การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกลูโคสจากใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกภายใต้การให้ความร้อนที่มีกรรมวิธีที่แตกต่าง

Ionic liquid pretreatment of pineapple leaves under different heating methods for enhanced glucose production

มานิตา กัณฑภา[1*], สุเมธ ชมภูธวัช[1], ดำรงศักดิ์ อาลัย[2], เก้ากันยา สุดประเสริฐ[3], จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ[4] และธีรวัฒน์ อ่อนลมูล[1]

Manita Kuntapa[1*], Sumate Chomphutawach[1], Damrongsak Arlai[2], Kaokanya Sudaprasert[3], Chakrit Tachaapaikoon[4] and Theerawat Onlamool[1]

Received: 4 April 2025 ; **Revised**: 26 September 2025 ; **Accepted**: 29 October 2025

บทคัดย่อ

ของเหลวไอออนิกชนิด 1-เมทิล-3-อิมิดาโซเลียมอะซิเตต ([EMIM]OAc) เป็นของเหลวที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมที่นิยมใช้ในการปรับสภาพชีวมวล ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพชีวมวลด้วยของเหลวไอออนิก ([EMIM]OAc) จึงมีความจำเป็นที่ได้รับการพัฒนา โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแยกเซลลูโลสให้มีความบริสุทธิ์สูง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยใช้เตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน จากการทดลองพบว่าใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิก [EMIM]OAc โดยการให้ความร้อนจากไมโครเวฟสามารถกำจัดลิกนินได้มากกว่า ใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย [EMIM]OAc จากเตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อน 0.98 และ 2.25 เท่าตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการปรับสภาพใบสับปะรดจาก

ของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) ด้วยวิธีการให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างพื้นผิวจากการวิเคราะห์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) มีลักษณะทางพื้นผิวที่มีความเป็นรูพรุนของผลึกที่มากกว่าใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) โดยการให้ความร้อนโดยเตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อนสอดคล้องกับผลการพิจารณาลักษณะทางกายภาพด้วยเทคนิคการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction; XRD) ที่แสดงค่าความเป็นผลึก (crystallinity index; CI) ของใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (25.82 ± 0.03 CI value) น้อยกว่าใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) จากการให้ความร้อนโดยเตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อน (28.51 ± 0.01 และ 31.29 ± 0.05 CI value) ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์พบว่าใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟค่าร้อยละ 98.06 ± 0.10 การคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลส (Cellulose conversion) มากกว่า ร้อยละ 80.01 ± 0.05 และ 63.92 ± 0.13 การคำนวณกลับของเซลลูโลสของใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย ([EMIM]OAc) โดยการให้ความร้อนจากเตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อนอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: ของเหลวไอออนิก, ใบสับปะรด, ปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ, การกำจัดลิกนิน, การย่อยด้วยเอนไซม์

---

[1] สาขาวิชาเกษตรอินทรีย์และการจัดการฟาร์มอัจฉริยะ, วิทยาลัยนวัตกรรมอาหารและอุตสาหกรรมบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

[2] ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

[3] สาขาวิชาเทคโนโลยีพลังงาน, คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

[4] สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

[1] Organic Agriculture and Smart Farm Management, College of Food and Hospitality Innovation, Phetchaburi Rajabhat University,

[2] Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University

[3] Energy Technology Program, School of Energy, Environment and Materials, King Mongkut's University of Technology Thonburi

[4] Pilot Plant Development and Training Institute, King Mongkut's University of Technology Thonburi

* Corresponding author: Manita Kuntapa, Email: manita.kun@mail.pbru.ac.th

Abstract

Pineapple leaves, an abundant agricultural residue, are rich in lignocellulosic biomass but limited in bioconversion efficiency due to their high lignin content and crystalline cellulose. This study investigated the pretreatment of pineapple leaves using the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([EMIM]OAc) under different heating systems, including a hot air oven, microwave, and hot plate, at 90°C for 3 hours. The results demonstrated that microwave-assisted pretreatment achieved the highest delignification, reducing residual lignin more effectively than the hot air oven and hot plate methods. Scanning electron microscopy (SEM) revealed a more porous surface morphology after microwave pretreatment, while XRD indicated a significantly lower crystallinity index (22.78 ± 0.03) compared with the hot air oven (27.09 ± 0.10) and hot plate (32.98 ± 0.15). Furthermore, enzymatic hydrolysis of the microwave-pretreated sample resulted in a cellulose-to-glucose conversion yield of 98.06 ± 0.10%, markedly higher than that of the hot air oven (80.01 ± 0.05%) and hot plate (63.92 ± 0.13%). No formation of HMF was detected under any condition, suggesting that the pretreatment was effective without generating inhibitory byproducts. These findings indicate that microwave-assisted ionic liquid pretreatment is a superior strategy for enhancing glucose recovery from pineapple leaves, offering a promising approach for sustainable biofuel and biochemical production.

Keywords: Ionic liquid, pineapple leaves, microwave pretreatment, delignification, enzymatic hydrolysis

บทนำ

วัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ชีวมวล (Biomass) ประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) โดยลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) (Sindhu *et al*., 2016) ในปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีปริมาณมากในชุมชน ด้วยเหตุนี้กระบวนการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสจึงมีความจำเป็น โดยกระบวนการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่มีความสำคัญคือกระบวนการปรับสภาพ (Pretreatment) (Zhang *et al*., 2014; Sun *et al*., 2013) โดยกระบวนการปรับสภาพในปัจจุบันที่ได้รับความนิยมคือกระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ของเหลวไอออนิก ชนิด 1-เมทิล-3-เอทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต [EMIM]OAc ที่มีศักยภาพในการกำจัดลิกนินสูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าชีวมวลที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ที่สามารถกำจัดลิกนินได้ดีที่สุดและไม่ก่อให้เกิดตัวยับยั้งการเกิดน้ำตาลกลูโคส เช่น 5-hydroxy methyl-2-furaldehyde (HMF) นอกจากนี้ระหว่างกระบวนการปรับสภาพเป็นกระบวนการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกโนเซลลูโลส และช่วยเพิ่มพื้นที่ และความพรุน (Amorphous) ให้กับลิกโนเซลลูโลสหลังการปรับสภาพชีวมวลด้วยของเหลวไอออนิก (Saini *et al*., 2019; Fernandez *et al*., 2011; da Costa Lopes *et al*., 2018) ซึ่งทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงและย่อยสลาย (Hydrolysis) วัสดุได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้เซลลูโลสถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส (Glucose sugar) (วรวุฒิ จุพาลักษณานุกูล, 2558; สุขสันต์ อมรรักษา และแอ๊ปเปิ้ล แจ่มจำรัส, 2556) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตชีวเชื้อเพลิง ดังนั้นในการศึกษาชนิดของเครื่องมือที่ใช้ในการให้ความร้อนในการปรับสภาพชีวมวลและคัดเลือกกระบวนการการปรับสภาพชีวมวลที่เหมาะสม ในการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรอย่างมาก (Mai *et al*., 2012)

ใบสับปะรดเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่หาง่าย พบได้ในพื้นที่ภาคตะวันตก ในชุมชนเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ของประเทศไทย ส่วนใหญ่ใบสับปะรดถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารสัตว์ และใช้ในงานหัตถกรรมและคหกรรม ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด ([EMIM]OAc) มาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคส ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Kuntapa *et al*., 2022; Mai *et al*., 2012; Ha *et al*., 2011) โดยเครื่องมือให้ความร้อนชนิด เตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อนซึ่งนับเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ในแง่ของการนำไปใช้เพื่อผลิตน้ำตาลกลูโคสสำหรับกระบวนการผลิตชีวเชื้อเพลิงให้มีศักยภาพต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์การทดลอง

1.1 ใบสับปะรดปัตตาเวีย

ใบสับปะรดปัตตาเวียซึ่งเก็บจากไร่ของโครงการในพระราชประสงค์ดอนขุนห้วย อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี นำใบสับปะรด มาหั่นหรือตัดให้มีขนาดเล็กแล้วนำมาทำให้แห้งโดยนำมาตากแดด และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดและกรองผ่านตาข่ายเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.4 มิลลิเมตรและเก็บในตู้ดูดความชื้น

1.2 ของเหลวไอออนิกชนิด1-เมทิล-3-เอทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต

ของเหลวไอออนิกชนิด 1-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตตเข้มข้นร้อยละ 98 โดยมวล (1-Methyl-3-Ethyimidasolium Acetate; [EMIM]OAc)

1.3 กรดซัลฟิวริก

กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 97 โดยมวล

1.4 เอนไซม์ชนิดเซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase; Novozyme NS220086, Copenhagen, Denmark)

1.5 เอนไซม์ชนิดเบต้ากลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase; Novozyme NS221118) ซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)

2. วิธีการทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) เพื่อศึกษาผลของวิธีการให้ความร้อนต่อประสิทธิภาพการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต ([EMIM]OAc) การทดลองประกอบด้วย 4 กลุ่ม ได้แก่ ใบสับปะรดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (untreated) และใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย [EMIM]OAc โดยใช้เตาอบลมร้อน (hot air oven) ไมโครเวฟ (microwave) และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน (hot plate) เป็นวิธีการให้ความร้อน โดยแต่ละกลุ่มการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ (n = 3) การทดลองใช้สภาวะการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และศึกษาค่าตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ลักษณะโครงสร้างพื้นผิวของชีวมวล ค่าความเป็นผลึก (crystallinity index; CI) ร้อยละการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นกลูโคส (cellulose conversion) และการเกิดสารยับยั้ง 5-hydroxymethylfurfural (HMF) โดยรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ในแต่ละตัวแปรแสดงในหัวข้อต่อไปนี้

2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบสับปะรด

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชีวมวลใบสับปะรด โดยนำตัวอย่างใบสับปะรดบดมาย่อยด้วยกรด H_2SO_4 ความเข้มข้น 72 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ก่อนเจือจางด้วยน้ำ DI จนกระทั่งความเข้มข้นของ H_2SO_4 เป็นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดปริมาณของกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC 20A) (Shimadzu Co. Ltd., Japan) ที่ตรวจวัดผ่านกระบวนการหักเหของแสงด้วยเครื่อง RI detector (RID-10A; Hitachi Co. Ltd., Japan) โดยใช้คอลัมน์ Biorad Aminex HPX-87P column เป็นเฟสหยุดนิ่ง และเฟสเคลื่อนที่เป็นกรด H_2SO_4 เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ที่มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินตามวิธีของ National Renewable Energy Laboratory (NREL) protocol (Sluiter *et al*., 2008)

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต ([EMIM]OAc)

2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc ด้วยสภาวะที่แตกต่างกันโดยอ้างอิงวิธีจาก Kuntapa *et al*. (2022) โดยนำผงใบสับปะรดที่ผ่านการบดละเอียดปริมาณ 1,250 มิลลิกกรัมใส่ลงใน 8,500 มิลลิกรัมของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc เข้มข้นร้อยละ 50 โดยมวลของสารละลายผสมระหว่าง [EMIM]OAc และน้ำกลั่น (Deionized water; DI water) และให้ความร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ด้วยเตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน นาน 3 ชั่วโมง กรองส่วนของแข็งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศพร้อมทั้งล้างส่วนของแข็ง ด้วยน้ำ DI จำนวน 10 ครั้ง แล้วจึงนำส่วนของแข็งมาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (Memmert UF 100, Germany) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งตัวอย่างที่ได้จะนำไปวิเคราะห์โครงสร้างพื้นผิวเซลลูโลส และลิกนินต่อไป ตามวิธีการของ NREL protocol (Sluiter *et al*., 2008: Fukushima & Kerley, 2011) และคำนวณองค์ประกอบของเซลลูโลสตามสมการที่ (1)

Cellulose composition (%) = [Glucose released (mg) / Amount of raw material before pretreatment (mg)] × 10 (1)

หมายเหตุ Cellulose composition แสดงถึงองค์ประกอบของเซลลูโลส Glucose released แสดงถึงกลูโคสที่ถูกปลดปล่อย และ Amount of raw material before pretreatment แสดงถึงปริมาณใบสับปะรดก่อนการปรับสภาพ

2.2.2 การศึกษาโครงสร้างพื้นผิวของตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

นำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยการใช้ความร้อนด้วยเตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อนมาวิเคราะห์โครงสร้างพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning electron microscopy, FET, Nova Nano SEM450,USA) โดยตรวจจับสัณญาณภาพที่ความต่างศักย์ 50 กิโลโวลต์ (kV) และกำลังขยาย 1000X

2.2.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพด้วยเทคนิคการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ (X-ray diffraction; XRD)

นำตัวอย่างมาตรวจวัดลักษณะทางกายภาพด้วยเทคนิคการกระเจิงรังสีเอ็กซ์ (XRD; D8 Advanced, Bruker AXS Co. Ltd.,Germany) ในช่วงการสแกน 5-40 ที่ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ (kV) และความเร็วในการสแกน 2 นาที$^{-1}$ โดยคำนวณค่าความเป็นผลึก (Crystallinity Index; CI) ดังแสดงในสมการที่ (2) (Hurtubise & Krassig, 1960)

ค่าความเป็นผลึก (CI (%)) = (I(200) – I(am))/(I(200)) x 100 (2)

หมายเหตุ I(200) และ I(am) แสดงถึงความเป็นผลึก (2θ = 22.5°) และแสดงถึงความเป็นสัณฐาน (มีความเป็นรูพรุน) (2θ = 18.1°) ของตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ตามลำดับ

2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส

นำตัวอย่างจำนวน 300 มิลลิกรัม (mg) มาใส่ลงในเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้น 10 FPU/กรัม ของเซลลูโลส (Novozyme NS220086, Copenhagen, Denmark) และเอนไซม์ 1,4-เบต้ากลูโคซิเดตเข้มข้น 10 CBU/กรัม ของเซลลูโลส (Novozyme NS221118) ปริมาตรรวม 30 มิลลิลิตร (mL) หลังจากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (pH = 4.8) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่ เป็นเวลา 24 48 72 ชั่วโมง นำไปวางไว้ในน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ แล้วนำไปตรวจวัดกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC ที่ตรวจวัดผ่านกระบวนการหักเหของแสง RI detector (RID-10A; Hitachi Co. Ltd., Japan) โดยใช้คอลัมน์ Biorad Aminex HPX-87P column เป็นเฟสหยุดนิ่ง และเฟสเคลื่อนที่เป็นกรด H_2SO_4 เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ที่มีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และคำนวณหาร้อยละการคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลสดังสมการที่ (3)

Cellulose conversion (%) = Glucose released (mg) × Anhydrous factor (0.9) / Cellulose loading (mg) × 100 (3)

หมายเหตุ Cellulose conversion แสดงถึงร้อยละการคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลส Glucose released แสดงถึงกลูโคสที่ถูกปลดปล่อย Anhydrous factor แสดงถึงปัจจัยของการปราศจากน้ำหรือค่าความบริสุทธิ์ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อย และ Cellulose loading แสดงถึงเซลลูโลสที่โหลด

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มาตรวจวัดตัวยับยั้งการเกิดน้ำตาลกลูโคสชนิด 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-(hydroxymethyl)furfural; HMF) ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Supelcogel C-610H column เป็นเฟสหยุดนิ่ง และเฟสเคลื่อนที่เป็นกรด H_2SO_4 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วคำนวณหาร้อยละการคำนวณร้อยละผลผลิตของ HMF ดังสมการที่ (4) (Fermandez *et al*., 2011):

HMF yield (%) = Total HMF in pretreatment hydrolysate× 1.286 / Total cellulose in untreated corn cobs × 100 (4)

หมายเหตุ HMF yield แสดงถึงร้อยละผลลัพธ์ของ HMF Total HMF in pretreatment hydrolysate แสดงถึง HMF ทั้งหมดในการกระบวนการปรับสภาพใบสับปะรดและย่อยสลาย และ Total cellulose in untreated corn cobs แสดงถึงเซลลูโลสที่ทั้งหมดที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพใบสับปะรด

2.2.5 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. องค์ประกอบหลักทางเคมี

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมีของใบสับปะรด (Table 1) พบว่า ใบสับปะรดมีเซลลูโลสร้อยละ 34.67±0.11 เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณที่มากที่สุด รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 32.52±0.08 ลิกนินร้อยละ 21.82±0.10 และองค์ประกอบอื่น 10.99±0.07 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kuntapa *et al*. (2022) ที่รายงานว่าชีวมวลซังข้าวโพดมีเซลลูโลส (ร้อยละ 37.46±0.05 ของเซลลูโลส) เป็นองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณที่สูงมากกว่าเฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 36.32±0.02 ของเฮมิเซลลูโลส) และลิกนิน (ร้อยละ 19.18±0.13 ของลิกนิน) ในขณะที่พบลิกนินในปริมาณมากเมื่อเทียบกับเปลือกข้าวโพดและกาบมะพร้าวในงานวิจัยของแก้วกัลยา โสตถิสวัสดิ์ และคณะ (2562) และ Zhand *et al*. (2014)แต่อย่างไรก็ตามการที่วัตถุดิบเหล่านี้มีลิกนินในปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการเข้าถึงของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเซลลูโลสเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาวที่ประกอบด้วยน้ำตาล D-Glucose (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดหนึ่งในการใช้วัตถุดิบที่อุดมไปด้วยเซลลูโลสไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นในการพิจารณาเลือกใช้เครื่องมือในการเพิ่มอุณหภูมิในการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc จึงมีความจำเป็นสำหรับใช้ในการปรับสภาพชีวมวลใบสับปะรดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพเพื่อแยกเซลลูโลสให้มีความบริสุทธิ์สูงสำหรับย่อยสลายด้วยเอนไซม์

Table 1 Chemical composition of pineapple leaves

Chemical composition	Percentage of composition
Cellulose	34.67±0.11
Hemicellulose	32.52±0.08
Total lignin	21.82±0.10
Insoluble lignin	16.89±0.05
Soluble lignin	4.93±0.02
Ash	10.99±0.07

2. สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเต ([EMIM]OAc)

การปรับสภาพชีวมวลด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ใช้ในการกำจัดลิกนินได้มากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณลิกนินทั้งหมดในชีวมวล (Kuntapa *et al*., 2021) ด้วยเหตุนี้การปรับสภาพโดยการใช้ของเหลวไอออนิกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จึงได้ถูกนำมาใช้ในการปรับสภาพใบสับปะรดในงานวิจัยนโดยการใช้เครื่องมือในการให้ความร้อนในการปรับสภาพชนิด เตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน จาก Table 2 พบว่าปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จากการปรับสภาพทั้ง 3 วิธีมีค่าใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีการให้ความร้อนชนิดเตาอบลมร้อนให้ค่าลิกนินสูงสุด (ร้อยละ 8.57±0.03 ของลิกนิน) และไมโครเวฟ (ร้อยละ 7.19±0.02 ปริมาณลิกนิน) ซึ่งแตกต่างจากวิธีการใช้เตาไฟฟ้าเพลตร้อน (ร้อยละ 15.03±0.11 ของลิกนิน) อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องมาจากการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc ด้วยเครื่องมือเตาอบลมร้อนและไมโครเวฟอยู่ในสภาวะระบบปิดส่งผลให้ความร้อนระหว่างการปรับสภาพใบสับปะรดในระบบไม่มีการสูญเสียไปกับสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้ระหว่างการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc การสะสมความร้อนในการปรับสภาพมีค่าคงที่ลิกนินในส่วนของของแข็งลดลงจากการเกิดการละลายในส่วนของของเหลว

Table 2 Chemical composition of pineapple leaves pretreated with [EMIM]OAc at 90°C for 3 h using a hot air oven, microwave, or hot plate. Values are presented as mean ± SD. Different superscript letters within the same column indicate significant differences among pretreatment methods at $p < 0.05$.

Pretreatment method	Chemical composition			
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Ash
Untreated	34.67±0.11[a]	32.52±0.08[a]	21.82±0.10[a]	10.99±0.07[a]
Hot air oven	30.53±0.05[b]	28.75±0.03[b]	8.57±0.03[c]	14.07±0.05[b]
Microwave	30.76±0.08[b]	28.95±0.15[b]	7.19±0.02[c]	14.13±0.10[b]
Hot plate	30.57±0.10[b]	28.83±0.05[b]	15.03±0.11[b]	13.97±0.08[b]

3. ลักษณะทางกายภาพของใบสับปะรดที่ปรับสภาพด้วย ของเหลวไอออนิกชนิด 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต ([EMIM]OAc)

จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพด้วย SEM ดัง Figure 1 ของตัวอย่างใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยใช้ไมโครเวฟในการให้ความร้อน มีลักษณะทางสัณฐานมีความพรุน (Amorphous) ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิก ชนิด [EMIM]OAc อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงโดยใช้เตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อนมีความเป็นผลึก (Crystalline) ให้ความร้อน ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการพิจารณาค่าความเป็นผลึก (Crystalline Index)

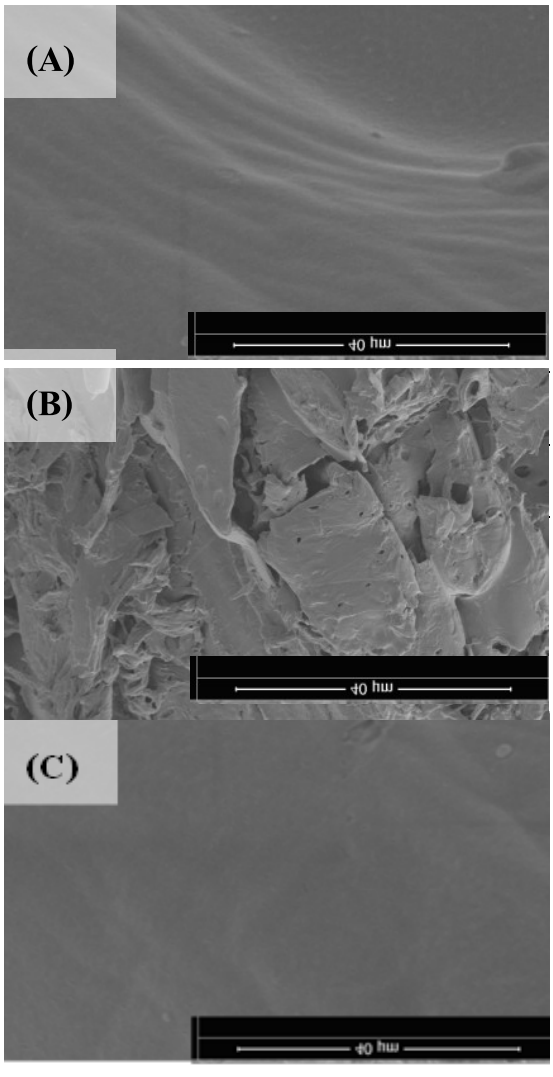


Figure 1 The structure analysis by SEM at 1000X at 90°C for 3 hours; (A) Pineapple leave pretreated with [EMIM]OAc of temperature heated up with hot air oven, (B) Pineapple leave pretreated with [EMIM]OAc of temperature heated up with microwave and (C) Pineapple leave pretreated with [EMIM]OAc of temperature heated up with hot plate.

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค XRD ดัง Table 3 พบว่าวิธีการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยใช้การให้ความด้วยไมโครเวฟมีความเป็นผลึก (32.98± 0.15 CI value) น้อยกว่าในกรณีปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยใช้การให้ความร้อนด้วยเตาอบลมร้อน (27.09±0.10 CI value) และเตาไฟฟ้าเพลตสูง (22.78±0.03 CI value) เนื่องมาจากระหว่างการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นการให้ความร้อนโดยการปล่อยรังสีไมโครเวฟที่ใช้คลื่นความถี่สูงในการทำให้วัตถุเกิดความร้อนจากการสั่นสะเทือน ส่งผลให้ใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (Fernaṅdez *et al*., 2011) จากการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟมีความเป็นรูพรุนส่งผลให้กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถย่อยได้ง่ายขึ้น (Kuntapa *et al*., 2021; Kuntapa *et al*., 2022)

Table 3 The Crystallinity index (CI value) of pineapple leaf pretreatment with [EMIM]OAc at 90°C for 3 hours of temperature heated up with hot air oven, microwave, and hot plate, Values are presented as mean ± SD (n = 3). Different lowercase letters within the column indicate significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Pretreatment method	Crystallinity index (CI value)
Untreated	37.33 ± 0.08[a]
Hot air oven	27.09±0.10[b]
Microwave	22.78±0.03[c]
Hot plate	32.98±0.15[ab]

ชีวมวลสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้ด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับ 1,4- เบต้ากลูโคซิเดต (Ha *et al*., 2011; Sun *et al*., 2013) จาก Figure 2 หลังจากย่อยใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc และเพิ่มอุณหภูมิโดยเตาอบลมร้อน (ร้อยละ 80.01±0.05 การคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลส) ไมโครเวฟ (ร้อยละ 98.06 ± 0.10 การคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลส) และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน (ร้อยละ 63.92 ± 0.13 การคำนวณกลับของเซลลูโลส) ที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับ 1,4-เบต้ากลูโคซิเดตพบว่าร้อยละการคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลสที่เวลา 48 ชั่วโมง

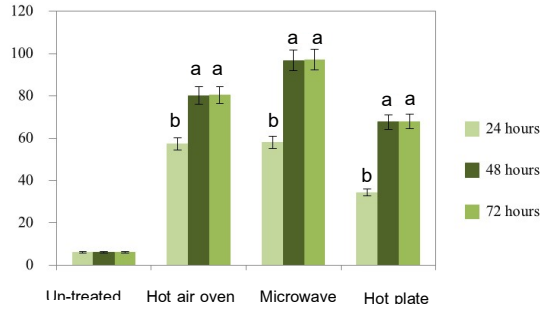


Figure 2 Cellulose conversion (%) following enzymatic hydrolysis with cellulase (10 FPU/g cellulose) and 1,4-β-glucosidase (10 CBU/g cellulose) for 24, 48, and 72 h after [EMIM]OAc pretreatment of pineapple leaves using a hot-air oven, microwave, and hot plate. Values are presented as mean ± SD (n = 3). For each pretreatment method, means at different hydrolysis times were analyzed separately using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. Different lowercase letters indicate significant differences among hydrolysis times ($p < 0.05$).

มีค่าร้อยละการคำนวณย้อนกลับของเซลลูโลสมากกว่ากรณีใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้การให้ความร้อนด้วยเตาอบลมร้อน (ร้อยละ 57.33 ± 0.07 การคำนวณกลับของเซลลูโลส) ไมโครเวฟ (ร้อยละ 58.02 ± 0.05 การคำนวณกลับของเซลลูโลส) และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน (ร้อยละ 34.51 ± 0.10 การคำนวณกลับของเซลลูโลส) ที่ทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เมื่อทำการย่อยสลายใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยใช้เตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อน นาน 48 ชั่วโมง มีค่าร้อยละการคำนวณกลับของเซลลูโลสใกล้เคียงกับการย่อยสลายด้วย

เอนไซม์นาน 72 ชั่วโมง โดยกรณีใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยใช้เตาอบลมร้อนมีค่าเซลลูโลสร้อยละ 80.18 ± 0.09 ไมโครเวฟมีค่าเซลลูโลสร้อยละ 96.76 ± 0.11 และเตาไฟฟ้าเพลตสูงมีค่าเซลลูโลส ร้อยละ 64.05 ± 0.03 ดังนั้นระยะเวลาที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและ 1,4-เบต้ากลูโคซิเดตคือระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด ดัง Figure 3

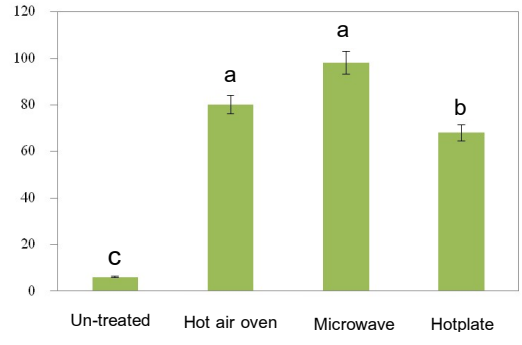


Figure 3 Cellulose conversion (%) after enzymatic hydrolysis with cellulase (10 FPU/g cellulose) and 1,4-beta-glucosidase (10 CBU/g cellulose) for 48 h following [EMIM]OAc pretreatment of pineapple leaves using a hot air oven, microwave, and hot plate. Values are presented as mean ± SD (n = 3). Different lowercase letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

พบว่าเมื่อพิจารณาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและ1,4- เบต้ากลูโคซิเดสนาน 48 ชั่วโมงของใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิก [EMIM]OAc ที่ใช้ไมโครเวฟในการให้ความร้อนมีค่าร้อยละ 98.06 ± 0.10 การคำนวณกลับของเซลลูโลสมากกว่า ร้อยละ 80.01 ± 0.05 การคำนวณกลับของเซลลูโลสจากใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยใช้เตาอบลมร้อนในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ และร้อยละ 63.92 ± 0.13 การคำนวณกลับของเซลลูโลสจากใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยใช้เตาไฟฟ้าเพลตร้อนในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการเกิดผลผลิตของ HMF หลังจากการผ่านย่อยสลายด้วยเอนไซม์นาน 48 ชั่วโมงของใบสับปะรดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc ที่ใช้เครื่องมือชนิดเตาอบลมร้อน ไมโครเวฟ และเตาไฟฟ้าเพลตร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ HMF ได้ สะท้อนให้เห็นว่าจากการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกชนิด [EMIM]OAc โดยใช้เครื่องมือไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงคือสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้ในกระบวนการพัฒนาการผลิตชีวเชื้อเพลิงต่อไป เนื่องจากสภาวะดังกล่าวมีร้อยละการคำนวณกลับของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 90 อีกทั้งสารยับยั้งการผลิตน้ำตาลกลูโคสชนิด HMF ไม่สามารถถูกผลิตได้เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพมีอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 120 องศาเซลเซียส (Sindhu *et al*., 2016)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ใบสับปะรดมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณที่มากที่สุด รองลงมาคือเฮมิเซลลูโลส และลิกนินตามลำดับ จากการปรับสภาพใบสับปะรดด้วยของเหลวไอออนิกชนิด 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเตต ([EMIM]OAc) โดยการใช้เครื่องมือชนิดไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงคือวิธีที่ดีที่สุดในการใช้เป็นวิธีผลิตกลูโคสสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตชีวเชื้อเพลิงต่อไป เนื่องจากการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) และเทคนิคการกระเจิงของรังสีเอ็กซ์ (XRD) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถเขาไปทำลายโครงสร้างผลึกของลิกโนเซลลูโลสให้เกิดความพรุน (Amorphous) สูง อีกทั้งวิธีดังกล่าวมีความสามารถในการกำจัดลิกนิน และย่อยสลายเซลลูโลสเป็นกลูโคสด้วยเครื่องมือชนิดเตาอบลมร้อนและเตาไฟฟ้าเพลตร้อน และไม่พบสารยับยั้งการเกิดน้ำตาลกลูโคสชนิด 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-Hydroxy methylfurfural, HMF)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ทุนสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 ภายใต้รหัสโครงการ FRB660073/0164 (แผนงาน พลังงานสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน) และทุนสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ วิทยาลัยอาหารและอุตสาหกรรมบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี วิทยาลัยนวัตกรรมอาหารและอุตสาหกรรมบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี และสายวิชาเทคโนโลยีพลังงาน คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และสถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ (สรบ.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

แก้วกัลยา โสตถิสวัสดิ์, อรสา จันทร์ลือชัย, และรัศมี คะมุง. (2562). การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและกาบมะพร้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ [Pretreatment of corn husk and coconut husk to enhance reducing sugar yield]. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, 9*(1), 1–9.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส [Pretreatment processes for enhancing ethanol production efficiency from lignocellulosic agricultural residues]. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 2*(1), 143–157.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. (2558). *เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ* [Biofuel by biocatalyst]. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุขสันต์ อมรรักษา, และแอ๊ปเปิ้ล แจ่มจำรัส. (2556). การประยุกต์ใช้ไมโครเวฟไพโรไลซิสสำหรับอุตสาหกรรมปิโตรเคมี [Application of microwave pyrolysis for the petrochemical industry]. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 23*(2), 480–488.

da Costa Lopes, A. M., Lins, R. M., Rebelo, R. A., & Lukasik, R. M. (2018). Biorefinery approach for lignocellulosic biomass valorisation with an acidic ionic liquid. *Green Chemistry, 20*, 4043–4057.

Fernaṅdez, Y., Arenillas, A., & Menéndez, J. A. (2011). *Microwave heating applied to pyrolysis*. In Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials (pp. 723–752). InTech.

Fukushima, R. S., & Kerley, M. S. (2011). Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*, 3505–3509.

Ha, S. H., Mai, N. L., An, G., & Koo, Y. M. (2011). Microwave-assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology, 102*, 1214–1219.

Hurtubise, F. G., & Krassig, H. (1960). Classification of fine structural characteristics in cellulose by infrared spectroscopy. Use of potassium bromide pellet technique. *Analytical Chemistry, 32*, 177–181.

Kuntapa, M., Sudapraseart, K., & Tachaapaikoon, C. (2021). Pretreatment of corn cobs using 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and dimethyl sulfoxide to enhance enzymatic saccharification. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–12.

Kuntapa, M., Sudapraseart, K., & Tachaapaikoon, C. (2022). Effects on delignification of reusing 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and dimethyl sulfoxide in the pretreatment of corn cob for the enhancement of enzymatic hydrolysis in ethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–14.

Mai, N. L., Nguyen, N. T., Kim, J. I., Park, H. M., Lee, S. K., & Koo, Y. M. (2012). Recovery of ionic liquid and sugars from hydrolyzed biomass using ion exclusion simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A, 1227*, 67–72.

Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2019). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: Concepts and recent developments. *Science and Technology RMUTT Journal, 9*(1), 9.

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass — An overview. *Bioresource Technology, 199*, 76–82.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass* (NREL/TP-510-42618). National Renewable Energy Laboratory.

Sun, Y. C., Xu, J. K., Xu, F., & Sun, R. C. (2013). Structural comparison and enhanced enzymatic hydrolysis of eucalyptus cellulose via pretreatment with different ionic liquids and catalysts. *Process Biochemistry, 48,* 844–852.

Zhang, J., Feng, L., Wang, D., Zhang, R., Liu, G., & Cheng, G. (2014). Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. *Bioresource Technology, 153*, 379–382.