราธิวาสสหกรณ์นิคมปีเหล็ง และสหกรณ์นิคมบาเจาะสำนักงานเกษตรจังหวัดนราธิวาส สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางจังหวัดนราธิวาส มีเกษตรกรเจ้าของพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน จำนวน 4,124 ราย พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันแล้ว ทั้ง 43,842.38 ไร่ ให้ผลผลิตจังหวัดนราธิวาส 10,101.66 ไร่ จังหวัดปัตตานี 22,663 ไร่ 1 งาน จังหวัดยะลา 10,184 ไร่ รวมพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ 52,543 ไร่ 2 งาน และยังมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันที่อยู่ในความรับผิดชอบของกรมส่งเสริมสหกรณ์ จำนวน 35,000 ไร่ (Suwan, n.d.) จากทะลายปาล์มน้ำมันที่มีปริมาณมากหลังจากการนำไปผ่านกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นวัสดุเหลือใช้ นำไปใช้ประโยชน์โดยนำใช้คลุมดินในสวนปาล์ม รักษาความชื้นและเพิ่มเนื้อดิน นำมาใช้เพาะเห็ด (Subkaree, 2008) นอกจากนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรแล้ว ทะลายปาล์มจะมีองค์ประกอบของเซลลูโลส 44.20% เฮมิเซลลูโลส 44.20% และลิกนิน 20.40% (Law et al., 2007) จากองค์ประกอบของทะลายปาล์มที่มีปริมาณ



เซลลูโลสสามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากการผลิตเอทานอลจะใช้เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักโดยทำการแยกเซลลูโลสออกจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แล้วนำเซลลูโลสผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรด ค้างหรือเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส จากนั้นทำการหมักกลูโคสด้วยเชื้อยีสต์เพื่อเปลี่ยนให้เป็นเอทานอล ซึ่งขั้นตอนการแยกเซลลูโลสออกจากลิกนินและเฮมิเซลลูโลสทำการย่อยสลายเบื้องต้น (Pretreatment) ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคการระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) เข้ามาช่วยเพื่อให้โครงสร้างของเซลลูโลสที่ได้ภายหลังการระเบิดถูกย่อยได้ง่ายโดยเอนไซม์ (Punsuvon, Anpanurak, Vaithanomsat, & Tungkananuruk, 2005) นำน้ำตาลที่ได้นำมาหมักกับยีสต์เพื่อผลิตเป็นเอทานอล เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับทะลายปาล์มและเป็นการเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรชาวสวนปาล์มเนื่องจากว่าประเทศไทยผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยและแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชที่มนุษย์ใช้เป็นอาหาร ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น ทะลายปาล์มที่มีจำนวนมากและรวบรวมได้ง่ายจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจทำการย่อยสลายเบื้องต้น โดยใช้การระเบิดไอน้ำ (Steam Explosion) และเทคนิคการกำจัดลิกนินโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์สกัด เพื่อช่วยทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสที่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยทะลายปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ปริมาณทะลายปาล์ม และเวลา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการปรับสภาพกายภาพร่วมกับเคมีที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลจากทะลายปาล์มและวิเคราะห์องค์ประกอบของทะลายปาล์ม ได้แก่ ไฮโดรเซลลูโลส เซลลูโลสและลิกนิน
2. เพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM)/ชุดวิเคราะห์ธาตุ (EDS)
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยทะลายปาล์มด้วยเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ปริมาณปาล์ม เวลา
4. เพื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายทะลายปาล์มด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) และวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยทะลายปาล์มโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)



วิธีการวิจัย

1. การปรับสภาพปาล์ม

1.1 การเตรียมวัสดุชีวมวล

ตัดทะลายปาล์มที่นำมาจากสวนเป็นชิ้นเล็กๆ ออบให้แห้ง มาใช้เครื่องบด (Retsch) ขนาด 0.1 มิลลิเมตร ให้มีขนาดเล็กก่อนนำไปศึกษาการปรับสภาพเป็นปาล์มที่เรียกว่า “ทะลายปาล์มก่อนปรับสภาพ” นำไปหาปริมาณเซลลูโลส โฮโลเซลลูโลสและลิกนินและศึกษาลักษณะพื้นผิว

1.2 การปรับสภาพกายภาพร่วมกับเคมี

นำทะลายปาล์มที่นำมาจากสวนที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดมาแช่ในสารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) โดยใช้ทะลายปาล์ม 10 กรัม ต่อสารละลาย 150 มิลลิลิตร ตั้งเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปมาเช็ดด้วยหม้อหนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บาร์ 30 นาที คั้นกรองแยกส่วนที่เป็นกากของแข็งออกจากส่วนที่เป็นของเหลว ล้างกากของแข็งด้วยน้ำกลั่นจนมีสถานะเป็นกลาง นำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน จนน้ำหนักคงที่ จะได้ทะลายปาล์มที่เรียกว่า “ทะลายปาล์มปรับสภาพ” นำไปหาปริมาณเซลลูโลส โฮโลเซลลูโลสและลิกนิน

1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของปาล์ม

1.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโฮโลเซลลูโลสโดยวิธี Acid chlorite (Browning, 1963)

การวิเคราะห์ปริมาณโฮโลเซลลูโลส โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างทะลายปาล์มมา 3 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 160 มิลลิลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น (98%) 0.3 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ตามลำดับ ลงในขวดรูปชมพู่ หลังจากนั้นนำขวดรูปชมพู่ไปตั้งไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิประมาณ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดอย่างสม่ำเสมอ ครบ 1 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติก (98%) 0.3 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ลงในสารละลายที่อยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แล้วอุ่นต่อจนครบ 2 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติก 0.3 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม แล้วอุ่นต่อจนครบ 3 ชั่วโมง เติมกรดอะซิติก (98%) 0.3 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ครบชั่วโมงที่สี่ นำขวดรูปชมพู่มาวางในอ่างน้ำแข็งจนกระทั่งสารละลายในขวดรูปชมพู่มีอุณหภูมิ 10 ± 1 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรอง ล้างด้วยอะซิโตน นำมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 ± 5 องศาเซลเซียส (จนกว่าน้ำหนักจะคงที่) แล้วนำไปชั่ง นำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึก จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาค่าของเปอร์เซ็นต์โฮโลเซลลูโลส จากสมการ (1)

$$\% \text{โฮโลเซลลูโลส} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของโฮโลเซลลูโลสหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$



1.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสโดยวิธี TAPPI T203 om-88 (Punsuvon, n.d.)

การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ซึ่งตัวอย่างจากการวิเคราะห์ไฮโดรเซลลูโลส 1.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 17.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงไป ปรับอุณหภูมิของสารละลายให้อยู่ที่ 2.5 ± 0.2 องศาเซลเซียส พร้อมคนสารละลายจนกระทั่งเยื่อกระจายอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยให้ปริมาตรรวมของสารละลายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร คนสารละลายต่อเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วคนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและตามด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก นำมาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 ± 5 องศาเซลเซียส (จนกว่าน้ำหนักจะคงที่) แล้วนำไปชั่ง นำมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึก จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาค่าของเปอร์เซ็นต์เซลลูโลส จากสมการ (2)

$$\% \text{เซลลูโลส} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของเซลลูโลสหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

1.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินวิเคราะห์ตาม TAPPI T222 om-88 (Punsuvon, n.d.)

การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนิน โดยการนำตัวอย่างทะเลาะปาล์มที่ไม่ปรับสภาพและปรับสภาพมาอย่างละ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร นำบีกเกอร์ไปวางในอ่างน้ำแข็ง แล้วค่อย ๆ เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 72% ที่เย็น จำนวน 15 มิลลิลิตร คนสารละลายผสมกันให้ดีแล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกา หลังจากนั้นนำบีกเกอร์ใส่ใน อ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง คนทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้สารละลายผสมกันดี ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเทสารละลายในบีกเกอร์ลงในขวดก้นกลม พร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นจนถึงระดับ 135 มิลลิลิตร ที่ขีดไว้ข้างขวดก้นกลม ทำการ Reflux สารละลายนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นให้เทสารละลายในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง โดยให้ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน นำไปอบด้วยเตาเผาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นใน Dessicator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึก (A) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์ของลิกนิน จากสมการ (3)

$$\% \text{ลิกนิน} = \frac{\text{น้ำหนักของลิกนินหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

2. การวิเคราะห์ตัวอย่างก่อนและหลังการปรับสภาพ

การศึกษาลักษณะพื้นผิวของเส้นใยปาล์มก่อนและหลังการปรับสภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM) ยี่ห้อ FEI รุ่น Quanta 450 FEG / ชุดวิเคราะห์ธาตุ (EDS) ยี่ห้อ Oxford Instruments รุ่น X-Max 50 ถ่ายภาพในโหมด High Vacuum



3. การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (Chen, Zhao, & Xia, 2008)

3.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส

การนำปาล์มหลังปรับสภาพน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม เติม Citrate Buffer ความเข้มข้น 0.05 M (pH 4.8) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่ความเข้มข้น 0.10, 1.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใช้เป็นน้ำหนักต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเข้าเครื่องเซนติฟิวส์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS ความเข้มข้นเอนไซม์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.2 น้ำหนักของปาล์มที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส

การนำปาล์มหลังปรับสภาพให้มีน้ำหนัก 10, 20, 30, 40, 50 และ 1000 มิลลิกรัม เติม Citrate Buffer 0.05 M (pH 4.8) และเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่ความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้าด้วยกัน นำสารละลายที่ได้มาเข้าเครื่องเซนติฟิวส์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS ความเข้มข้นเอนไซม์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3 เวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส

การนำปาล์มปรับสภาพให้มีน้ำหนัก 30 มิลลิกรัม และเอนไซม์ที่ความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม Citrate Buffer 0.05 M (pH 4.8) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้าด้วยกัน เก็บเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้มาเซนติฟิวส์ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS ความเข้มข้นเอนไซม์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย 3,5-Dinitrosalicylic Acid (DNS) (Miller, 1959)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธี DNS ในขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานจะเตรียมสารมาตรฐานกลูโคสให้มีความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น ไปวิเคราะห์โดยใช้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับหลอด Blank ใช้น้ำกลั่นแทน เติมน้ำตาล DNS



1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยนำหลอดไปแช่ในน้ำแข็งที่ละลาย จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไปวิเคราะห์เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ผลจากการทดลองมาสร้างกราฟมาตรฐาน ส่วนตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5. การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้ HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

การนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 นำมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วย เครื่องมือทดสอบมีชื่อว่า Agilent 1200 (HPLC-Agro) โดยวิธีการทดสอบอ้างอิงถึง In-house method of WI-RES-HPLC-002 โดยเทคนิคการทดสอบจะเป็นเทคนิค Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography และใช้ Column เป็น Zorbax NH₂ 4.6*250 mm, 5 μ m โดยสภาวะการวิเคราะห์ในการทดสอบ มีดังนี้ Detector จะเป็นชนิด Refractive Index โดยจะ Injection ปริมาณ 20 μ L น้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับตัวอย่าง ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส

ผลการวิจัย

1. การปรับสภาพทะลายปาล์มด้วยกายภาพร่วมกับเคมี

การทดลองการปรับสภาพด้วยกายภาพร่วมกับเคมีโดยใช้สารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่มีความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส ไฮโดรเซลลูโลส และลิกนิน ทั้งก่อนและหลังการปรับสภาพ จากผลการทดลองดังตารางที่ 1 วิธีการปรับสภาพที่ดีที่สุด คือ การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะให้ปริมาณเซลลูโลส 83.73% เพราะมีปริมาณเซลลูโลสมากกว่าก่อนปรับสภาพ และช่วยลดปริมาณลิกนินให้น้อยลง เนื่องจากลิกนินจะเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ที่จะเข้าไปย่อยเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว นำผลการทดลองที่เหมาะสมไปใช้ในขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซิส

2. การศึกษาลักษณะพื้นผิวก่อนและหลังการปรับสภาพ

การศึกษาลักษณะพื้นผิวก่อนและหลังการปรับสภาพดูการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของทะลายปาล์มด้วยเครื่อง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งจากการดูพื้นผิวของตัวอย่างทะลายปาล์มก่อนปรับและหลังปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าก่อนการปรับสภาพลักษณะของตัวอย่าง

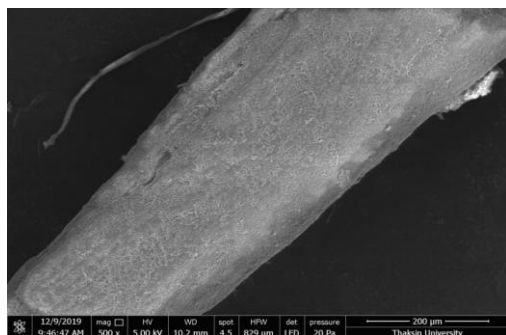


พื้นผิวจะเรียบ แต่พอผ่านการปรับสภาพลักษณะของพื้นผิวจะมีรูพรุน (ภาพที่ 1) เพื่อให้เอนไซม์สามารถที่จะเข้าถึงการย่อยเซลลูโลสได้มากยิ่งขึ้น เนื่องจากการใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกกลีโคเซลลูโลส การทำงานของด่างจะไปเพิ่มการพองตัวภายในโมเลกุลต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนินสามารถลดความเป็นโครงผลึกของเซลลูโลสลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต (Pawongrat, 2015)

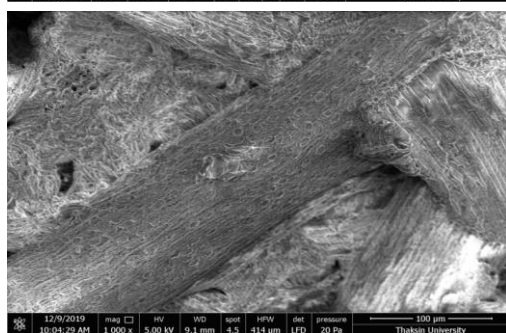
ตารางที่ 1 ผลของการศึกษาการปรับสภาพของทะลายปาล์ม

สารละลาย	ไฮโดรเซลลูโลส (%)	เซลลูโลส (%)	ลิกนิน (%)
ก่อนปรับสภาพ	97.78±0.19	78.22±1.02	27.00±1.00
NaOH	92.33±2.33	83.78±1.02	19.33±1.15
HCl	93.79±0.77	77.33±1.76	51.33±0.58
(NH ₄)SO ₂	85.44±1.35	70.00±0.67	28.00±1.00

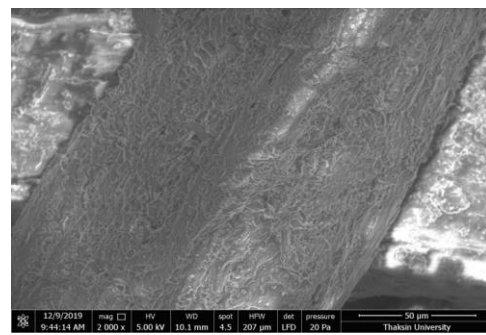
ก.



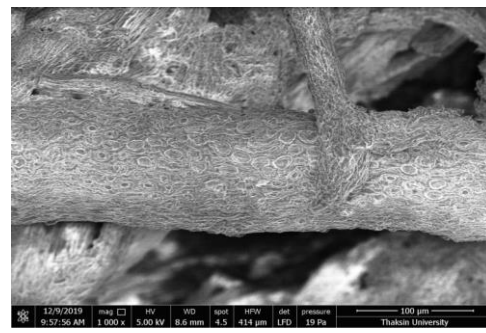
ค.



ข.



ง.



ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นผิวของทะลายปาล์มก่อนการปรับสภาพ กำลังขยาย 500 เท่า (ก) ลักษณะพื้นผิวของทะลายปาล์มก่อนการปรับสภาพ กำลังขยาย 2000 เท่า (ข) ลักษณะพื้นผิวของทะลายปาล์มหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำลังขยาย 500 เท่า (ค) ลักษณะพื้นผิวของทะลายปาล์มหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กำลังขยาย 1000 เท่า (ง)



3. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสจากทะลายปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่เหมาะสมต่อการย่อยทะลายปาล์ม

การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยนำปาล์มหลังปรับสภาพน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม เติม Citrate Buffer 0.05 M (pH 4.8) 20 มิลลิลิตร และเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่ความเข้มข้น 0.10, 1.00, 10.00 และ 20.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ใช้เป็นน้ำหนักต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเข้าเครื่องเซนติฟิวส์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS จากตารางที่ 2 ความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยปาล์มอยู่ที่ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 11856.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลทำให้เอนไซม์ละลายได้น้อยลง และทำให้เป็นการใช้เอนไซม์อย่างสิ้นเปลือง นำผลการทดลองที่ได้ไปใช้ต่อในการศึกษาหาน้ำหนักที่เหมาะสมในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่เหมาะสมต่อการย่อยทะลายปาล์ม

ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส จาก <i>Aspergillus niger</i> C-1184 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.10	137.83 ^b ±3.01
1.00	2036.67 ^b ±25.16
10.00	11856.67 ^a ±2378.87
20.00	-
F-test	**
C.V.(%)	29.367

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกัน ในสดมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.01$)



3.2 การศึกษาน้ำหนักทะลายปาล์มที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก

Aspergillus niger C-1184

การศึกษาน้ำหนักปาล์มที่เหมาะสม โดยนำปาล์มหลังปรับสภาพน้ำหนัก 10, 20, 30, 40, 50 และ 1000 มิลลิกรัม เติม Citrate Buffer 0.05 M (pH 4.8) และเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเข้าเครื่องเซนติฟิวส์ที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS จากตารางที่ 3 น้ำหนักที่เหมาะสมในการย่อยปาล์มเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่าง 30 มิลลิกรัม จะได้ปริมาณน้ำตาล 14170.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 น้ำหนักทะลายปาล์มที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184

ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส จาก <i>Aspergillus niger</i> C-1184 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
10.00	10	8886.67 ^c ±17.77
	20	13856.67 ^a ±13.86
	30	14170.00 ^a ±9.45
	40	13500.00 ^a ±6.75
	50	13656.67 ^a ±5.46
	1000	10776.67 ^b ±0.21
F-test		**
C.V.(%)		4.864

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ($P \leq 0.01$)

3.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184

การศึกษาวเวลาที่เหมาะสมโดยการนำปาล์มปรับสภาพน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม และเอนไซม์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม Citrate Buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 4.8) ปริมาตร 20



มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช้า 150 รอบต่อนาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้าด้วยกัน เก็บเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ นำสารละลายที่ได้มาเซนตริฟิวก์ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ได้สารละลายส่วนใส นำส่วนใสหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธี DNS จากตารางที่ 4 เวลาที่เหมาะสม ที่เวลาที่ 12 ชั่วโมง มีความเหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184 ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาล 14088.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองถัดไปการศึกษาปริมาณปาล์มที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184

ตารางที่ 4 เวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184

ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส จาก <i>Aspergillus niger</i> C-1184 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
10.00	12	14088.33 ^a ±9.39
	24	13520.00 ^a ±9.01
	36	13596.67 ^a ±9.06
	48	11876.67 ^{bc} ±7.92
	60	10776.67 ^c ±0.21
F-test		**
C.V.(%)		4.089

** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.01)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT (P ≤ 0.01)

4. ผลของสารมาตรฐานของกลูโคส

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยใช้ 3,5-Dinitrosalicylic Acid (DNS) โดยใช้สารมาตรฐานกลูโคส ผลของกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 2) ที่ได้เป็นดังตารางที่ 5

5. การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาล ด้วยเครื่อง HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

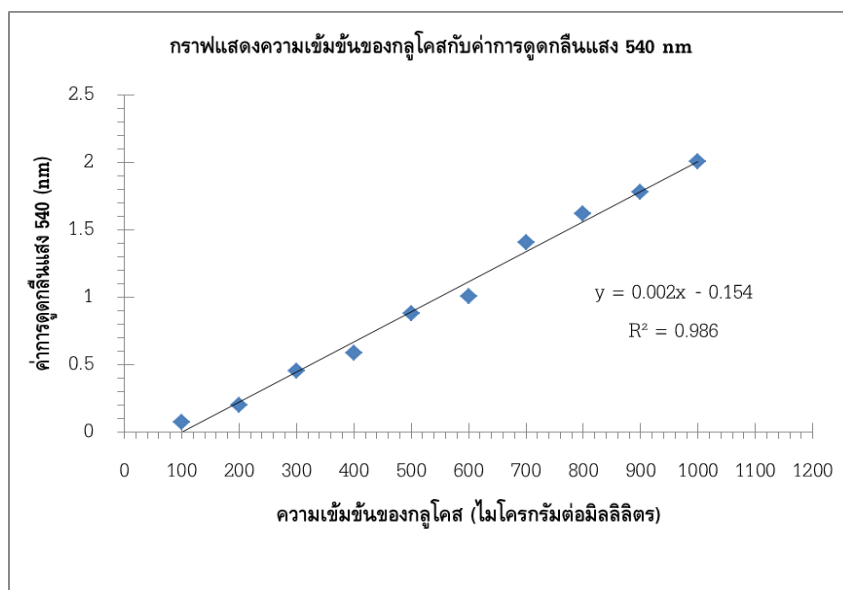
จากผลการทดลองวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) ผลปรากฏว่า ตัวอย่างปาล์มที่ผ่านการย่อยที่สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง น้ำหนัก



ตัวอย่างทะเลสาบปาล์ม 30 มิลลิกรัม ผลปรากฏว่าเมื่อมีการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 วิเคราะห์ด้วย HPLC เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน ดังภาพที่ 3 ผลที่ได้ของตัวอย่างมีการย่อยอย่างสมบูรณ์ได้น้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนที่ 540 นาโนเมตร

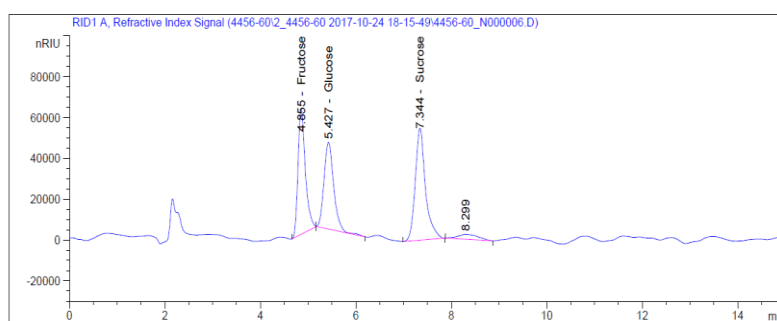
ความเข้มข้นสารมาตรฐานกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง 540 nm
100	0.073
200	0.2
300	0.454
400	0.588
500	0.877
600	1.005
700	1.404
800	1.62
900	1.775
1000	2.005



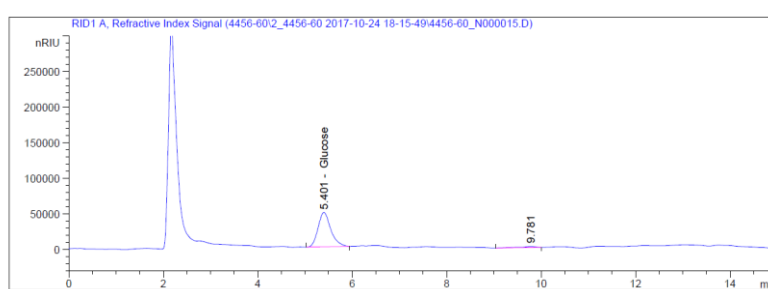
ภาพที่ 2 แสดงความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง 540 nm



ก.



ข.



ภาพที่ 3 ผลของมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลฟรุคโตส (ก)
การย่อยปาล์มที่เหมาะสมโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 (ข)

อภิปรายผล

1. การศึกษาการปรับสภาพของทลายปาล์ม

จากการทดลองหาวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมโดยวิธีเคมีฟิสิกส์ ได้แก่ การปรับสภาพโดยใช้สารละลาย 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมซัลเฟต กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเครื่องความดัน ใอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผลจากการทดลองวิธีที่ดีที่สุดคือ การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเครื่องความดันใอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาณเซลลูโลส 83.73% โสโกลเซลลูโลส 92.33% และลิกนิน 19.33% ซึ่งก่อนปรับสภาพจะมีปริมาณเซลลูโลส 78.22% โสโกลเซลลูโลส 97.78% และลิกนิน 27.00% เมื่อเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่าก่อนปรับสภาพจะมีเซลลูโลสแต่ลิกนินมาก หลังจากปรับสภาพจะมีปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ลิกนินมีค่าลดลง การนำตัวอย่างมาปรับสภาพก่อนเนื่องจากว่าโครงสร้างของตัวอย่างจะมีองค์ประกอบของลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส ซึ่งลิกนินที่มีปริมาณมากจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร (Kraisoraphong & Wongpanit, 2005) จึงต้องมีการปรับสภาพตัวอย่างก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ การใช้สารละลายต่างในการปรับสภาพ ต่างจะเป็นสารไปเพิ่มการฟองตัวภายใน



โมเลกุลภายในต่อสายพันธะภายในของโซลในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อกภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และสามารถแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างลิกนิน (Pawongrat, 2015) การใช้สารละลายกรดเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส (Niwaswong & Ruangviriyachai, 2012) การใช้เครื่องความดันไอน้ำ วัสดุจะถูกผสมกับไอน้ำอ้อมตัวที่ความดันสูง แล้วทำการลดความดันอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกิดการแยกเฮมิเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากกันที่อุณหภูมิสูง โดยส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะละลายในน้ำที่ควบแน่นจากไอน้ำ (Duff & Murray, 1996) งานของ Sugiharto et al. (2016) ทำการปรับสภาพทะลายปาล์มโดยใช้ 1.5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลา 30 นาที และใช้เครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ผลการทดลองที่ได้ปริมาณเซลลูโลส 68% เฮมิเซลลูโลส 13% และลิกนิน 9% ก่อนปรับสภาพมีเซลลูโลส 33% เฮมิเซลลูโลส 29% และลิกนิน 21% เห็นได้ชัดเจนว่าปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น เฮมิเซลลูโลสและลิกนินมีค่าลดลง ส่วนการใช้กรดความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้ผลผลิตกลูโคสสูง เพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา และย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส กับแยกลิกนินได้ดี แต่ส่งผลกระทบต่อด้านค่าใช้จ่ายและการจัดการต้องอยู่ภายใต้การควบคุม ทำให้เกิดสารพิษเจือปนสูง (Alvira, Tomas-Pejo, Ballesteros, & Nergro, 2010) นอกจากนี้ความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่ใช้เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดสารที่เป็นพิษ (McMillan, 1994)

2. การศึกษาพื้นผิวของตัวอย่างทะลายปาล์มก่อนและหลังการปรับสภาพ

จากการทดลองพบว่าลักษณะพื้นผิวของทะลายปาล์มก่อนปรับและหลังปรับจะมีลักษณะพื้นผิวที่ต่างกัน โดยหลังปรับสภาพพื้นผิวจะมีลักษณะที่ขรุขระ ลักษณะพื้นผิวตรงกับงานวิจัยของ (Latip, Sofian, Ail, Ismai & Idris, 2019) ได้ทำการทดลองการปรับสภาพโดยใช้สารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH), โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) และอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ (Al(OH)₃) ผลของพื้นผิวก่อนปรับและหลังปรับสภาพจะต่างกัน โดยที่ก่อนปรับสภาพพื้นผิวจะเรียบ เป็นชั้น ๆ ประกอบด้วยขี้ผึ้ง ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส เป็นตัวป้องกันไม่ให้เส้นใยแตก ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแยกพวกที่ป้องกันการแตกของเส้นใย ทำให้ลักษณะพื้นผิวมีลักษณะที่ขรุขระโดยที่เหมือนกันทั้งโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับสภาพโดยใช้สารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นสารละลายที่เหมาะสมแก่การปรับสภาพวัสดุเซลลูโลส สารละลายต่างทำให้



โครงสร้างผลึกของแอลฟา-เซลลูโลสวอมพองขึ้น เป็นลักษณะที่เอนไซม์เซลลูเลส สามารถทำงานย่อยได้ดี (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009) และมีข้อดีคือสามารถนำคุณสมบัติตรงนี้มาใช้ในการแยกส่วนลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกมาใช้ประโยชน์ เพื่อนำเข้ากระบวนการอื่น ๆ เช่น การตกตะกอนแยกลิกนินออกมามีด้วยกรด เพื่อใช้ในการผลิตสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ (Ramos, 2003)

3. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยทลายปาล์มให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาล

จากการทดลองนำตัวอย่างทลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ รวมกับความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มาหาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยสถานะที่เหมาะสมในการย่อยคือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่าง 30 กรัม ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาล 14088.33 ± 9.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้จากการทดลองจะแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงการย่อยได้เป็นน้ำตาลจะทำงานได้ดีกว่าการใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อการย่อยทลายปาล์มซึ่งอัตราเร็วของปฏิกิริยาคำนึงไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ ซึ่งในการทดลองได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่การละลายในบัฟเฟอร์ละลายได้น้อยลง จึงเลือกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของตัวอย่างมีผลต่อการทดลอง เนื่องเมื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้มากขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการเกิดปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่มีจุด ๆ หนึ่งที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของตัวอย่าง เพราะว่าถ้ามีปริมาณเอนไซม์มาก แต่สับสเตรทมีน้อยกว่า เอนไซม์ย่อยสลายเฉพาะที่มีสับสเตรท อีกทางหนึ่งถ้าความเข้มข้นเอนไซม์มีจำกัด แต่เพิ่มปริมาณสับสเตรทให้มีมากขึ้น เอนไซม์จะย่อยตามปริมาณที่มีสับสเตรท ส่วนเวลาในการย่อยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสับสเตรท ยิ่งถ้ามีปริมาณของสับสเตรทและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว เวลาในการย่อยในช่วงแรกอัตราจะเกิดได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อถึงสถานะหนึ่งจะเริ่มลดลงหรือคงที่ นอกจากนี้อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงมากกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า “ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (Optimum Temperature)” เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (Denaturation) หรืออยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* จะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kraisoraphong & Wongpanit, 2005)



4. การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง ด้วยเครื่อง HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

จากการทดสอบชนิดของน้ำตาลที่ได้จากย่อยสลายทลายปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* C-1184 ซึ่งเห็นได้ชัดเจน ได้น้ำตาลกลูโคส แสดงว่าการย่อยสลายทลายปาล์ม ที่ความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลส 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณทลายปาล์ม 30 มิลลิกรัม เวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ HPLC จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส เนื่องจากเซลลูเลสที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จะเป็นกลูโคส เพราะเซลลูเลสจะประกอบด้วยกลูโคสเพียงชนิดเดียวต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ดังนั้น เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* C-1184 ผลผลิตสุดท้ายที่ได้จะเป็นกลูโคส ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามทฤษฎี

สรุป

จากการทดลองหาวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมโดยวิธีเคมีฟิสิกส์ ผลจากการทดลองวิธีที่ดีที่สุด คือ การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ร่วมกับเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาณเซลลูโลส 83.73% ไฮโดรเซลลูโลส 92.33% และลิกนิน 19.33% ซึ่งก่อนปรับสภาพจะมีปริมาณเซลลูโลส 78.22% ไฮโดรเซลลูโลส 97.78% และลิกนิน 27.00% การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยคือ ใช้เอนไซม์เซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักตัวอย่าง 30 มิลลิกรัม ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาล 14088.33 ± 9.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบชนิดของน้ำตาล เครื่อง HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) เนื่องจากผลจากการวิเคราะห์ HPLC จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส

ข้อเสนอแนะ

1. การนำวิจัยไปต่อยอดในการผลิตเอทานอลและต่อยอดการผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งทางการเกษตร
2. การศึกษาการปรับสภาพที่ทำให้ได้ปริมาณเซลลูโลสได้มากที่สุด เนื่องจากเป็นแหล่งของน้ำตาล
3. การศึกษาวัดเชิงปริมาณของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดเซลลูโลสจากทะลายปาล์มได้ทราบถึงกระบวนการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ทำงานได้ดี
4. การวิเคราะห์ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยเครื่องมืออื่น ๆ



รายการอ้างอิง (References)

- Alvira, P.E. Tomas-Pejo., Ballesteros, M. & Nergro M.J. (2010). Pretreatment technology for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101: 4851-4861.
- Browing, B.L. (1963). *Method in wood chemistry*, pp.389-407. Interscience Publishers, New York, London
- Chen, M., Zhao, J., & Xia, L., (2008). Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers*, 71, 411-415.
- Law, K. N., Daud, W. R. W., & Ghazali, A. (2007). Morphological and chemical nature of fiberstrands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). *BioResources* 2 (3), 351-362.
- Latip, N.A., Sofian, A.H., Ail, M.F., Ismail, S.N. & Idris, D.M.N.D. (2019). Structural and morphological studies on alkaline pre-treatment of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) fiber for composite production. *Materials Today: Proceedings*, 17, 1105-1111.
- Kraisoraphong.C & Wongpanit.S. (2005). *Ethanol production from agricultural waste and Agricultural industry*. Defence Energy Department & Loxley Public Company Limited.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729
- McMillan, J.D., (1994). *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426-428.
- Niwaswong. C. & Ruangviriyachai. C. (2012). Production of Cellulosic Ethanol in Thailand. *KKU Sci. J.* 40(4). 1073-1088.
- Romos, L. P. (2003). The chemical involved in the steam treatment of lignocellulosic material. *Quimica Nova*, 26(6), 863-871.
- Pawongrat. R. (2015). Pretreatment processes for enhancing the efficiency of ethanol production from lignocellulosic agricultural wastes. *Veridian E-Journal SU*. 4(1), 891-901.



- Punsuvon, V., Anpanurak, W., Vaithanomsat, P. & Tungkananuruk, N. (2005). *Fraction of Chemical Components of Oil Palm Trunk by Steam Explosion*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 18-20 October 2005.
- Punsuvon, V., (Eds) *Chemical Component Determination of Non Wood Raw Material for Pulp and Paper Industry*, Final Report, The Research Project for Higher Utilization of Forestry and Agricultural Plant Materials in Thailand (HUFA)
- Subkaree, Y. 2008. Saccharification and fermentation (SSF) optimal condition for ethanol production from palm pressed fiber using simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Master Thesis, Prince of Songkla University, (In Thai)
- Sugiharto, Y. E. C., Harimawan, A., Kresnowati, M.T.A.P, Purwadi, R., Mariyana, R, Andry, Fitriana, H.N., & Hosen, H. F. (2016). Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. *Bioresource technology*. 207: 175-179.
- Suwan. S. (N.D.). Oil Palm. Energy. Chooose. Retrieved January 20, 2015, from https://www2.moac.go.th/ewt_dl_link.php?nid=6694