

การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง
เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม



นายศักยะ สมบัติไพรวรรณ

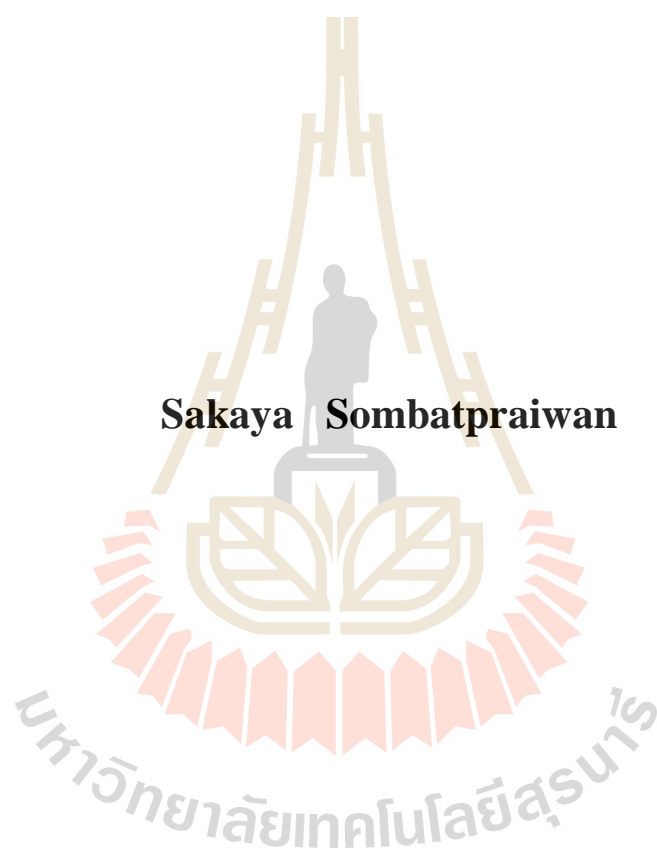
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตรและอาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2562

**MICROWAVE-ASSISTED ALKALI PRETREATMENT
OF CASSAVA RHIZOME FOR PRODUCING
VALUE-ADDED PRODUCTS**



Sakaya Sombatpraiwan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy in Agricultural and Food Engineering**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2019

การปรับสภาพเหง้ามันปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง
เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาคุุณชีพัฒนัตติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร. พงศ์ศักดิ์ จุลยุเสนา)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร. ธีราพร จุลยุเสนา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)




(ผศ. ดร. เทวรัตน์ ศรีอำนรรค)

กรรมการ



(รศ. ดร. อภิชาติ บุญทาวัน)

กรรมการ




(ผศ. ดร. วีรชัย อองหาญ)

กรรมการ



(ผศ. ดร. วันรัฐ อับดุลลาคาซิม)

กรรมการ




(ผศ. ดร. พรรษา ลิบลับ)

กรรมการ



(รศ. ร.อ. ดร. กนต์ธร ชำนิประศาสน์)

คณบดีสำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์



(ศ. ดร. สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

ศักยะ สมบัติไพรวิน : การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม (MICROWAVE-ASSISTED ALKALI PRETREATMENT OF CASSAVA RHIZOME FOR PRODUCING VALUE-ADDED PRODUCTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีราพร จุลยุเสน, 201 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะเหมาะสมในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (MAP) เพื่อเพิ่มผลิตภาพกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH) โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนองและออกแบบการทดลอง Box-Behnken ปัจจัยในการปรับสภาพได้แก่ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1 , 300-900 W), เวลา (X_2 , 5-15 min), และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH (X_3 , 3-7% w/v) พบว่าสภาวะเหมาะสมที่สุดมีค่า X_1 , X_2 , X_3 เท่ากับ 840 W, 9 min, 3% ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ทางสถิติและตรวจสอบความเพียงพอ (adequate) ของแบบจำลอง เมื่อทำการ EnH 24 h ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการพยากรณ์และการทดลองมีค่า 15.39 และ 15.82 g/100g เหง้ามันสำปะหลังเริ่มต้นมวลแห้ง (NCR DM.) ตามลำดับ เมื่อ EnH เป็นเวลา 48 h ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการพยากรณ์และการทดลองมีค่า 16.40 และ 16.95 g/100 g NCR DM. ตามลำดับ บ่งชี้ถึงความสามารถในการพยากรณ์ที่ดีของแบบจำลอง การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ-เคมี ชี้ให้เห็นว่าการ MAP มีประสิทธิภาพในการเพิ่มเข้าถึงของเอนไซม์และเพิ่มผลิตกลูโคส

นอกจากนี้ได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพ-เคมีของตะกอนลิกนิน (MAPL) จาก black liquor ที่ได้จากการ MAP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับลิกนินจาก black liquor ที่ได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีการดั้งเดิม (CPL: 40°C, 1 h, 10% w/v NaOH) พบว่าน้ำหนักแห้งของ MAPL และ CPL มีค่า $1.60 \pm 0.25\%$ และ $0.67 \pm 0.01\%$ เทียบกับ NCR DM. ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของ MAPL และ CPL มีค่า 171.87 ± 11.35 และ 65.47 ± 2.29 mg GAE/g lignin คิดเป็น 98.64 และ 37.86% ของ TPC ของลิกนินมาตรฐาน (STDL) ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ($DPPH_{AA}$) ของ MAPL และ CPL มีค่า 267.32 ± 1.68 และ 146.23 ± 16.09 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 86.00 และ 47.05% ของ $DPPH_{AA}$ ของ STDL ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ($ABTS_{AA}$) ของ MAPL และ CPL มีค่า 545.56 ± 2.76 และ 173.29 ± 5.53 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 80.67 และ 25.63% ของ $ABTS_{AA}$ ของ STDL ตามลำดับ ผลสเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ (^{13}C - 1H NMR) แสดงตำแหน่งยอดคลื่นของ MAPL สอดคล้องตำแหน่งของ CPL กล่าวคือพบโมโนลิกนอลของทั้ง H, G และ S unit และสเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ MAPL แสดงสัญญาณในช่วงของหมู่โรรมาติกมาก สมเหตุสมผลกับ STDL อันทำให้ได้ค่า TPC และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงได้กับ

SAKAYA SOMBATPRAIWAN : MICROWAVE-ASSISTED ALKALI
PRETREATMENT OF CASSAVA RHIZOME FOR PRODUCING VALUE-
ADDED PRODUCTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TIRAPORN
JUNYUSEN, Ph.D., 201 PP.

CASSAVA RHIZOME/LIGNOCELLULOSIC PRETREATMENT/MICROWAVE-
ASSISTED ALKALI/RSM/LIGNIN

This research deals with the optimization of microwave-assisted alkali pretreatment (MAP) of cassava rhizome (CR) using response surface methodology with Box-Behnken design to enhance the post-enzymatic hydrolysis glucose yield. The pretreatment parameters included microwave power (X_1 , 300-900 W), irradiation time (X_2 , 5-15 min), and NaOH concentration (X_3 , 3-7% w/v); and the enzymatic hydrolysis (EnH) was 24 and 48 h. The statistical analysis was performed and the results validated the adequacy of the predictive models. The optimal MAP condition X_1 , X_2 , X_3 was 840 W, 9 min, and 3% w/v, respectively. Under the optimal condition, the predicted and experimental glucose yields were 15.39 and 15.82 g/100 g initial dry matter native cassava rhizome (NCR DM.) for 24 h EnH, and 16.40 and 16.95 g/100 g initial NCR DM. for 48 h EnH, indicating good agreement. The study also investigated the effect of MAP on the physical characteristics and morphology of NCR and pretreated CR. The results indicated the significant structural changes in the pretreated CR, suggesting that MAP effectively enhanced enzymatic accessibility and glucose yields.

In addition, lignin (MAPL) was obtained by precipitating from optimum pretreated black liquor. The physicochemical properties of MAPL were compared with lignin obtained from conventional pretreated black liquor (CPL: 40°C, 1 h, 10% w/v NaOH). The results showed that recovery of MAPL and CPL were $1.60 \pm 0.25\%$ and $0.67 \pm 0.01\%$ base on NCR DM, respectively. The total phenolic content (TPC) of MAPL and CPL were 171.87 ± 11.35 and 65.47 ± 2.29 mg GAE/g lignin, respectively. These values were accounted to 98.64 and 37.86% of standard lignin (STDL). The DPPH antiradical activity (DPPH_{AA}) of MAPL and CPL were 267.32 ± 1.68 and 146.23 ± 16.09 mg TEAC/g lignin, respectively (86.00 and 47.05% relative to DPPH_{AA} of STDL). The ABTS antiradical activity (ABTS_{AA}) of MAPL and CPL were 545.56 ± 2.76 and 173.29 ± 5.53 mg TEAC/g lignin, respectively (80.67 and 25.63% relative to ABTS_{AA} of STDL). ¹³C-¹H NMR spectra of MAPL corresponded with CPL revealing the chemical shifts of H, G, and S monolignol units. The ¹³C-¹H NMR analysis indicated aromatic region of MAPL were in good agreement with those of STDL. The findings thus indicated that the optimal MAP of lignocelluloses can be effectively used for glucose and lignin as value-added productions.

School of Agricultural Engineering

Academic Year 2019

Student's Signature Sakanya S.

Advisor's Signature D. T.

Co-advisor's Signature Dr. N. S.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้อุปการะและความสะดวกสบายตลอดการศึกษา, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ประสานงานโดยมี ศ.ดร.ประสาท สืบคำ ในฐานะประธานศูนย์ สอวน. มทส. 2546 เป็นอาทิ ฯ ในการครั้งนั้นทำให้ข้าพเจ้าสนใจเข้าศึกษาในมหาวิทยาลัยแห่งนี้ ได้เข้าศึกษาและอยู่ร่วมสมัยการพัฒนามหาวิทยาลัยตลอดมา กระทั่งสำเร็จการศึกษาคณะนี้ ผศ.ดร.ธีราพร จุลยุเสนา และ ผศ.ดร.เทวรัตน์ ตรีอำนรรค อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ร่วมอ่านและตรวจวารสารวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์ อ่าน ตรวจ และทำการสอบวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผศ.ดร.วีรชัย ออาจหาญ รองอธิการบดีฝ่ายทรัพย์สินและวิสาหกิจฯ ที่ได้กรุณาสละเวลางานบริหารมาร่วมเป็นกรรมการสอบข้าพเจ้า และ ผศ.ดร.วันรัฐ อับดุลลาภาซิม กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, คุณกรรณิกา ประเสริฐสังข์ เลขานุการสาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร คุณนวลปรารถน์ อุทัยดา และคุณสมยศ พิมพ์พร ทั้งคณะเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ฯ 3 และ 10-11, ผศ.ดร.ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง และคุณนงคราญ ไชยวงศ์ ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, คุณศรัลย์ ปานศรีพงษ์ และพี่ๆ ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านชีวมวล, เทคโนโลยี-คุณ Phan Van Man ที่ได้แนะนำแนวคิดและเทคโนโลยีการศึกษาของ นศ.บัณฑิตต่างประเทศ คุณฉวีพร ชัชวาลชาติ และพี่น้องสาขาวิชาวิศวกรรมเกษตรฯ, Shibaura Institute of Technology ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้ริเริ่มและสนับสนุนการสัมมนาและความร่วมมือทางวิชาการของกลุ่มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (SEATUC), ขาดเสียมิได้คือทุกท่านที่เป็นเจ้าของงานวิจัยที่ข้าพเจ้าอ้างอิงถึง ซึ่งแต่ละท่านก็อ้างวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทั้งที่ใคร่ครวญ ตรวจสอบ ได้มาด้วยตนเองและที่ได้จากการเรียนรู้วิชาการก่อนๆ ถอยลำดับลงไปอีกๆ โดยทุกท่านเหล่านั้นก็ยังมีผู้อุปการะต่อความวัฒนา-วิวัฒนาการศึกษาและเทคโนโลยีของตนในประวัติศาสตร์อารยธรรมของมนุษยชาติสืบเนื่องกันมาโดยลำดับ หากกล่าวเชิงปรัชญาสังคมอาจกล่าวได้ว่าไม่มีผู้ใดจะไม่เกี่ยวข้องกับผู้ใด หรืองานใดที่เป็นอิสระอย่างสิ้นเชิงจากงานใด ด้วยเหตุนี้ ถ้าจะกล่าวให้ถูกต้องก็พึงกล่าวว่า ขอขอบคุณทุกๆ ตามความสืบเนื่องแห่งอุปการะที่ทุกท่านมีแก่งานวิจัยฉบับนี้ และที่มีส่วนร่วมสร้างเทคโนโลยีที่มีมาก่อนนี้และที่จะมีต่อไป เพื่อความสวัสดิและเจริญวัฒนาของโลก

ศักยะ สมบัติไพรวรรณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ด
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.6 รายการอ้างอิง.....	6
2 ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	7
2.2 ลิกโนเซลลูโลส.....	8
2.2.1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส	9
2.2.2 การใช้ประโยชน์ลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....	11
2.3 เหง้ามันสำปะหลัง	12
2.4 คลื่นไมโครเวฟและวัสดุไดอิเล็กทริก	14
2.4.1 คลื่นไมโครเวฟ.....	14
2.4.2 สมบัติไดอิเล็กทริกของวัสดุ	15
2.5 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส	16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.1	วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส	17
2.5.2	การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่าง	18
2.5.3	การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับ สารละลายต่าง	22
2.6	การตกตะกอนลิกนินและการนำไปใช้ประโยชน์	40
2.6.1	การตกตะกอนลิกนิน	40
2.6.2	การนำลิกนินไปใช้ประโยชน์	42
2.6.3	ความสามารถของลิกนินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	45
	1) อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	45
	2) การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระ	47
	3) สมบัติของลิกนินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	52
2.7	วิธีการฟื้นผิวตอบสนอง	55
2.8	การออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน	57
2.9	รายการอ้างอิง	59
3	การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง เพื่อเพิ่มผลึกภาพกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	
3.1	บทคัดย่อ	75
3.2	บทนำ	76
3.3	วัตถุประสงค์	78
3.4	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	78
3.4.1	การเตรียมวัสดุ	78
3.4.2	การหาค่าประกอบเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ	79
3.4.3	การปรับสภาพโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง	79
3.4.4	การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์	80
3.4.5	การออกแบบการทดลอง	82
3.4.6	การวิเคราะห์ทางสถิติและตรวจสอบแบบจำลอง	83

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.7	การศึกษาลักษณะทางกายภาพ-เคมี	83
3.4.7.1	โครงสร้างจุลภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องกราด	83
3.4.7.2	พื้นที่ผิวจำเพาะ, ปริมาตรช่องว่างทั้งหมดในโครงสร้าง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางช่องว่างในโครงสร้าง	84
3.4.7.3	การวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์	86
3.4.7.4	การวิเคราะห์ FTIR	87
3.4.7.5	การวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน	87
3.5	ผลการทดลองและวิจารณ์	87
3.5.1	องค์ประกอบทางเคมีของเหง้ามันสำปะหลัง	87
3.5.2	ผลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณผลผลิตกลูโคส	88
3.5.3	ค่าเหมาะสมที่สุดของสภาวะการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง โดย MAP และการตรวจสอบแบบจำลอง	94
3.5.4	ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ-เคมี	108
3.5.4.1	การวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	108
3.5.4.2	ผลการวิเคราะห์พื้นที่ผิวและรูพรุน	110
3.5.4.3	ผลการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์	111
3.5.4.4	ผลการวิเคราะห์ FTIR	113
3.5.4.5	ผลการวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน	116
3.6	สรุปผลการทดลอง	118
3.7	ข้อเสนอแนะ	119
3.8	ส่วนขยาย	119
3.9	รายการอ้างอิง	120
4	สมบัติทางกายภาพ-เคมีของลิกนินจากเหง้ามันสำปะหลังจากการปรับสภาพด้วยต่าง ร่วมกับไมโครเวฟและวิธีการดั้งเดิม	
4.1	บทคัดย่อ	129
4.2	บทนำ	130

สารบัญ (ต่อ)

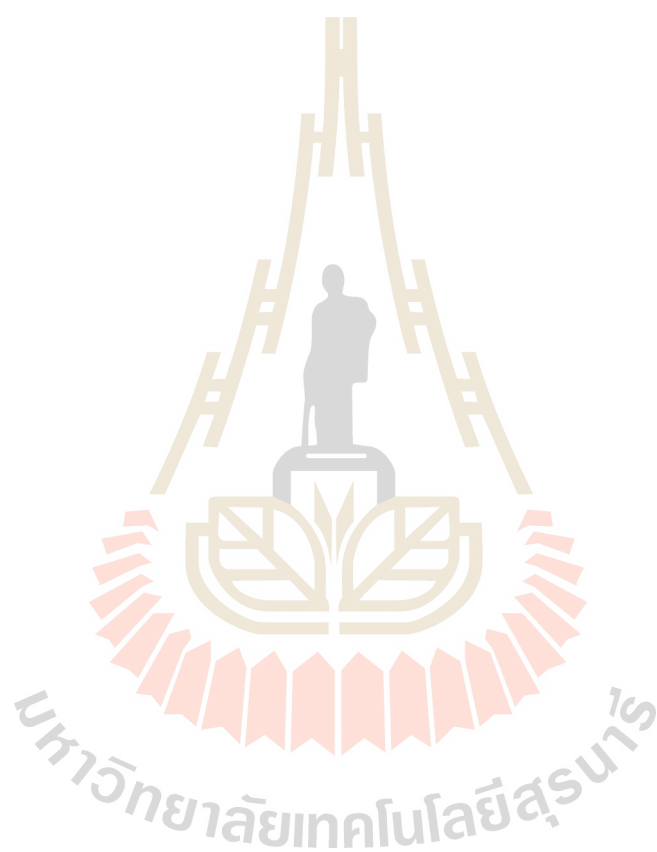
หน้า

4.3	วัตถุประสงค์.....	131
4.4	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	131
4.4.1	วิธีการสกัดลิกนิน.....	132
4.4.2	การวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (FESEM).....	132
4.4.3	การวิเคราะห์ FTIR.....	133
4.4.4	การวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน	133
4.4.5	การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติความเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ.....	133
4.4.6	การวิเคราะห์ NMR.....	134
4.5	ผลการทดลองและวิจารณ์.....	135
4.5.1	ลิกนินที่สกัดได้.....	135
4.5.2	ผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้อง FESEM	136
4.5.3	ผลการวิเคราะห์ FTIR	141
4.5.4	ผลการวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน	147
4.4.5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติความเป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระ.....	149
4.4.5.1	Total phenolic content.....	149
4.4.5.2	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS.....	151
4.5.6	ผลการวิเคราะห์ NMR.....	154
4.5.6.1	H1-NMR	154
4.5.6.2	C13-NMR	155
4.5.6.3	HSQC-NMR.....	158
4.6	สรุปผลการทดลอง	165
4.7	ข้อเสนอแนะ.....	166
4.8	รายการอ้างอิง.....	166
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	178
5.1	สรุปผลการทดลอง	178

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 ข้อเสนอแนะ.....	179
ภาคผนวก ข้อมูลอ้างอิงประกอบการพิจารณาคุณสมบัติของลิกนิน	181
ประวัติผู้เขียน	201



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ข้อมูลประเมินศักยภาพการใช้ประโยชน์วัสดุชีวมวลแต่ละชนิดปีการเพาะปลูก 2556.....7
2.2	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแสดงค่าเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง.....9
2.3	อัตราส่วนโมโนลิกนอลในพืช.....11
2.4	องค์ประกอบของไม้ 2 ชนิดที่มีได้ปรับสภาพและปรับสภาพ20
2.5	น้ำหนักฟางข้าวที่ลดลงหลังผ่านการปรับสภาพในขั้นตอนต่างๆ27
2.6	ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละกรรมวิธีปรับสภาพ29
2.7	การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด/ด่างโดยใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมกับ การให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ30
2.8	องค์ประกอบในของแข็งคงเหลือหลังจากผ่านการปรับสภาพด้วย MAP34
2.9	ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของลิกนิน44
2.10	ปริมาณฟีนอลทั้งหมดในผักและผลไม้46
2.11	TPC และปริมาณ TAC% DPPH ของลิกนิน54
2.12	แผนการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน 3 ตัวแปรอิสระ58
3.1	ระดับค่าตัวแปรอิสระที่ใช้ทดลอง83
3.2	ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของ NCR DM.....88
3.3	ร้อยละของปริมาณของแข็งคงเหลือ, ร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือและ ร้อยละของปริมาณลิกนินที่สามารถจัดได้ เทียบกับ NCR DM89
3.4	ร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือเทียบโดยมวลของเหง้ามันในแต่ละสภาวะ การปรับสภาพและปริมาณเหง้ามันที่ใช้ในการ EnH90
3.5	ร้อยละของปริมาณกลูแคนที่ถูก EnH ที่เวลา 24 และ 48 h91
3.6	ความดันและอุณหภูมิสูงสุดในหลอดปฏิกรณ์ไมโครเวฟ.....92
3.7	ผลผลิตเป็นกรัมของกลูโคสที่ได้จาก NCR 100 g ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพ เมื่อผ่านการ Enz ที่เวลา 24, 48 h.....93
3.8	แบบจำลองพหุนามกำลังสองเต็มรูปแบบและค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย.....96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองปริมาณกลูโคสที่ได้จากการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h โดยใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์	97
3.10 ค่าที่ได้จากการทดลอง-พยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อนเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์	98
3.11 ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการที่ได้จากการ EnH OPCR จากการทดลองและการพยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน เมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์	99
3.12 แบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ทำการปรับปรุงแล้ว โดยนำพจน์ที่ไม่มีนัยสำคัญออก และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย	100
3.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองปริมาณกลูโคสที่ได้จากการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h ที่ปรับปรุงแล้ว	101
3.14 ค่าที่ได้จากการทดลอง การพยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน เมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้ว	103
3.15 ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการที่ได้จากการ EnH OPCR จากการทดลองและการพยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน เมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้ว	107
3.16 ค่าคุณสมบัติแห้งมันสำปะหลัง OPCR และสภาวะความดัน-อุณหภูมิในหลอดปฏิบัติการไมโครเวฟ	108
3.17 ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ ปริมาตรรูพรุนรวม และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน	110
3.18 ค่าดัชนีความเป็นผลึกในรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องและงานวิจัยนี้	113
3.19 ตำแหน่งการสั่นสะเทือน FTIR ระหว่างพันธะภายในโมเลกุล	115
3.20 ค่าอุณหภูมิเมื่อ NCR และ PCR สลายตัว 10, 20 and 50% โดยน้ำหนัก	117
4.1 หมู่ฟังก์ชันหรือสารประกอบที่ FTIR สามารถตรวจวัดได้	144
4.2 อุณหภูมิขณะที่ลิกนินทั้ง 3 ชนิด สลายตัวไป 10, 20, และ 50% โดยน้ำหนัก	147
4.3 ร้อยละของมวลคงเหลือที่อุณหภูมิ 800 และ 1000°C	148
4.4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของลิกนินทั้ง 3 ชนิด	149
4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนินโดยรีดิคัล DPPH และ ABTS ในหน่วย mg TEAC/g lignin	151

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนินโดยรีดิคัล DPPH และ ABTS ในหน่วย $\mu\text{M TEAC/g lignin}$	152
4.7 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ ลิกนิน MAPL และ CPL เมื่อเทียบกับลิกนินมาตรฐาน STDL เป็นร้อยละ.....	153
4.8 สรุปองค์ประกอบลิกนินที่ HSQC NMR สามารถระบุได้.....	163
ก4.1 ลิกนินจากงานของ An et al. (2017) สำหรับวิจารณ์ STDL MAPL และ CPL.....	183
ก4.2 ช่วงสเปกตรัมและตำแหน่งของสารที่ตอบสนองต่อ $^1\text{H-NMR}$ (An et al., 2017)	184
ก4.3 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 174.5 ppm	184
ก4.4 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 152.1 ppm	184
ก4.5 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 150-145 ppm	185
ก4.6 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 130-127 ppm	185
ก4.7 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 120-118 ppm.....	186
ก4.8 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 116-114 ppm.....	186
ก4.9 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 112-110 ppm.....	187
ก4.10 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 104-103 ppm.....	187
ก4.11 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 73-70 ppm.....	188
ก4.12 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 60.5-59.5 ppm.....	188
ก4.13 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 56.5-55.0 ppm.....	189
ก4.14 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 35-21 ppm.....	189
ก4.15 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน STDL	189
ก4.16 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL	190
ก4.17 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน CPL.....	191
ก4.18 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน STDL และ MAPL	192
ก4.19 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL และ CPL.....	193
ก4.20 องค์ประกอบที่สามารถพบได้ในลิกนินทั้ง STDL, MAPL และ CPL	197

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	องค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส 8
2.2	กลูโคสต่อกันยาวเป็นสายโซ่เซลลูโลส..... 9
2.3	เส้นทางการสังเคราะห์ลิกนิน 10
2.4	มหโมเลกุลลิกนิน 11
2.5	การผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากวัตถุดิบประเภทต่างๆ 12
2.6	แนวคิดการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสให้เป็นพลังงานและผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม 13
2.7	สเปกตรัมคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า..... 14
2.8	โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็วตรงข้ามทิศทางของสนามไฟฟ้า..... 15
2.9	การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายต่าง..... 17
2.10	ผลการปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง..... 21
2.11	ปริมาณมีเทนสะสมที่ได้จากไม้สนที่ปรับ/ไม่ได้ปรับสภาพ 22
2.12	เปรียบเทียบอุณหภูมิพื้นผิวเมื่อให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ..... 24
2.13	ฟางข้าวสาลีเมื่อปรับสภาพด้วยสารละลายต่างด้วยวิธีการดั้งเดิมกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ..... 26
2.14	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เมื่อทำการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟกับสารละลายต่าง..... 29
2.15	ภาพถ่าย SEM หนู่าสวิตซกราสส์ที่ปรับ-ไม่ปรับสภาพ 31
2.16	ผิวตอแสดงผลจากงานของ Ma et al. (2008) 33
2.17	ผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟด้วยสารละลายต่าง-กรด..... 34
2.18	การจัดลิกนินและไฮโดรเซลลูโลสเมื่อให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมกับการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ 35
2.19	พื้นผิวตอผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์..... 36
2.20	อัตราส่วนของแข็งที่เหลือเมื่อปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ..... 37

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.21 การปรับสภาพไม้มันในสารละลายต่างด้วยวิธีการใช้ความร้อนวิธีการดั้งเดิมกับการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ	38
2.22 ผลผลิตจากการไฮโดรไลซิสหญ้าที่ผ่านการปรับ-ไม่ปรับ สภาพเบื้องต้น	39
2.23 Cryo-SEM ของเสี้ยนจากอุตสาหกรรมผลสับประดเมื่อปรับสภาพคลื่นไมโครเวฟ	40
2.24 ผลพลอยได้ลิกนินจากกระบวนการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ	41
2.25 โมเลกุลของลิกนินที่สลายตัว	43
2.26 กลไกของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ	47
2.27 อนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ	49
2.28 กรดแอสคอร์บิก, โทรทีอ็อกซ์ และ ABTS	50
2.29 ผังเส้นทางการจับอนุมูลอิสระที่เป็นไปได้ของลิกนิน	53
2.30 การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงในสารละลาย DPPH ของลิกนินประเภทต่างๆ	55
2.31 ภาพ 2 และ 3 มิติของพื้นผิวผลตอบ	57
2.32 การออกแบบการทดลองบล็อกซ์-เบห์นเคน 3 ตัวแปรอิสระรอบพิกัด (0,0,0)	58
3.1 กราฟ BET	84
3.2 ค่าสถานะการ MAP แล้ว EnH เป็นเวลา 24 h ที่จะทำให้ได้ผลผลิตกลูโคสสูงสุด	94
3.3 ค่าสถานะการ MAP แล้ว EnH เป็นเวลา 48 h ที่จะให้ผลผลิตกลูโคสสูงสุด	94
3.4 ค่าสถานะการ MAP แล้ว EnH ที่จะให้ผลผลิตกลูโคสเหมาะสมที่สุดเมื่อพิจารณาทั้ง 24 และ 48 h	95
3.5 ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการทดลองและแบบจำลอง เมื่อ EnH OPCR เป็นเวลา 24 และ 48 h	104
3.6 ภาพเส้นระดับเท่าแสดงปริมาณกลูโคสจากการ EnH เป็นเวลา 24 h เมื่อใช้ [NaOH] 3-7 %w/v	104
3.7 ภาพเส้นระดับเท่าแสดงปริมาณกลูโคสจากการ EnH เป็นเวลา 48 h เมื่อใช้ [NaOH] 3-7 %w/v	105
3.8 ภาพเส้นระดับเท่าแสดงปริมาณกลูโคสจากการ EnH เป็นเวลา 48 h เวลาฉายคลื่น 5-15 min	105

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
3.9		
พื้นที่ผิวตอ 3 มิติ แสดงผลผลิตกัลโคสจากอันตรกิริยาระหว่างตัวแปรต้นเมื่อ EnH เป็นเวลา 24, 48 h	106	
3.10	ภาพถ่ายส่องกราดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	109
3.11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิว ปริมาตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง รูพรุน กับปริมาณผลผลิตกัลโคส	111
3.12	X-ray diffractograms ของเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ	112
3.13	สเปกตรา FTIR ของเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ.....	114
3.14	TGA thermograms ของเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ	117
4.1	ลิกนินมาตรฐาน ลิกนิน MAPL และ CPL จากเหง้ามันสำปะหลัง.....	135
4.2	STD L MAPL และ CPL ที่กำลังขยาย 35-1,000 เท่า	139
4.3	STD L MAPL และ CPL ที่กำลังขยาย 5,000-70,000 เท่า	140
4.4	ภาพรวมตลอดช่วงสเปกตรา FTIR ของลิกนินที่ความยาวคลื่น 4000-400 cm ⁻¹	141
4.5	สเปกตรา FTIR ของลิกนินช่วงความยาวคลื่น 4000-2200 cm ⁻¹	142
4.6	สเปกตรา FTIR ของลิกนินช่วงความยาวคลื่น 2200-400 cm ⁻¹	143
4.7	ร้อยละการลดลงของมวลของลิกนินเมื่อได้รับความร้อนในบรรยากาศไนโตรเจน	147
4.8	¹ H-สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ STD L, MAPL และ CPL	154
4.9	¹³ C-สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ตลอดช่วง 200-0 ppm	155
4.10	ภาพขยาย ¹³ C-สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ช่วง 195-100 ppm	157
4.11	ภาพขยาย ¹³ C-สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ช่วง 80-10 ppm.....	158
4.12	¹³ C- ¹ H สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ STD L.....	159
4.13	¹³ C- ¹ H สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ MAPL	160
4.14	¹³ C- ¹ H สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ CPL.....	161
4.15	โมเลกุลและส่วนของโมเลกุลที่อาจพบได้ใน STD L, MAPL และ CPL.....	164
ก4.1	STD L, Alkali lignin.....	182

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABTS	=	ABTS free radical, the type of antiradical assay
ABTS _{AA}	=	Antioxidant activity measure by ABTS assay (mol or weight of TEAC/g lignin)
ANOVA	=	Analysis of variance
BBD	=	Box-Behnken designs
β -O-4	=	β -aryl ether units
C-	=	Carbon position in monolignol: C1-6, α , β , γ
¹³ C NMR	=	Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy
CPL	=	Conventional pretreatment (40°C 1 hr 10%w/v NaOH) lignin
CR	=	Cassava rhizome
CrI	=	Crystallinity index
δ_C	=	Chemical shift in ¹ H NMR spectra (ppm)
δ_H	=	Chemical shift in ¹³ C NMR spectra (ppm)
DM.	=	Dry matter
DPPH	=	DPPH free radical, the type of antiradical assay
DPPH _{AA}	=	Antioxidant activity measure by DPPH assay (mol or weight of TEAC/g lignin)
EnH	=	Enzymatic hydrolysis (verb/noun)
EPCR	=	Extreme pretreatment of cassava rhizome (900W, 15 min, 5%w/v NaOH)
EtOH	=	Ethanol
FA	=	Ferulate
FESEM	=	Field emission scanning electron microscopic
FTIR	=	Fourier transform infrared spectroscopy
G	=	Guaiacyl unit, the lignin monomeric unit of coniferyl alcohol
G'	=	Oxidized guaiacyl unit
GAE	=	Gallic acid equivalent

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

GOPOD	=	Glucose oxidase/oxidase method, D-Glucose assay kit
h	=	Hour(s)
H	=	<i>p</i> -hydroxyphenyl unit, the lignin monomeric unit of <i>para</i> -coumaryl alcohol
¹ H NMR	=	Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
HSQC	=	Heteronuclear single quantum coherence
MAP	=	Microwave assisted alkali pretreatment
MAPL	=	Microwave assisted alkali pretreatment (840W, 9 min, 3%w/v NaOH) lignin
min	=	Minute(s)
MtOH	=	Methanol
NCR	=	Native cassava rhizome
NMR	=	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
NREL	=	National renewable energy laboratory in the U.S. department of energy, Office of energy efficiency and renewable energy
OPCR	=	Optimum condition of pretreated cassava rhizome (840W, 9 min, 3%w/v NaOH)
<i>p</i> CA	=	<i>p</i> -coumarate, the lignin monomeric units
PCR	=	Pretreated cassava rhizome
RSM	=	Response surface methodology
R ²	=	Coefficient of determination
S	=	Syringyl unit, the lignin monomeric unit of sinapyl alcohol
S'	=	Oxidized syringyl unit
SD	=	Standard deviation
SEM	=	Scanning electron microscopic
STDL	=	Standard lignin (alkali lignin from Sigma-Aldrich Co. Ltd.: 370959)
TEAC	=	Trolox equivalent antiradical capacity
TGA	=	Thermogravimetric analysis
TPC	=	Total phenolic content (mg GAE/g lignin)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

X_1	=	Microwave power
X_2	=	Irridiation time (min)
X_3	=	NaOH concentration (%w/v)
XRD	=	X-ray diffraction
Y_1	=	Predicted result of 24 h hydrolysis glucose yield (g/100 g biomass)
Y_2	=	Predicted result of 48 h hydrolysis glucose yield (g/100 g biomass)



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเพิ่มอุปสงค์ด้านพลังงาน การลดลงของเชื้อเพลิงฟอสซิล และพัฒนาการทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นำไปสู่การหาแหล่งพลังงานที่ยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมยิ่งขึ้น เช่น พลังงานไฟฟ้าจากการหมุนกังหันลม, ศักย์ของน้ำในเขื่อน, แสงอาทิตย์ (photovoltaic technology), น้ำขึ้นน้ำลงและคลื่น (ocean technology), ความร้อนใต้พิภพ (geothermal), ก๊าซชีวภาพจากการหมักขยะชุมชน (anaerobic digestion), การแปรรูปขยะเป็นน้ำมันเชื้อเพลิง (pyrolysis, plasma arc gasification), ไบโอดีเซล-บิวทานอลจากชีวมวลชีวเคมี (bioalcohol), น้ำมันจากสาหร่าย (algal biofuel), พลังงานนิวเคลียร์ (nuclear fusion technology) ฯลฯ การจะเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพื้นที่ วัตถุดิบ ความคุ้มค่า ข้อจำกัด และองค์ความรู้ โดยในช่วงระยะเวลาหนึ่งของมนุษยชาติ เทคโนโลยีบางอย่างที่เคยนิยมใช้จะค่อยๆ ลดลงและถูกแทนที่ด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสมกว่าในแต่ละยุคสมัย

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่มีชี้อาหาร ได้แก่ ลำต้น หน่อ ตอซัง ฯลฯ จากการเกษตรและงานอุตสาหกรรมป่าไม้ สามารถแปรสภาพด้วยวิธีการทางกายภาพ เคมี และชีวภาพเป็นพลังงานและผลิตภัณฑ์ที่มีพื้นฐานวัตถุดิบจากพืช โดยที่ไม่แก่งแย่งกับการผลิตพืชอาหาร (Hu and Ragauskas, 2012) ในประเทศไทยเหง้ามันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตร มีมูลค่าต่อปริมาตรต่ำ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับแปลงสภาพในอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซล-บิวทานอล

เนื่องจากประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมากในแต่ละปี โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนี้จัดเป็นแหล่งพลังงานที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง เหมาะสำหรับนำมาผลิตไบโอดีเซลจากงานศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอดีเซลของกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2555) พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีศักยภาพเหมาะสมทั้งด้านราคาและปริมาณในการผลิตไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ ฟางและซังข้าวโพด (corn stover) ฟางข้าว (rice straw) ซานอ้อย (sugar cane bagasse) ต้นปาล์ม (palm) และเหง้ามันสำปะหลัง (cassava rhizome) ดังนั้นการพัฒนาและวิจัยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าโดยเฉพาะนำมาผลิตไบโอดีเซลและผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจึงเป็นแนวคิดที่น่าสนใจและควรได้รับการสนับสนุนเพื่อความมั่นคงทางด้านพลังงานและเศรษฐกิจของชาติ

ประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทเหง้ามันสำปะหลังเฉลี่ยสูงถึงปีละ 1.83 ล้านตัน (Prakobboon and Vahdati, 2013) โดยส่วนใหญ่หลังจากการเก็บเกี่ยวเหง้ามันสำปะหลัง เกษตรกรมักจะทิ้งเหง้ามันสำปะหลังไว้ในแปลงปลูกเพื่อช่วยเพิ่มวัตถุดิบที่ย่อยสลายได้หรืออาจเผาทำลายโดยเปล่าประโยชน์ แต่หากมีการนำเหง้ามันมาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่า (value-added products) ซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับเหง้ามันสำปะหลังแล้วยังอาจช่วยลดมลพิษทางอากาศเนื่องจากการเผาทิ้งโดยเกษตรกร เหง้ามันสำปะหลังจัดเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและแข็งแรงประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลักคือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยทั่วไปการนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สารให้ความหวานพลังงานต่ำ (low-calorie sweetener) ไบโอเอทานอล-บิวทานอล (bioalcohol) และพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เป็นต้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น (pretreatment) ก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส

การปรับสภาพวัตถุดิบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายโครงสร้างที่แข็งแรง และช่วยกำจัดลิกนินที่ห่อหุ้มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากลิกนินเป็นตัวหลักในการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส (Mosier et al., 2005) การปรับสภาพวัตถุดิบทางเคมีด้วยสารละลายต่างร่วมกับความร้อนจัดเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้พลังงานมาก อีกทั้งยังช่วยลดโครงสร้างแบบผลึก (crystallinity) ของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนให้กับพื้นผิวของวัตถุดิบ มีผลทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถแทรกเข้าไปทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Mosier et al., 2005) การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายต่างในสถานะที่มีความรุนแรงต่ำอาจจะช่วยกำจัดลิกนินได้เพียงบางส่วนหรือในสถานะที่มีความรุนแรงสูงเกินอาจไปทำลายเซลลูโลสบางส่วนทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่ำกว่าที่ควร ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินออกและลดการทำลายเซลลูโลสลง จึงควรเลือกใช้วิธีการให้ความร้อนที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในการปรับสภาพวัตถุดิบเช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (microwave-assisted alkali pretreatment, MAP) เนื่องจากคลื่นไมโครเวฟสามารถทำให้ภายในวัตถุดิบเกิดความร้อนได้อย่างรวดเร็วและทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสแตกออก ส่งผลให้ลิกนินที่แทรกตัวอยู่ภายในโครงสร้างระหว่างสายเซลลูโลสถูกแยกออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการปรับสภาพทำให้ลดการทำลายเซลลูโลสลงได้อีกด้วย (Xiong et al., 2000; Hu and Wen 2008; Boonsombuti, 2013, Zhu et al., 2016) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและพัฒนากระบวนการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยการ MAP เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นกลูโคสรวมทั้งสร้างสมการทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ได้จากการ

ไฮโดรไลซิสเซลลูโลส (EnH) ด้วยเอนไซม์เพื่อผู้สนใจทั้งในเชิงวิจัยและด้านอุตสาหกรรมนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายต่างจะกำจัดลิกนินออกโดยการสลายพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ของลิกนิน ให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งมีผลทำให้โมเลกุลเหล่านี้ละลายในสารละลายต่างส่วนใหญ่แล้วลิกนินเหล่านี้จะถูกนำกลับมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงด้วยการเผาไหม้โดยตรง อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีนักวิจัยศึกษาการนำลิกนินเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีนั้น พบว่าลิกนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถนำมาสังเคราะห์เป็นสารวานิลลิน (vanillin) ส่วนลิกนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถ่านกัมมันต์ (activated carbon materials) สารเชื่อมติด (binding) และสารช่วยกระจาย (dispersing agent) ในอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการวิจัยศึกษาคุณสมบัติของลิกนินเพื่อนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารช่วยลดสารก่อมะเร็งในอาหารบางประเภท สารช่วยลดคอเลสเตอรอล และสารช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เพื่อคงความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) การใช้ประโยชน์จากลิกนินในลักษณะต่างๆเหล่านี้จะเป็นการนำลิกนินกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างคุ้มค่า

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยการ MAP เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตกลูโคสหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH) เป็นเวลา 24 และ 48 h
- 2) เพื่อสร้างสมการทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายปริมาณกลูโคสที่ได้จากการ EnH เป็นระยะเวลา 24 และ 48 h
- 3) เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของลิกนินที่แยกจากสารละลายต่างหลังจากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ตัวแปรหลักที่มีอิทธิพลต่อสภาวะการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยการ MAP ประกอบด้วยพลังงานคลื่น ความเข้มข้นของสารละลายต่าง อุณหภูมิ และเวลา เป็นต้น โดยขนาดของตัวแปรที่ใช้ในการปรับสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในลิกโนเซลลูโลสเป็นหลัก การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสที่มีปริมาณลิกนินสูงมักจะต้องใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายต่างและอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทั้งเวลาที่ใช้ก็มากขึ้นด้วย เหง้ามันสำปะหลังเป็นวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่สูง การนำเหง้ามันสำปะหลังมาปรับสภาพในสภาวะที่มีความเข้มข้นของต่างและอุณหภูมิสูง ระยะเวลาานจะสามารถแยกลิกนินออกมาได้มากขึ้นแต่ก็อาจทำให้เซลลูโลสที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลที่ต้องการถูกทำลายลงด้วย การลดความเข้มข้นของต่างและ

อุณหภูมิลง ใช้ระยะเวลาที่สั้นเกินไปจะทำให้แยกลิกนินออกจากเหง้ามันสำปะหลังได้น้อย หากต้องการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสารละลายต่างที่มีความเข้มข้นต่ำจึงควรเลือกใช้วิธีการให้ความร้อนที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นได้แก่ การใช้คลื่นไมโครเวฟ ซึ่งสามารถทำให้ภายในวัสดุเกิดความร้อนได้อย่างรวดเร็วและทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสแตกออก ส่งผลให้ลิกนินที่แทรกอยู่ภายในโครงสร้างระหว่างสายเซลลูโลสถูกแยกออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยลดระยะเวลาการปรับสภาพทำให้ลดการทำลายเซลลูโลสลงได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการวิจัยและพัฒนาวิธีการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วย MAP เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ งานวิจัยนี้จะเริ่มจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลัง โดยศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ (independent variables) 3 ตัวแปร ได้แก่ 1) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (มีผลต่ออุณหภูมิและอันตรกิริยาของคลื่นต่อโมเลกุลของลิกนินเซลลูโลสในสารละลาย) 2) เวลา และ 3) ความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์; ขณะที่ตัวแปรตาม (response variable) ได้แก่ ปริมาณผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ และปริมาณลิกนินที่ขจัดออกได้ ออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box Behnken design) การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างจะช่วยแยกลิกนินที่แทรกตัวอยู่ภายในโครงสร้างระหว่างสายเซลลูโลสออกได้ดี ทำให้เอนไซม์สามารถแทรกเข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้โครงการวิจัยยังต้องการใช้ประโยชน์จากส่วนของของเหลวซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากการปรับสภาพโดยเลือกจากสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพขั้นต้น ด้วยการนำมาศึกษาวิธีการแยกลิกนินออกด้วยการตกตะกอนโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (acid precipitation) โดยจะศึกษาผลของการปรับค่า pH ในสารละลายต่ออัตราการตกตะกอน ทั้งนี้ผลผลิตของลิกนินที่เอากลับคืนมาได้ นั้นจะถูกนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า โดยการศึกษาถึงสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในบทถัดไป

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

- 1) การหาสภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างจะใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken)
- 2) งานวิจัยนี้จะถูกดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale) เท่านั้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบบจำลองซึ่งประกอบด้วยค่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยการ MAP ให้ได้ปริมาณผลผลิตกลูโคสสูงสุดหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

เป็นเวลา 24 และ 48 h; และสามารถกู้ลิกนินจากสารละลายต่างหลังการปรับสภาพดังกล่าว เพื่อศึกษาคุณสมบัติการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งหมดนี้ย่อมเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งอันจะบังเกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่อเนื่องจากภาคการเกษตร

1.6 รายการอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2555. บทสรุปสำหรับผู้บริหาร โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับบริษัท จีอีอี. แมเนจเม้นท์ จำกัด. กระทรวงพลังงาน. 22 หน้า. [ออนไลน์]. ได้จาก: webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/2.รายงานสรุปสำหรับผู้บริหาร.pdf วันที่ 25 มิถุนายน 2562.
- Boonsombuti, A., Luengnaruemitchai, A., and Wongkasemjit, S. (2013). Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology. *Cellulose*. 20(4): 1957-1966.
- Hu, F., and Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenerg. Res.* 5: 1043-1066.
- Hu, Z. H., and Wen, Z. Y. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*. 38(3): 369-378.
- Mosier, N. S., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N., Sedlak, M., Dreshel, R., Welch, G., Dien, B. S., Aden, A., and Ladisch, M. R. (2005). Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*. 125(2): 77-97.
- Prakobboon, N., and Vahdati, M. (2013). Review of the potential for co-firing of cassava rhizome for generating heat and power in cassava based bio-ethanol plant in Thailand. *International Journal of Biomass & Renewables*. 2(2): 14-22.
- Xiong, J., Ye, J., Liang, W.Z., and Fan, P.M. (2000). Influence of microwave on the ultrastructure of cellulose I. *J Sou Chin Uni Technol*. 28: 84-89.
- Zhu, Z., Rezende, C.A., Simister, R., McQueen-Mason, S.J., Macquarrie, D.J., Polikarpov, I., and Gomez L.D. (2016). Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. *Biomass and Bioenergy*. 93: 269-278.

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ประเทศไทยมีพื้นฐานทางเศรษฐกิจจากภาคเกษตรกรรม แต่ละปีมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งผลพลอยได้จากภาคการเกษตรจำนวนมาก อันได้แก่ ฟางข้าว เหม้ามันสำปะหลัง ชานอ้อย ชังข้าวโพด ทะลายปาล์ม ฯ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ข้อมูลประเมินศักยภาพการใช้ประโยชน์วัสดุชีวมวลแต่ละชนิด ปีการเพาะปลูก 2556

ชนิด	ปริมาณการเกิด (ตัน)	ปริมาณนำไปใช้ (ตัน)	ปริมาณคงเหลือ (ตัน)
ชานอ้อย	28,026,761.54	28,026,761.54	0
ฟางข้าว	19,005,628.14	8,112,801.26	10,892,826.89
ใบและทางปาล์ม	18,065,006.01	1,707,454.87	16,357,551.14
แกลบ	8,145,269.20	8,006,283.36	138,985.84
เหม้ามันสำปะหลัง	6,045,508.40	164,196.52	5,881,311.88
ทะลายปาล์มเปล่า	4,099,859.52	1,891,985.90	2,207,873.62
ลำต้นปาล์มน้ำมัน	1,957,280.00	-	1,957,280.00
ชังข้าวโพด	1,215,078.72	1,094,081.58	120,997.14
ขี้เลื่อยและเศษไม้ยางพารา	656,619.00	656,619.00	0
เปลือกและกาบมะพร้าว	333,310.89	329,976.78	3,334.11

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (2557)

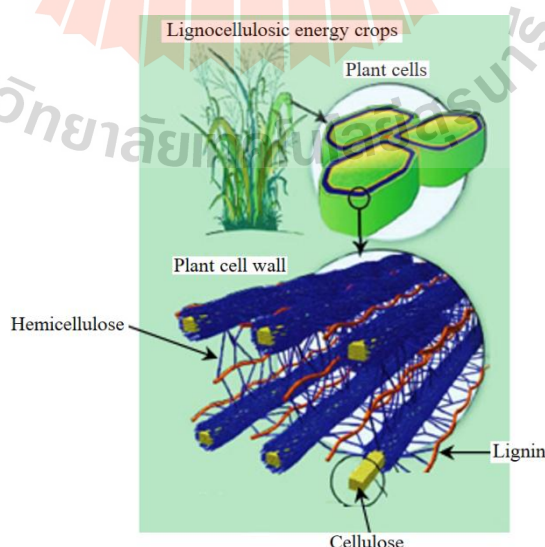
แนวคิดในการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ ให้เป็นพลังงานและผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม (biorefinery concept) เป็นหนึ่งในแนวคิดที่ใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสได้อย่างคุ้มค่า เชื้อเพลิงที่ได้จากลิกโนเซลลูโลสเป็นทางเลือกใหม่ที่จะมาแทนที่เชื้อเพลิงฟอสซิล เพราะมีข้อดีหลายประการ ทั้งความมั่นคงทางด้านพลังงาน ด้านเศรษฐกิจและการเมืองระหว่างประเทศจากการต้องพึ่งพานำเข้าเชื้อเพลิง อุตสาหกรรมต่อเนื่องจากภาคการเกษตร การลดก๊าซเรือนกระจกและฝุ่นขนาดเล็กกว่า 2.5 ไมครอน (PM2.5) จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล โดยเชื้อเพลิงไบโอเอทานอลหรือไบโอ

บิวทานอลจะได้จากกระบวนการหมักกลูโคสด้วย *S.cerevisiae* หรือ *C. acetobutylicum* ตามลำดับ (วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล, 2558)

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่างเป็นหนึ่งในวิธีที่นิยมใช้ในการแยก (fractionation) ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากเซลลูโลส (Peng et al., 2014) เพราะวิธีนี้สามารถใช้ อุณหภูมิ ความดัน และเวลาในการปรับสภาพต่ำกว่าวิธีอื่นๆ การปรับสภาพด้วยสารละลายต่างทำให้ ลิกโนเซลลูโลสแยกออกเป็นสองส่วนคือของแข็งและของเหลว ส่วนที่เป็นของแข็งประกอบด้วย เซลลูโลส ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ ซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนที่เป็นของเหลว ประกอบด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และอื่นๆ ทั้งนี้ส่วนของแข็งจะถูกนำไปผลิตน้ำตาลกลูโคสโดยการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยประสิทธิภาพการผลิตน้ำตาลกลูโคสจะขึ้นอยู่กับสถานะในการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างและสถานะในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ ส่วนของเหลวนั้นเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการปรับสภาพ

2.2 ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสหมายถึงชีวมวล (biomass) หรือสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งกักเก็บพลังงานศักย์เคมีได้แก่พืชทางการเกษตร (agricultural crops) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural residues) ไม้และเศษไม้ (wood residue) องค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 พืชแต่ละชนิดจะมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.2)



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก Yarris, 2010)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแสดงค่าเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง

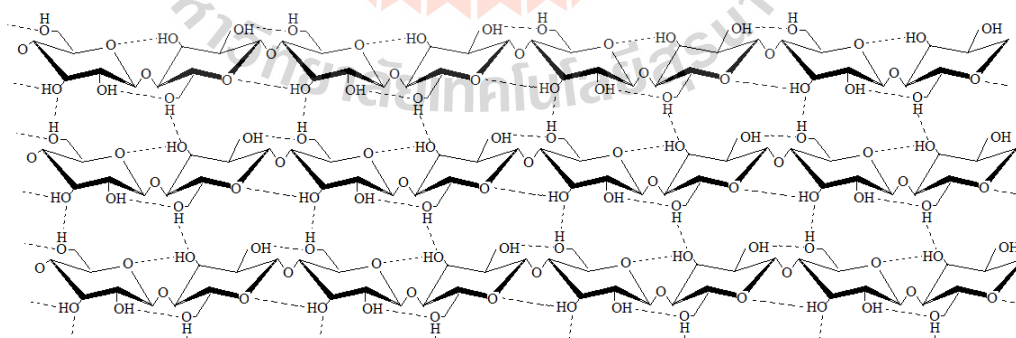
Agricultural residues	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Wheat straw	38.6	32.6	14.1
Rice straw	36.5	27.7	12.3
Maize stems	38.5	28.0	15.0
Cassava rhizome	32.2	13.9	27.0

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (2555)

2.2.1 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

1) เซลลูโลส (cellulose)

เป็น linear homopolymer พอลิเมอร์นี้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) อันเป็นส่วนประกอบหลักในผนังเซลล์พืช พืชแต่ละชนิดมีปริมาณเซลลูโลสแตกต่างกัน และในพืชชนิดเดียวกัน ปริมาณที่พบก็แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับส่วนของพืช (Buranov and Mazza, 2008; Goshadrou, Karimi and Taherzadeh, 2011) เซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคส แต่ละโมเลกุลกลูโคสที่ตำแหน่ง C1 และ C4 เชื่อมต่อกันแบบเบต้า หรือเรียกว่าพันธะ β -1, 4 glycosidic รูปที่ 2.2 เป็น 1 สายโซ่ มีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลข้างเคียงและเกิดระหว่างสายโซ่เชื่อมกันเอง สายโซ่เซลลูโลสที่ผลานกันอย่างเป็นระเบียบจะเรียกว่าเซลลูโลสแบบผลึก (crystalline cellulose) หากกระจายตัวไปในส่วนของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชแบบหลวมๆ เรียกเซลลูโลสอสัณฐาน (amorphous cellulose)



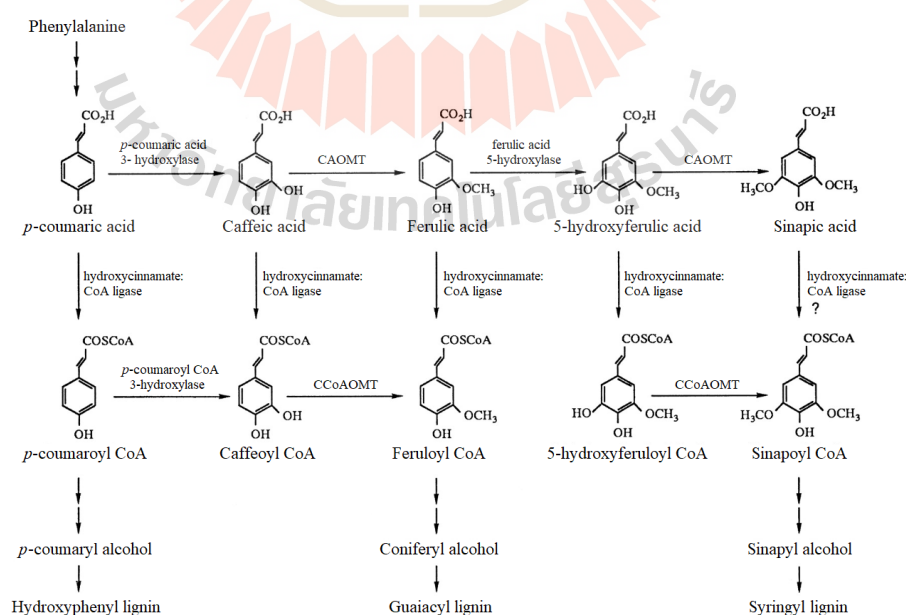
รูปที่ 2.2 กลูโคสต่อกันยาวเป็นสายโซ่เซลลูโลส และแต่ละเส้นเชื่อมต่อกันอย่างเป็นระเบียบ

2) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

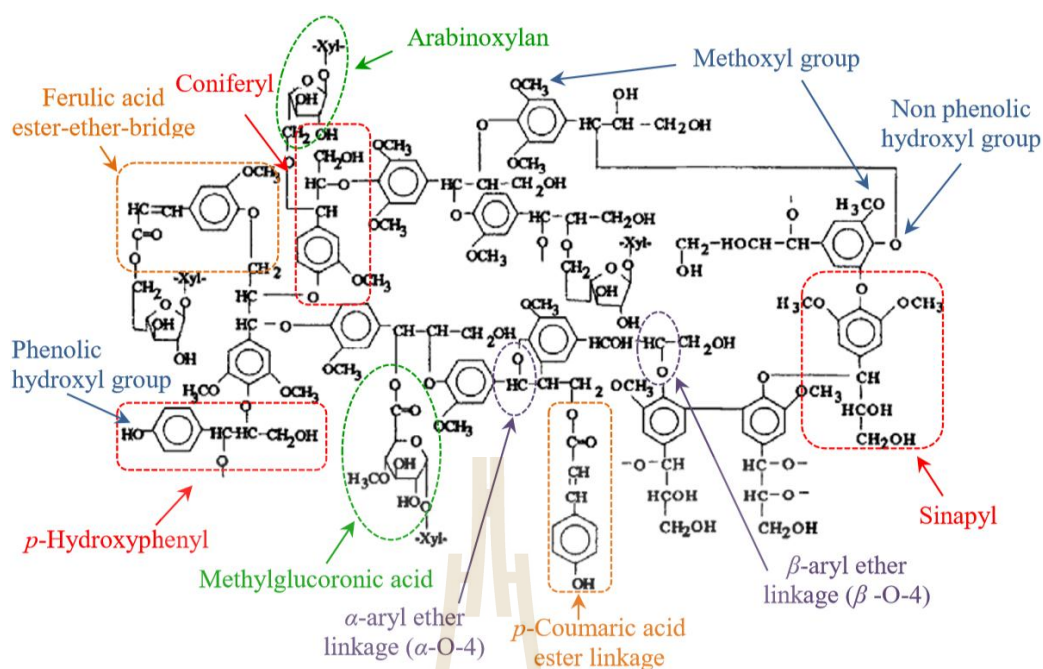
เฮมิเซลลูโลสเป็น heteropolysaccharide ของน้ำตาลหลายๆ ชนิดเชื่อมต่อกัน เป็นสายยาวและเป็นกิ่งสาขา ได้แก่ น้ำตาลเพนโตส (น้ำตาลคาร์บอน 5 เช่น ไซโลสและอะราบีโนส) และน้ำตาลเฮกโซส (น้ำตาลคาร์บอน 6 เช่น กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส) และ (Buranov and Mazza, 2008) เป็นพอลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลคแตน และอะราบีแนน (Bastawde et al., 1992) เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างพอลิเมอร์ไซแลนซึ่งมี D-xylan มากที่สุด ถึง 85-93% ขณะที่กลูโคสและ กรดควิโรนิกจะพบได้ปริมาณเล็กน้อย (Browing, 1963) การเชื่อมพันธะของไซโลสเชื่อมด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic (Browing, 1963; Bastawde et al., 1992; Altintas et al., 2002)

3) ลิกนิน (lignin)

ลิกนินมีโครงสร้างซับซ้อน เป็น heteropolymer (แต่ไม่จัดเป็น polysaccharide หรือ heteropolysaccharide ดังเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส) ลิกนินประกอบด้วยหน่วยของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane units) ทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์ โดยลิกนินจะห่อหุ้มเส้นใยของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (Buranov and Mazza, 2008) พบปริมาณแตกต่างกันแตกต่างกันไปตามชนิดและเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของพืช การสังเคราะห์ลิกนินในพืชเป็นการสร้างสารเมทาบอลิโททุติยภูมิ (secondary metabolite) ผ่านกระบวนการที่ซับซ้อน (รูปที่ 2.3) หน่วยของฟีนิลโพรเพนประกอบด้วยสารอโรมาติก 3 ชนิด ได้แก่ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol (ตารางที่ 2.3) ซึ่งเชื่อมต่อกับสารประกอบอโรมาติกอื่นเป็นอันมาก (Notley and Norgren, 2009) ดูรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 เส้นทางการสังเคราะห์ลิกนิน (Zhong et al., 1998)



รูปที่ 2.4 มห โมเลกุลลิกนิน [Junyusen (2013) คัดแปลงจาก Sun et al. (1997)]

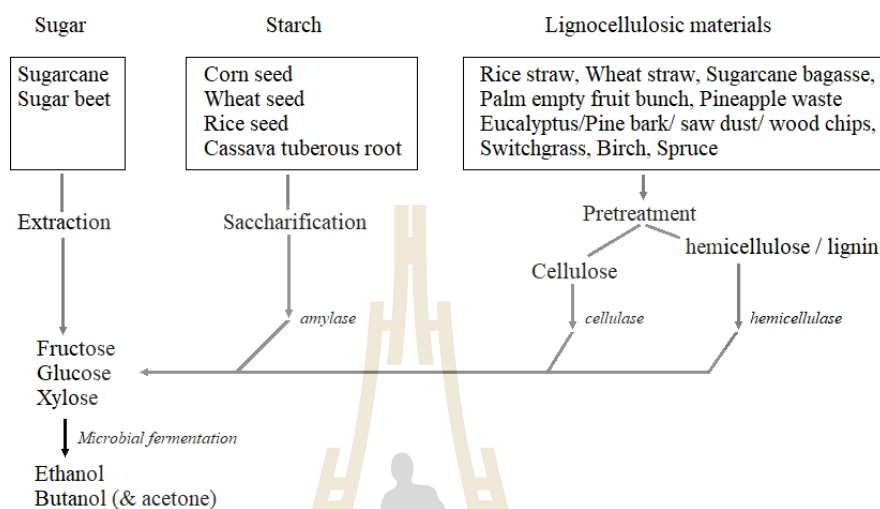
ตารางที่ 2.3 อัตราส่วนโมโนลิกนอลในพืช (Notley and Norgren, 2009)

	<i>p</i> -Coumaryl alcohol	Coniferyl alcohol	Sinapyl alcohol
Softwood	<5	>95	Trace amounts
Hardwood	0-8	25-50	46-75
Grasses	5-33	33-80	20-54

2.2.2 การใช้ประโยชน์ลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกและกิจกรรมทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก จึงมีวัสดุเหลือทิ้งจากการทำการเกษตรมากตามไปด้วย ทำให้มีศักยภาพในการนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้ การวิจัยและพัฒนาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าโดยเฉพาะผลิตไบโอแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพกำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรของกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน ในปี 2555 พบว่าซังข้าวโพด ฟางข้าว ชานอ้อย ต้นปาล์ม และเหง้ามันสำปะหลัง มีความเหมาะสมทั้งด้านราคาและปริมาณในการผลิตไบโอเอทานอลในเชิงพาณิชย์ ชัยนันท์ นิवासวงษ์และเฉลิม เรื่องวิริยะชัย (2555) ได้นำเสนอการผลิตเซลลูโลสเอทานอลในประเทศไทย โดยเน้นความสำคัญในการเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอเอทานอลให้เพียงพอต่อปริมาณ

ความต้องการใช้ไบโอเอทานอลทั้งหมดภายในประเทศโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งเซลลูโลสและเอทานอลมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับที่ผลิตจากพืชอาหารประเภทอ้อยและมันสำปะหลัง ดังแสดงการผลิตไบโอเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทต่างๆ ในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 การผลิต ไบโอเอทานอล (เอทานอล/บิวทานอล) จากวัตถุดิบประเภทต่างๆ

อย่างไรก็ดี การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทานอลนั้นจำเป็นต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis, EnH) การปรับปรุงสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล ได้แก่ การปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพ ทางกายภาพพร้อมกับเคมี ทางเคมี และทางชีวภาพ พบว่าแต่ละวิธีมีทั้งข้อดีและข้อเสีย การเลือกใช้วิธีใดขึ้นกับชนิดของลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้ ความสะดวกและต้นทุนของภาคอุตสาหกรรม

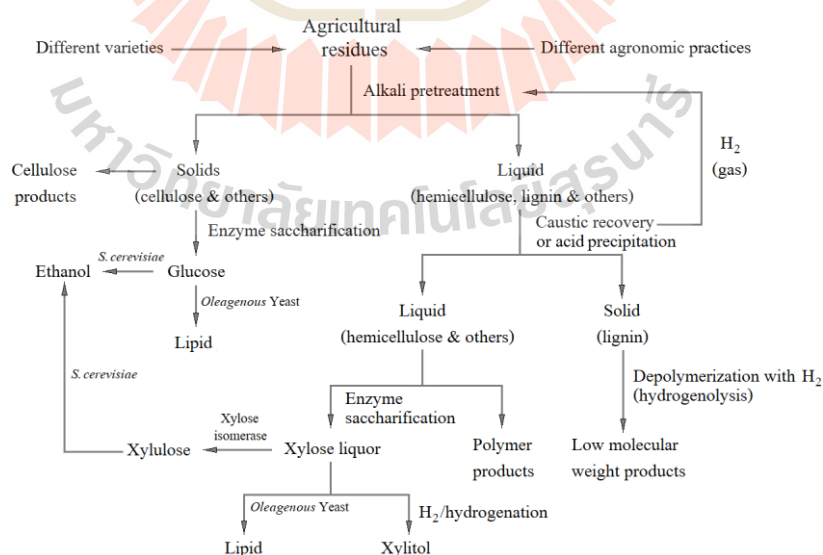
2.3 เหง้ามันสำปะหลัง

มันสำปะหลังถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจอันดับ 3 ของประเทศไทย มีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 22 ล้านตันต่อปี ในพื้นที่เพาะปลูก 7.30 ล้านไร่ โดยจังหวัดที่มีการเพาะปลูกมากที่สุดคือนครราชสีมา การปลูกมันสำปะหลัง 1 ไร่ให้ผลผลิตหัวมันสำปะหลังสดเฉลี่ย 3.59 ตันต่อไร่ และมีเหง้ามันสำปะหลังเหลือทิ้งประมาณ 0.40 ตันต่อไร่ หรือเฉลี่ยสูงถึงประมาณปีละ 1.83 ล้านตัน (Prakobboon and Vahdati, 2013)

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอให้คำจำกัดความเพื่อระบุส่วนของพืชให้ชัดเจนว่า เหง้ามันสำปะหลัง (cassava rhizome, CR หรือ cassava stump/base of stem) หมายถึง ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ใช้ปักชำปลูกในปีก่อน เมื่อครบอายุเก็บเกี่ยว (10-12, 12-14 หรือ 14-16 เดือน แล้วแต่

ปริมาณฝน ความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารในดิน และความพร้อมของเกษตรกร) ท่อนพันธุ์ดังกล่าวจะเจริญเป็นลำต้นแข็ง

ส่วนใหญ่หลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วสำหรับเกษตรกรบางรายอาจทำการเผาแห้งมันทิ้งบ้าง โดยเปล่าประโยชน์ หรือทิ้งแห้งมันสำหรับไถในแปลงเพาะปลูกด้วยไม่อาจสร้างมูลค่าเพิ่มอันใด ซึ่งก็มีประโยชน์บ้างในด้านการเพิ่มอินทรีย์วัตถุอันเป็นประโยชน์ทางกายภาพ และเพิ่มธาตุอาหารกลับคืนสู่ดิน บางส่วนถูกตัด-รวมทิ้งไว้หน้าโรงงานแปรงมันสำหรับแปรง แต่หากต้องการนำแห้งมันมาสร้างมูลค่าเพิ่มและผลประโยชน์จากสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้มีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากการใช้แห้งมันสำหรับแปรงเพื่อผลิตพลังงานชีวมวล (รูปที่ 2.6) Prakobboon and Vahdati (2013) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับแห้งมันสำหรับแปรงเพื่อใช้ในการผลิตความร้อนและพลังงานสำหรับอุตสาหกรรมไบโอเอทานอลในประเทศไทย ส่วน Suttibak et al. (2012) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยงานวิจัยเน้นการผลิตไบโอออยล์ (bio-oil) จากแห้งและต้นมันสำหรับแปรงด้วยกระบวนการไพโรไลซิสแบบเร็ว (fast pyrolysis) เพื่อนำไบโอออยล์ไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตไฟฟ้า เครื่องยนต์กังหันแก๊ส (gas turbine) และเครื่องยนต์ดีเซล เป็นต้น นอกจากนี้ Meesukanan and Satirapipathkul (2014) ได้ศึกษาการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากแห้งมันสำหรับแปรง โดยเปรียบเทียบวิธีการปรับสภาพแห้งมันสำหรับแปรงด้วยความร้อนและด่าง จากผลงานวิจัยพบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างมีประสิทธิภาพการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากแห้งมันสำหรับแปรงได้ดีกว่าการปรับสภาพด้วยความร้อนแต่เพียงอย่างเดียว

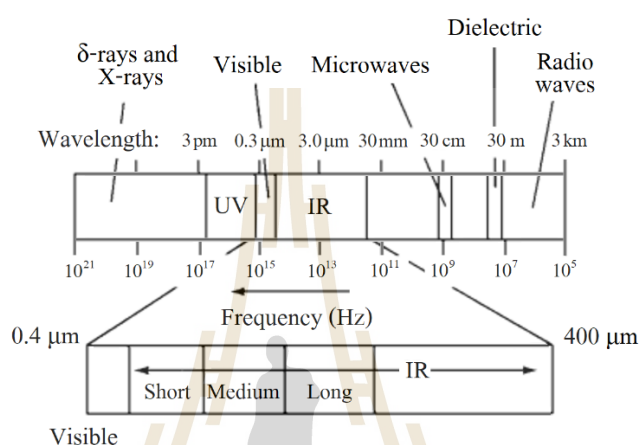


รูปที่ 2.6 แนวคิดการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เป็นพลังงานและผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม [Junyusen (2013) ดัดแปลงจากสไลด์นำเสนอของ Penner (2012)]

2.4 คลื่นไมโครเวฟและวัสดุไดอิเล็กทริก

2.4.1 คลื่นไมโครเวฟ

คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งมีความยาวของคลื่นอยู่ระหว่างความยาวคลื่นวิทยุ (radio wave) กับความยาวคลื่นอินฟราเรด (infrared) มีความถี่อยู่ระหว่าง 300 MHz-300 GHz ดังแสดงในรูป 2.7



รูปที่ 2.7 Electromagnetic spectrum (Fellows, 2000)

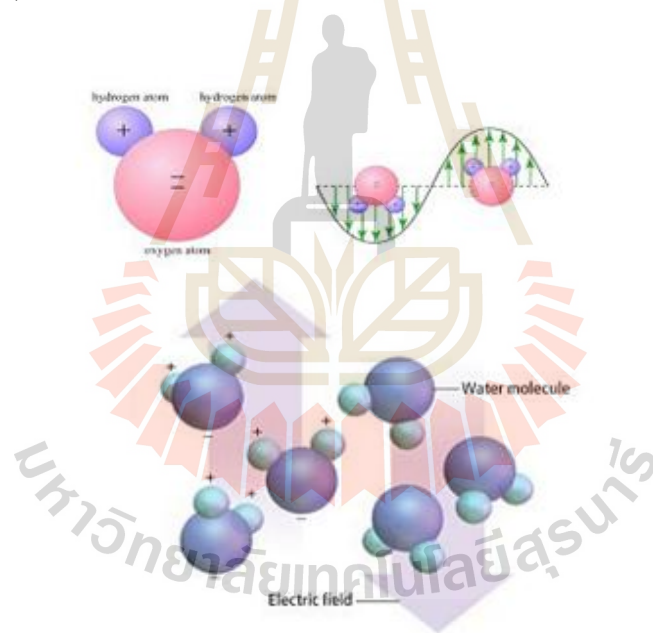
คลื่นไมโครเวฟไม่ใช่ความร้อนแต่อยู่ในรูปของพลังงาน การเกิดความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟอาศัยกลไกสำคัญ 2 ประการ (ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช, 2551) ได้แก่

1) การเหนี่ยวนำของไอออน (ionic conduction)

สารมีประจุในสารละลาย เช่น เกลือแกงละลายในน้ำเกิด Na^+ Cl^- หรือ hydronium ion (H_3O^+ , H^+) หรือ hydroxyl ion (OH^-) จากกรดและเบสตามลำดับ ถูกกระทำด้วยแรงของสนามไฟฟ้า สารมีประจุเหล่านี้จะเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้ามกับสนามไฟฟ้า ประจุเกิดความเร่งไปชนเป็นลูกโซ่อย่างต่อเนื่องกับโมเลกุลของน้ำที่ยังไม่เกิดการแตกตัว ทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น เมื่อสนามไฟฟ้าเปลี่ยน ประจุจะมีความเร่งเพิ่มขึ้นในทิศทางตรงข้าม ซึ่งเกิดการสลับขั้วสูงหลายพันล้านครั้งต่อวินาที ทำให้เกิดการชนและการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลอย่างมหาศาล โดยมีการเปลี่ยนแปลงพลังงานใน 2 ขั้นตอนคือ พลังงานของสนามไฟฟ้าถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นพลังงานจลน์ โดยการเหนี่ยวนำแบบบังคับทิศทาง (ordered kinetic energy) และไร้ทิศทาง (disordered kinetic energy) ซึ่งพลังงานจลน์จะเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานความร้อน

2) การหมุนสองขั้ว (dipole rotation)

สารหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสองขั้ว (dipole) โดยธรรมชาติซึ่งหมายถึง การที่โมเลกุลมีสมบัติการกระจายความจุที่ไม่สมมาตร เช่น น้ำและโมเลกุลของสารชนิดอื่นใดก็เกิดความไม่สมมาตรได้หากเกิดการเหนี่ยวนำโดยสนามไฟฟ้าที่ให้เข้าไป เพราะสนามไฟฟ้าจะทำให้เกิดแรงเค้นภายในโมเลกุล ขั้วทั้งสองจะได้รับอิทธิพลจากกลไกดังกล่าว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงขั้วอย่างรวดเร็วตามสนามไฟฟ้าที่เข้ากระทำ เช่น คลื่นไมโครเวฟมีความถี่ 2.45×10^9 Hz ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขั้วหรือการพลิกตัวของโมเลกุลอันก่อให้เกิดความร้อนถึง 4.9×10^9 ครั้งต่อวินาที โดยขั้วลบของน้ำจะวิ่งเข้าหาขั้วบวกของสนามไฟฟ้า และในทางตรงกันข้ามขั้วบวกของน้ำก็จะวิ่งเข้าหาขั้วลบของสนามไฟฟ้า ดังแสดงในรูปที่ 2.8 (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานพนธ์, 2553) นอกจากนี้ ใน 1 รอบคลื่นจะไม่มีสนามไฟฟ้าใน 2 จังหวะ ทำให้เกิดการคลายสนาม (relaxes) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงพลังงานของสนามไฟฟ้าเป็นพลังงานศักย์ใน โมเลกุลแล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานจลน์และ/หรือพลังงานความร้อน



รูปที่ 2.8 โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็วตรงข้ามทิศทางของสนามไฟฟ้า (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานพนธ์, 2553)

2.4.2 สมบัติไดอิเล็กทริกของวัสดุ (dielectric properties of material)

วัสดุไดอิเล็กทริกเป็นวัสดุที่โดยปกติแล้วเป็นฉนวน (insulator) ไม่แสดงควมมีประจุ แต่สามารถทำให้มีขั้วไฟฟ้าได้โดยใช้สนามไฟฟ้า เมื่อวัสดุไดอิเล็กทริกหนึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้า ประจุไฟฟ้าจะไม่ไหลผ่านตัววัสดุเหมือนการไหลผ่านตัวนำไฟฟ้า (conductor) แต่ประจุจะขยับเพียง

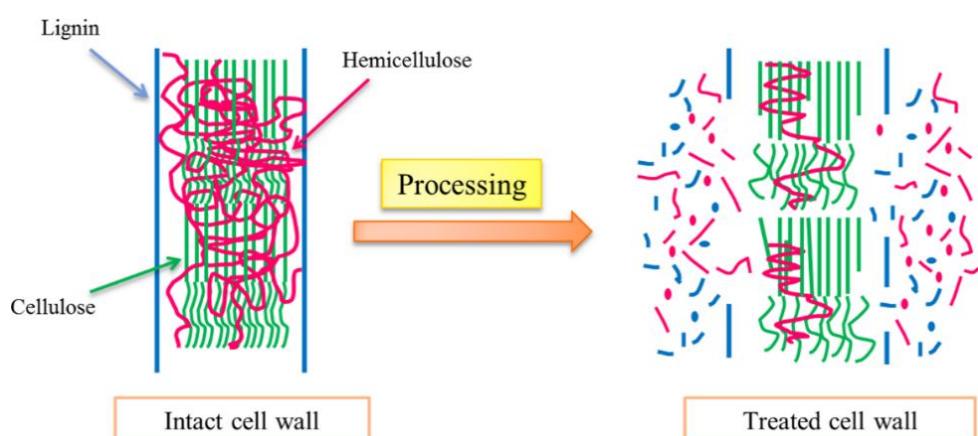
เล็กน้อยเท่านั้นจากตำแหน่งสมมูลเฉลี่ย ก่อให้เกิดความมีขั้วไดอิเล็กทริก (dielectric polarization) ในการนี้ประจุบวกและลบจะขยับไปในทิศทางตรงข้ามกับแรงที่ได้จากสนามไฟฟ้า ความแข็งแรงของประจุจะเรียกว่า ไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) ที่สามารถบอกได้ถึงขนาดของปฏิกิริยาระหว่างประจุกับสนามไฟฟ้า ค่าไดโพลโมเมนต์สามารถบอกถึงค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant, ϵ') ซึ่งเป็นค่าที่บอกความมีขั้ว (polarity) ของวัสดุที่อุณหภูมิใดๆ หากวัสดุไดอิเล็กทริกใดสามารถทำให้มีขั้วไฟฟ้าได้มาก จะเรียกว่าวัสดุนั้นว่ามีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสูง อาจกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าค่าคงที่ไดอิเล็กทริกเป็นค่าแสดงความสามารถของวัสดุในการกักเก็บพลังงานไฟฟ้า ขณะที่ค่าการสูญเสียไดอิเล็กทริก (dielectric loss, ϵ'') เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของวัสดุที่กระจายพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานความร้อน และค่า loss tangent ($\tan\delta$) หรือ dissipation factor (Zuloaga et al., 1999) แสดงถึงอำนาจทะลุทะลวงของสนามไฟฟ้าและระดับการกระจายพลังงานไฟฟ้าเพื่อเป็นพลังงานความร้อนโดยความสัมพันธ์ของค่า ϵ' , ϵ'' และ $\tan\delta$ มีความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$\epsilon'' = \epsilon' \tan\delta \quad (2.1)$$

โดย Fellows (2000) ได้กล่าวไว้ว่าอุณหภูมินั้นจะมีผลต่อสมบัติไดอิเล็กทริกเป็นอย่างมาก ดังแสดงผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อค่าการสูญเสียไดอิเล็กทริก ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของวัสดุที่กระจายพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานความร้อน

2.5 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส

การปรับสภาพวัสดุคิบเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของวัสดุคิบพวกลิกโนเซลลูโลส (รูปที่ 2.9) โดยมีจุดประสงค์หลักเพื่อกำจัดลิกนิน เนื่องจากโครงสร้างที่แข็งแรงของลิกนินนั้นเชื่อมต่อกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะเคมีที่แข็งแรง ลิกนินจึงทำหน้าที่เสมือนผนังป้องกันการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากจุลินทรีย์ กรดหรือด่าง เป็นต้น (Hu and Ragauskas, 2012) นอกจากนี้การปรับสภาพวัสดุคิบยังมีผลช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวภายในวัสดุคิบ และลดโครงสร้างที่หนาแน่นของเซลลูโลส ทำให้การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเบตากลูโคซิเดสมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์สามารถเข้าถึงสับสเตรทได้ง่ายขึ้น ทั้งยังเป็นการลดปริมาณการใช้เอนไซม์ซึ่งมีราคาแพง



รูปที่ 2.9 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายต่าง (ดัดแปลงจาก Mosier et al., 2005)

2.5.1 วิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส

Sun and Cheng (2002), Mosier et al. (2005) และสุภาวดี ผลประเสริฐ (2557) ได้รวบรวมวิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสไว้ดังนี้

1) การปรับสภาพทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการปรับสภาพโดยใช้เครื่องมือกลเพื่อสับและบดเพื่อลดขนาดอนุภาคของวัตถุดิบและเพิ่มพื้นที่ผิว ทั้งยังเป็นการทำลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสบางส่วน โดยทั่วไปขนาดวัตถุดิบที่หั่นแล้วควรมีขนาดประมาณ 1-3 mm และเมื่อนำไปบดละเอียดแล้วควรทำให้ได้ขนาดประมาณ 0.2-2 mm ส่วนใหญ่การปรับสภาพทางกายภาพจะเป็นวิธีขั้นต้น หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกรรมวิธีการปรับสภาพแบบอื่นๆ

2) การปรับสภาพทางเคมี (chemical pretreatment) เช่น การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส, ปรับสภาพด้วยสารละลายด่างเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสและขจัดลิกนิน หรือการใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันเช่นการใช้โอโซนเพื่อขจัดลิกนิน

- การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด (acid hydrolysis) กรดที่ใช้ได้แก่ H_2SO_4 , HCl และนิยมใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (1% เป็นต้น) เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายผลผลิตน้ำตาลจากกรดที่นำมาใช้ และให้เกิดสะดวกต่อการคืนสภาพ (neutralization) หากแต่การใช้กรดมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าด่าง

- การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง (alkaline hydrolysis) นิยมใช้ NaOH, $Ca(OH)_2$ โดยด่างเหล่านี้จะสลายโครงสร้างของลิกนินและลดความหนาแน่นของเซลลูโลส การปรับสภาพด้วยสารละลายด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้เวลาทำงานมากเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด

- การปรับสภาพด้วยสารออกซิเดชัน (oxidative hydrolysis) ก๊าซโอโซน (O_3) ซึ่งละลายในน้ำได้ดีถูกนำมาใช้เพื่อแตกโครงสร้างของลิกนิน นอกจากนี้ H_2O_2 ก็เป็นสาร oxidative delignification เช่นกัน โดยปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันห้อง ไม่ต้องสิ้นสภาพด้วยการใช้กรดหรือด่าง แต่ข้อเสียคือต้องใช้ O_3 หรือ H_2O_2 ปริมาณมาก ตามมาด้วยค่าใช้จ่ายที่สูง

3) การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (physicochemical pretreatment)

เป็นการย่อยโครงสร้างวัตถุดิบโดยใช้อุณหภูมิศาสตร์ร่วมกับเคมี ได้แก่

- การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) ชีวมวลที่ผ่านการสับ-บดเพื่อลดขนาดลงแล้ว จะถูกนำเข้ามาห่อความดันไอน้ำอิ่มตัว $160-260^\circ C$ ที่ความดัน $0.69-4.83$ MPa พักไว้ระยะหนึ่งแล้วจึงลดความดันลงให้เท่าความดันบรรยากาศ จะทำให้เอมิเซลลูโลสสลายตัว และลิกนินเกิดการเปลี่ยนรูป ข้อดีของวิธีนี้คือใช้พลังงานต่ำ หากเทียบกับการบดด้วยเครื่องบดจนได้ผลิตภัณฑ์ดังที่ผ่านการระเบิดไอน้ำ ข้อเสียคือการทำลายส่วนประกอบของไซแลนอาจทำให้เกิด Hydroxymethylfurfural (HMF)

- การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX) คล้ายวิธีการระเบิดด้วยน้ำ แต่ใช้แอมโมเนีย $1-2$ kg ต่อชีวมวล 1 kg ให้ความร้อนในห่อความดันที่ $1.72-2.06$ MPa, $60-120^\circ C$, 30 min [สุภาวดี ผลประเสริฐ (2557) อ้าง Kumar et al. (2009)] กระบวนการนี้ให้ผลดี แต่จะไม่เหมาะสมหากกระทำกับชีวมวลที่มีปริมาณลิกนินสูง เช่น หนัสน้ำส้ม (ลิกนิน $18-30\%$) และแม้ว่าแอมโมเนียสามารถเวียนกลับเพื่อใช้ใหม่ได้ แต่ก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการระเบิดด้วยไอน้ำ

4) การปรับสภาพทางชีวภาพ (biological pretreatment) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

ช่วยกำจัดลิกนินและเอมิเซลลูโลสเช่น brown fungi, white fungi และ soft fungi ออกจากวัตถุดิบ วิธีการนี้ใช้พลังงานน้อย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่มีอัตราการย่อยสลายต่ำ ใช้เวลานาน ใช้พื้นที่ในการผลิตมาก

2.5.2 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่าง

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่างมีกลไกการย่อยสลายองค์ประกอบบางส่วนของลิกโนเซลลูโลสโดยทำลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ระหว่างลิกนินกับเอมิเซลลูโลส และทำลายพันธะอีเทอร์ (ether bond) ซึ่งมีผลทำให้เอมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนถูกย่อยสลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กละลายในสารละลายต่าง ส่วนเซลลูโลสยังคงเป็นองค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลาย สารละลายต่างยังทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเกิดการพองบวม (swollen) นำไปสู่การเพิ่มพื้นที่ผิวภายใน อีกทั้งยังช่วยลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสสามารถแทรกเข้าไปทำงาน

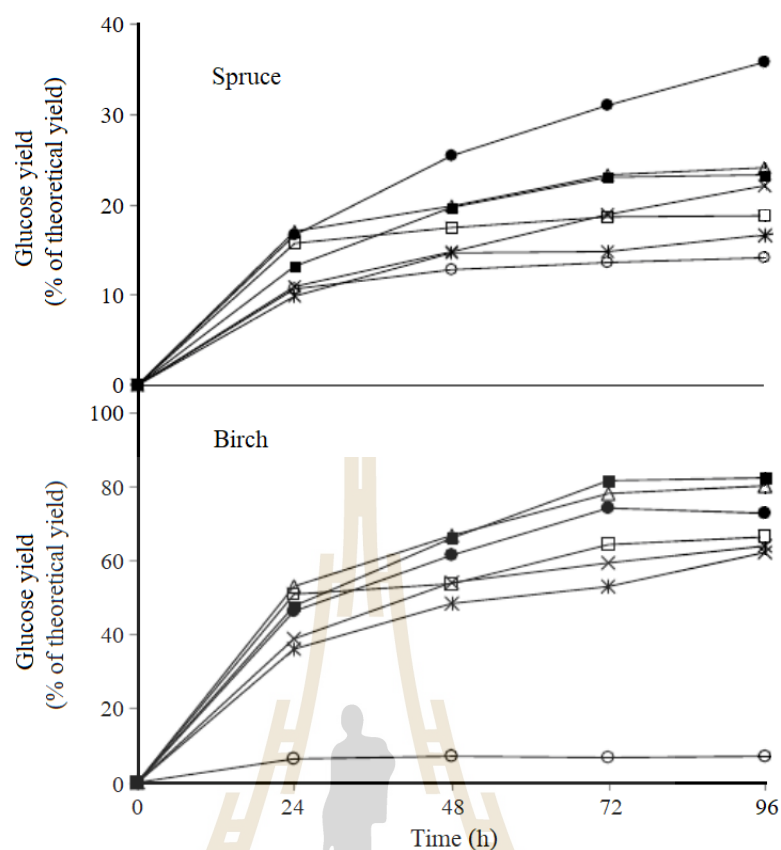
ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Sun and Cheng, 2002; Mosier et al., 2005; Hu and Wen, 2008; McIntosh and Vancov, 2011; and Chen et al. 2011)

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่างเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้พลังงานมาก โดยได้รับความนิยมมากในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งนี้เพื่อกำจัดลิกนิน (delignification) และเฮมิเซลลูโลส ปัจจุบันชนิดของด่างที่นิยมใช้ในการศึกษาการปรับสภาพมากคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ตามลำดับ (Kumar et al., 2009) นักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจศึกษาการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสหลายประเภทโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์นั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์, อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ปริมาณผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Chen et al., 2009; McIntosh and Vancov, 2011; Jaisamut et al., 2013) อย่างไรก็ตาม การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายต่างนั้นจะต้องมีการปรับค่า pH เพื่อให้เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ ให้เป็นกลางก่อน ทั้งนี้เพื่อให้ลิกโนเซลลูโลสมีสภาพที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสในขั้นตอนต่อไป (สุภาวดี ผลประเสริฐ, 2557) ลิกนินที่ถูกย่อยสลายกลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กสามารถละลายในสารละลายต่างได้เนื่องจากแรงผลักรังไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลลิกนินด้วยตัวเอง และระหว่างลิกนินกับโมเลกุลอื่นๆ ทำให้ลิกนินแต่ละโมเลกุลอยู่ห่างกัน และไม่สามารถรวมตัวเข้ามาใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้

Mirahmadi et al. (2010) ทำการปรับสภาพไม้เนื้ออ่อน spruce และไม้เนื้อแข็ง birch ด้วยสารละลายต่าง NaOH ในสถานะไม่รุนแรงเพื่อปรับปรุงการผลิตไบโอเอทานอลและก๊าซชีวภาพ การปรับสภาพทำที่อุณหภูมิระหว่าง -15 และ 100°C โดยใช้ 7.0% w/w NaOH เป็นเวลา 2 h (ตารางที่ 2.4) วัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจะถูก EnH ได้น้ำตาล ตามด้วยการหมักเอทานอลหรือย่อยแบบไร้อากาศให้ได้ก๊าซชีวภาพ โดยทั่วไปแล้วการปรับสภาพจะทำให้เกิดความสำเร็จทั้งในการผลิตเอทานอลและก๊าซชีวภาพจากไม้เนื้อแข็ง birch มากกว่าที่จะทำสำเร็จในไม้เนื้ออ่อน spruce การปรับสภาพให้ผลโดยจะไปลดปริมาณอย่างมีนัยสำคัญของเฮมิเซลลูโลสและความเป็นผลึกของเซลลูโลส ซึ่งอาจมีการตอบสนองต่อการปรับปรุงในขั้น EnH ในไม้ birch จาก 6.9% เป็น 82.3% และไม้ spruce จาก 14.1% เป็น 35.7% ผลนี้ได้จากการปรับสภาพที่ 100°C ในไม้ birch และที่ 5°C สำหรับไม้ spruce ในอันดับต่อมา นั้น ผลผลิตเอทานอลที่ดีที่สุดได้ 0.08 g/g spruce ที่ 100°C และ 0.17 g/g birch ที่ 100°C เช่นกัน ในทางกลับกัน การย่อยไม้ birch และ spruce ที่มีได้ปรับสภาพเพื่อผลิตมีเทนจะได้ปริมาณ 250 และ 30 l/kg หากปรับสภาพด้วยสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการ EnH จะได้มีเทนมากขึ้น 83% และ 74% ในไม้ birch และ spruce ตามลำดับ (ดูตารางที่ 2.4 และ รูปที่ 2.10)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของไม้ 2 ชนิดที่มีได้ปรับสภาพและปรับสภาพด้วยสารละลายต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 2 h (Mirahmadi et al., 2010)

Materials	Pretreatment Temperature (°C)	Cellulose (%)	Other sugars (%)	Acid-insoluble lignin (%)	Acid-soluble lignin (%)
Spruce	Untreated	43.0	20.8	28.3	0.53
	-15	47.1	15.1	27.0	0.47
	0	47.9	14.8	27.2	0.56
	5	50.0	15.9	27.7	0.54
	50	50.8	15.7	27.3	0.52
	80	51.1	14.5	28.4	0.48
	100	52.6	13.9	27.6	0.54
Birch	Untreated	41.0	27.9	27.0	2.68
	-15	55.8	14.9	24.6	2.73
	0	55.3	15.8	25.1	2.18
	5	52.0	17.5	24.4	2.74
	50	52.0	12.5	25.6	2.70
	80	55.2	12.0	22.2	2.62
	100	56.1	8.0	22.2	3.04

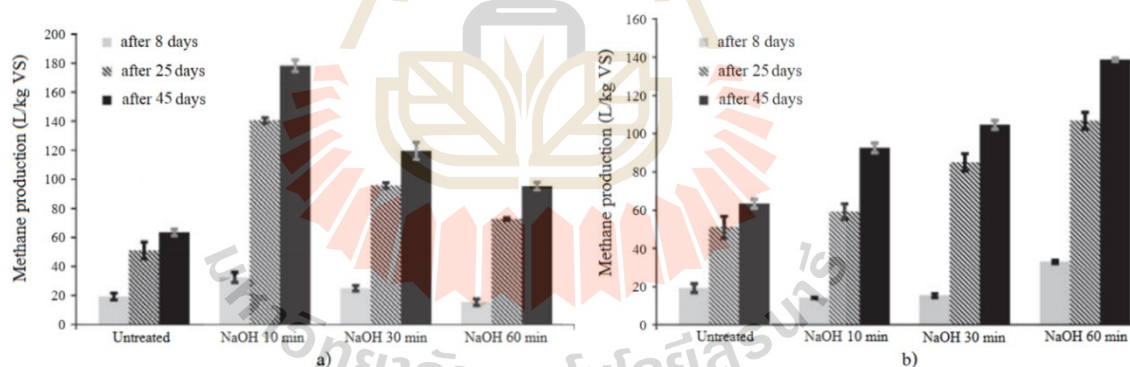


รูปที่ 2.10 ผลการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการ EnH ในไม้ Spruce และ Birch: (○) ไม้ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ, และไม้ที่ผ่านการปรับสภาพเป็น อุณหภูมิ (□) -15°C , (×) 0°C , (●) 5°C , (*) 50°C , (Δ) 80°C , (■) 100°C ปริมาณผลผลิต กลูโคสถูกคำนวณเป็นร้อยละของผลผลิตทางทฤษฎี [ผลผลิตกลูโคส = $(1.111 \times \text{ชีวมวล (g/l)}) \times \text{สัดส่วนของเซลลูโลสในชีวมวล}$] (Mirahmadi et al., 2010)

Mohsenzadeh et al. (2012) ทำการปรับสภาพไม้เนื้ออ่อน spruce และไม้เนื้อแข็ง birch เพื่อปรับปรุงการผลิตเอทานอลและก๊าซชีวภาพ ที่อุณหภูมิตั้งแต่ -15 ถึง 80°C โดยใช้สารละลาย NaOH/thiourea 7/5.5 wt%; NaOH/urea 7/12 wt%; NaOH/urea/thiourea 7/8/6.5 wt%; และ NaOH/PEG 7/1 wt% วัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วทำการ EnH เป็นเวลา 72 h พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH/thiourea ที่ -15°C สามารถปรับปรุงผลผลิตการ EnH ของไม้ spruce จาก 11.7% เป็น 57% ของค่าเชิงทฤษฎี และในไม้ birch ได้จาก 23.1% เป็น 83% ของค่าตามทฤษฎี การ EnH วัสดุที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยใช้สารละลาย NaOH/thiourea และหมักด้วยยีสต์ทำขนมปัง ได้ผล 54.0% จากค่าที่คำนวณได้ตามทฤษฎี และ 10.9% สำหรับไม้ spruce ที่มีได้ผ่านการปรับสภาพ และ 80.9% ของผลผลิตที่คำนวณตามทฤษฎีเทียบกับ 12.9% สำหรับไม้ birch ที่มีได้ผ่านการปรับ

สภาพ นอกจากนี้การย่อยโดยไม้อากาศสำหรับวัสดุที่ปรับสภาพแล้ว ได้ 0.36 L/g methane เทียบกับ 0.23 L/g สำหรับไม้ birch ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ; และ 0.21 L/g methane เทียบกับ 0.03 L/g สำหรับไม้ spruce

Salehian et al. (2013) ทำการปรับปรุงการผลิตชีวภาพจากไม้เนื้ออ่อน (สน) โดยการปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง 8%w/w NaOH ที่ 2 อุณหภูมิ คือ 0 และ 100°C ใช้เวลา 3 ช่วง คือ 10, 30 และ 60 min แล้วย่อยแบบไร้อากาศเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ ผลการทดลองพบนัยสำคัญต่อปริมาณก๊าซมีเทนจากการปรับสภาพถูกสังเกตได้อย่างชัดเจน การปรับปรุงที่ดีที่สุดได้จากการปรับสภาพด้วยอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 min (รูปที่ 2.11 a) ซึ่งได้ผลการปรับปรุงสูงถึง 181.2% สำหรับผลผลิตก๊าซมีเทน ขณะที่การใช้อุณหภูมิ 0°C จะมีประสิทธิภาพเมื่อใช้เวลาในการปรับสภาพที่ยาวนานที่สุด 60 min ได้มีมีเทน 118.6% เมื่อเทียบกับไม้ที่ไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ (รูปที่ 2.11 b) นอกจากนี้ ETIR ถูกใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสของไม้ที่ทำกรปรับสภาพแล้ว ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการลดลงของผลึกเซลลูโลสเนื่องจากการปรับสภาพ นอกจากนี้ ภาพถ่าย SEM ได้แสดงถึงการแตกทำลายของโครงสร้างที่แข็งแรงของไม้สน ซึ่งมีผลตอบสนองต่อการปรับปรุงผลผลิตมีเทน



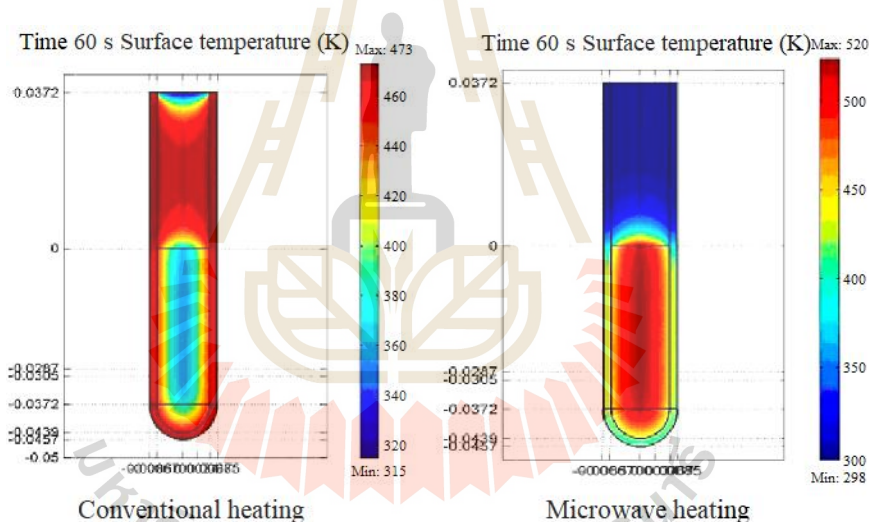
รูปที่ 2.11 ปริมาณมีเทนสะสมที่ได้จากไม้สนที่ไม่ได้ปรับสภาพและที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว (a) ที่อุณหภูมิ 100°C, และ (b) 0°C; (Salehian et al., 2013)

2.5.3 การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง

การปรับสภาพวัสดุดิบโดยให้ความร้อนจาก boiler เป็นวิธีแบบดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งให้ความร้อนด้วยวิธีการนำความร้อนแพร่เข้าไปสู่สารแขวนลอยลิกโนเซลลูโลสในสารละลายต่างอย่างช้าๆ (superficial) ตามลำดับอย่างไม่เลือกตำแหน่ง ขณะที่การใช้คลื่นไมโครเวฟจะเกิดความร้อนต่อปริมาตรสาร (volumetric) ทั้งสิ้นอย่างรวดเร็วก่อให้เกิดความดัน

ภายในเซลล์ (internal pressure) ทำให้โครงสร้างผนังเซลล์แตก (Kratchanova et al., 2004, Kute et al., 2015) โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วนี้เป็นเพียงเหตุผลหนึ่ง มิใช่กลไกทางเคมีเชิงฟิสิกส์ที่สามารถอธิบายการแตกของผลึกเซลลูโลสได้ชัดเจนนัก ด้วยว่าเหตุผลสำคัญเกิดจากบริเวณโมเลกุลที่มีสภาพขั้วสูงกว่าจะเกิดการสั่นไปในด้านตรงข้ามแรงไฟฟ้าของคลื่นไมโครเวฟ ณ ตำแหน่งนั้นๆ จะเกิด hot spot หรือจุดความร้อนยิ่งยวด (superheating) (Kriegsmann, 1997) บริเวณหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลที่มีค่า dielectric loss สูง หรือตำแหน่งที่มีสภาพขั้ว (polarity) สูงหรือระหว่างพันธะที่เกิดจากแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ของโมเลกุลนั้นๆ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า thermal microwave effect (Jacob et al., (1995); Sudrik et al., (2002); Obermayer et al., (2009); Quitain, (2013)) มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อกระบวนการทางเคมีอินทรีย์ที่ใช้คลื่นไมโครเวฟตลอด 3 ทศวรรษที่ผ่านมา (Tsubaki et al., 2016) มีงานตีพิมพ์ที่เกี่ยวข้องจำนวนมากขึ้นในไม่กี่สิบปีมานี้ โดยเฉพาะตั้งแต่ปี 2003 ซึ่งมีเครื่องไมโครเวฟแบบใหม่ที่สามารถเชื่อถือและเข้าถึงได้ง่ายโดยทั่วไป โดยงานวิจัยจำนวนมากยืนยันการมีอยู่ของ hot spot ที่เกิดจากการแผ่รังสีของไมโครเวฟ เพราะสามารถทำให้บางปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่สภาพปฏิกิริยาไม่รุนแรง ทำให้เกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific and selective reaction) (Kappe et al., 2008, Dudley et al., 2015) ทั้งที่การให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมไม่สามารถทำได้ (De la Hoz et al., 2005) ในทางโครงสร้างจุลภาคของวัสดุชีวเคมี การแผ่รังสีของไมโครเวฟสามารถทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E.coli* (Shamis et al., 2011) การสร้างความเสียหายต่อโครงสร้าง endospore ของ *Bacillus licheniformis* ซึ่งต้านทานการถูกทำลายด้วยความร้อนสูง (Kim et al., 2009) การแตกโครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา *Penicillium sp.* (Han et al., 2013) โครงสร้างผนังเซลล์ microalgae เพื่อสกัดสารภายใน (Cheng et al., 2013) และช่วยแตก (explosion) โครงสร้างผลึกเซลลูโลส (crystalline cellulose) (Hu & When, 2008) ทำลายพอลิแซ็กคาไรด์ของขึ้นไม้ที่มีความซับซ้อน (Plazenet et al., 2015) โดย hot spot ในสารเนื้อไม้สม่ำเสมอจะเกิดความร้อนยิ่งยวดที่สูงกว่าอุณหภูมิเฉลี่ยของสารที่วัดได้ (macroscopic temperature) ซึ่งตำแหน่งนั้นมีใช้ตัวแทนสภาพปฏิกิริยาทั้งสิ้น และส่วนที่มีสภาพขั้วต่ำ จะเป็น non thermal effect ที่เกี่ยวข้องการเพิ่มอุณหภูมิที่ได้รับอิทธิพลจากรังสีไมโครเวฟโดยตรง และอาจส่งผลให้รักษาโครงสร้างสารที่ไวต่ออุณหภูมิ (sensitive compounds หรือ thermally unstable compounds) บางอย่างไว้ ทั้ง thermal effect และ non thermal effect นี้เรียกได้ว่าเป็น selective heating นอกจากนี้เป็นที่ยอมรับกันตามทฤษฎีการชน (collision of theory) ที่เสนอโดย Trautz ในปี 1916 ว่า การเกิดปฏิกิริยาเคมีใดๆ จะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่ออนุภาคของตัวทำปฏิกิริยา (อะตอม, ไอออน หรือ โมเลกุล) เกิดการชนกันด้วยทิศทางที่เหมาะสม (orientation of collision) และด้วยพลังงานของการชนที่มากพอ (energy of collision หรือพลังงานก่อกัมมันต์, activation energy) ในกรณีนี้ แม้ว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมจะทำให้อนุภาคของตัวทำปฏิกิริยามีพลังงานจลน์สูงขึ้น โอกาสการชนกันในทิศทางที่เกิดปฏิกิริยามีมากขึ้น

แต่การหมุนตามแรงไฟฟ้าของคลื่นไมโครเวฟก็ทำให้เกิดทั้งความร้อนที่ทำให้เกิดพลังงานจลน์แก่อนุภาคของตัวทำปฏิกิริยา ทั้งยังเกิดการหมุนและสั่นโมเลกุลไดอิเล็กทริก เกิดการเคลื่อนที่และแพร่ของโมเลกุลอย่างรวดเร็ว เพิ่มโอกาสและประสิทธิภาพการชนกันของโมเลกุลในตำแหน่งที่ถูกต้อง ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้นยิ่งกว่าการได้พลังงานจลน์จากความร้อนแต่เพียงอย่างเดียว (Banik et al., 2003; Gabhane et al., 2011) มีรายงานว่าความร้อนจากการอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟต่อการสลายโครงสร้างเซลล์ulos เกิดจากการเคลื่อนที่อย่างอิสระของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, $-CH_2OH$) และมีความเป็นไปได้ที่การสั่นของคลื่นจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ของสารชอบนิวเคลียสหรือมีประจุลบ (nucleophilic substitution) ทำให้กลูโคสหลุดออกจากสายเซลล์ulos และสายเซลล์ulos นั้นมีความหนาแน่นน้อยลง (Fan, 2013); อาจกล่าวได้ว่าเทคโนโลยีการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับกรรมวิธีการปรับสภาพลิกโนเซลล์ulos มีประสิทธิภาพมาก ใช้เวลาสั้น ปฏิบัติได้ทางเศรษฐศาสตร์ในการขจัดเอมิเซลล์ulos และลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Puligundla et al., 2016)



รูปที่ 2.12 เปรียบเทียบอุณหภูมิพื้นผิวเมื่อให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมกับให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (Rosana et al., 2014)

การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟถือเป็นวิธีแบบไม่ดั้งเดิม (non-conventional method) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการขจัดลิกนินและช่วยทำลายโครงสร้างผลึกเซลล์ulos ได้ดีกว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม (Xiong et al., 2000) เนื่องจากสภาพเนื้อสารจะไม่มีความร้อนสม่ำเสมอ บริเวณที่มีสภาพขั้วสูงกว่ามีสมบัติไดอิเล็กทริกที่สูงกว่า เมื่อได้รับพลังงานจากการแผ่คลื่นไมโครเวฟจะเกิดการสั่นและชนกันของโมเลกุล บริเวณนี้จะเกิดจุดความร้อนสูงในเนื้อสารอย่างรวดเร็ว ช่วยให้โครงสร้างลิกโนเซลล์ulos แตกออกนับเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ

นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ร่วมกับการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีได้ง่าย (Zhu et al., 2006a; Hu and Wen 2008; Boonsombuti, 2013) ดังนั้นการนำเทคโนโลยีที่ทันสมัยและไม่ก่อให้เกิดมลพิษ (modern and green technology) เช่น คลื่นไมโครเวฟมาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังซึ่งจะช่วยลดข้อจำกัดลงได้

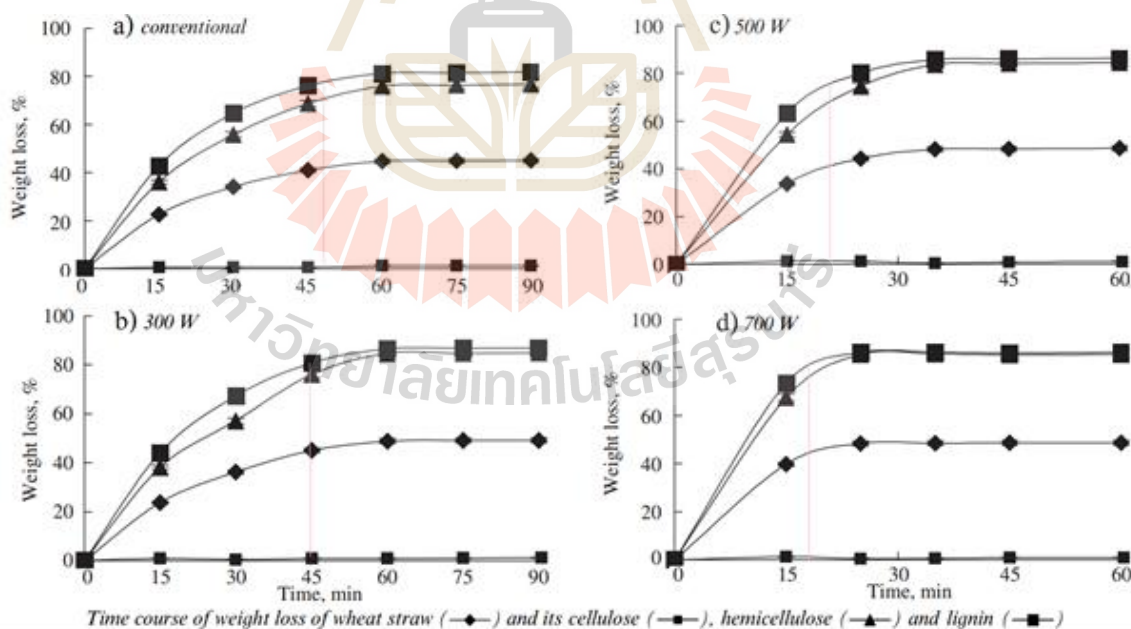
Zhu et al. (2005a) ใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้ 3 กรรมวิธี ได้แก่ a) การใช้คลื่นไมโครเวฟเดี่ยวๆ b) การใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (MAP) พร้อมกัน c) การปรับสภาพด้วยสารละลายต่างจากนั้นจึงใช้คลื่นไมโครเวฟ ซึ่งทดสอบเทียบกับการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างด้วยวิธีการดั้งเดิม จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในขั้นการ EnH พบว่าการ MAP สามารถเร่งอัตราการ EnH ได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ปริมาณผลผลิตมิได้เปลี่ยนแปลง

Zhu et al. (2005b) ปรับสภาพเบื้องต้นแก่ฟางข้าวโดยใช้ MAP จากนั้นตรวจผลผลิตการไฮโดรไลซิส เทียบกับวิธีการใช้สารละลายต่างอย่างเดี่ยว ผลของกำลังคลื่นไมโครเวฟและระยะเวลาต่อน้ำหนักฟางข้าวที่ลดลงและองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงพบว่าการปรับสภาพโดยใช้ระยะเวลาสั้นแต่กำลังไมโครเวฟสูง และระยะเวลานานแต่กำลังไมโครเวฟต่ำๆ ที่ผลรวมการใช้พลังงานเท่ากันนั้น น้ำหนัก ปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสของฟางข้าวนั้น โดยมากแล้วมีค่าใกล้เคียงกัน และหากปรับสภาพเบื้องต้นด้วยกำลังคลื่นไมโครเวฟ 700 W เป็นเวลา 30 min ฟางข้าวจะมีน้ำหนักลดลง 44.6% มีปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 69.2%, 4.9%, 10.2% ตามลำดับ แต่หากใช้สารละลายต่างอย่างเดี่ยว ฟางข้าวจะมีน้ำหนักลดลง 41.5% มีปริมาณเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 65.4%, 6.0% และ 14.3% ตามลำดับเมื่อใช้เวลา 70 min. ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการ MAP สามารถขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกจากฟางข้าวโดยใช้ระยะเวลาอันสั้นเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายต่างอย่างเดี่ยว นอกจากนี้การไฮโดรไลซิสฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้เอนไซม์ (substrate concentration 50 g/L, enzyme loading 20 mg/g substrate) พบว่าฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการ MAP มีผลผลิตกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสสูงกว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้สารละลายต่างอย่างเดี่ยว

ในอีกงานหนึ่งของ Zhu et al. (2005c) ทำการผลิตน้ำตาลพร้อมๆ กับการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) โดยใช้วิธีการที่แตกต่างกัน 2 แบบ โดยฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วถูกนำไปหมักเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เซลล์จาก *Trichoderma reesei* และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* YC-097-ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้การ MAP มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำ SSF คือ 100 g substrate/L, 40°C, 15 mg cellulase/g substrate, pH เริ่มต้น 5.3 เวลา 72 h. ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว จะได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงถึง 25.8 g/L คิดเป็นผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) 57.5% หากทำ SSF กับฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้สารละลายต่างอย่างเดี่ยว (ไม่ใช้คลื่น

ไมโครเวฟ) ควรใช้ 100 g substrate/L, 40°C, 20 mg cellulase/g substrate, pH เริ่มต้น 5.3 เป็นเวลา 96 h. ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับฟางข้าวเช่นนี้ จะทำSSF ได้เอทานอลความเข้มข้น 23.7 g/L คิดเป็นผลผลิตเอทานอล 52.8% ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าผลผลิตเอทานอลจากการทำSSF ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยMAP ใช้ enzyme loading ที่ต่ำกว่า ระยะเวลาสั้นกว่า ได้ความเข้มข้นของเอทานอลและร้อยละของผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการทำSSF กับฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นโดยใช้สารละลายต่างอย่างเดียวกัน ดังนั้นการปรับสภาพเบื้องต้นโดยด้วยMAP เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล

Zhu et al. (2006a) ศึกษากำลังของคลื่นไมโครเวฟและเวลาที่ใช้ต่อน้ำหนักที่ลดลงและส่วนประกอบของฟางข้าวสาลีที่ทำการศึกษา พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังสูง ระยะเวลาที่สั้นกว่า และการใช้คลื่นไมโครเวฟกำลังต่ำที่ระยะเวลายาวนานกว่า (เมื่อกำหนดให้มีการใช้พลังงานเท่ากัน) จะได้ผลของน้ำหนักที่ลดลงและองค์ประกอบที่เหมือนๆ กัน การเปรียบเทียบผลของการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง และการใช้ต่างและความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม ใช้คลื่นไมโครเวฟ ความถี่ 2,450 MHz กำลัง 300, 500 และ 700 W ร่วมกับสารละลายต่าง (รูปที่ 2.13 a, b, c และ d ตามลำดับ)



รูปที่ 2.13 ปริมาณน้ำหนักฟางข้าวสาลีที่ลดลง, เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เมื่อปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง และ (a) ความร้อนวิธีการดั้งเดิม, (b) คลื่นไมโครเวฟกำลัง 300 W, (c) 500 W และ (d) 700W; (Zhu et al., 2006a)

ในการปรับสภาพฟางข้าวสาทิใช้ฟาง 20 g ใน 1% NaOH 160 mL 15 min -2 h เทียบกับการให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมด้วยปริมาณ solid content ในค่าที่ความเข้มข้นและปริมาตรเท่ากัน พบว่าเมื่อใช้คลื่นไมโครเวฟ 700 W 25 min ฟางข้าวสาทิจะมีน้ำหนักลดลง 48.4% และมีองค์ประกอบของเซลลูโลส 79.6% ลิกนิน 5.7% และเฮมิเซลลูโลส 7.8% เทียบกับการใช้ค่าโดยใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม ฟางข้าวสาทิจะมีน้ำหนักลดลง 44.7% และมีองค์ประกอบของเซลลูโลส 73.5% ลิกนิน 7.2% และเฮมิเซลลูโลส 11.2% ทั้งยังต้องใช้เวลาถึง 60 min ในการปรับสภาพ สรุปว่าการ MAP สามารถจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวสาทิได้มากกว่า และใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ค่าและความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม ท้ายสุดนี้ การ EnH ของฟางข้าวสาทิที่ทำการปรับสภาพแล้ว (ใช้ enzyme loading 20 mg/g substrate และ ปริมาณฟางข้าวสาทิที่แขวนลอยในสารละลายแขวนลอยเอนไซม์-ฟางข้าวสาทิมีค่า 50 g/L) ก็ได้ถูกตรวจสอบด้วย และผลการทดลองพบว่าฟางข้าวสาทิที่ผ่านการการ MAP มีอัตราการ EnH ที่สูงกว่า ได้รับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่า และปริมาณกลูโคสใน hydrolysate ก็มากกว่า เมื่อเทียบกับฟางข้าวสาทิที่ใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมร่วมกับสารละลายต่าง

ตารางที่ 2.5 แสดงน้ำหนักฟางข้าวที่ลดลงหลังผ่านการปรับสภาพในขั้นตอนต่างๆ (Zhu et al., 2006b)

Pre-treatment method	Weight loss (%)		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3
Microwave-alkali	44.6±0.5	-	-
Microwave-acid / Microwave-alkali	29.7±0.3	21.6±0.4	-
Microwave-acid / Microwave-alkali / H ₂ O ₂	29.7±0.3	21.6±0.4	3.2±0.2

Zhu et al. (2006b) ทำการเปรียบเทียบการใช้คลื่นไมโครเวฟและสารเคมีเพื่อทำการปรับสภาพฟางข้าวเนื่องจากการให้ความร้อนจากอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟมีประสิทธิภาพสูงกว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม ใช้คลื่นไมโครเวฟความถี่ 2,450 MHz กำลัง 300 W การทดสอบ 3 สถานะการปรับสภาพ ได้แก่ a) การ MAP โดยใช้ฟางข้าว 20 g ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 160 mL ฉายคลื่น 60 min; b) ใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายกรด 2% H₂SO₄ ฉายคลื่น 30 min จากนั้นนำ residue มาปรับสภาพต่อด้วย 1% NaOH 160 mL ฉายคลื่น 30 min; และ c) ใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับใช้สารละลายกรดจากนั้นใช้สารละลายต่างแล้วตามด้วย 0.3% H₂O₂ ในที่มีดเป็นเวลา 12 h; แต่ละสถานะการทดลองทำการ EnH และกัวโซโลสคีนมาจาก pretreatment liquor อันดับแรก พบว่าผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟ พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับใช้สารละลายกรดจากนั้นใช้สารละลายต่างแล้วตามด้วย H₂O₂ ทำให้ชีวมวลมีน้ำหนักลดลง

มากที่สุด (ตารางที่ 2.5) และมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด การศึกษาการกักเก็บไซโลส พบว่าไซโลสไม่สามารถถูกกักเก็บได้ในสภาพต่าง แต่จะสามารถกักเก็บได้ในรูปผลึกระหว่างกระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายกรดจากนั้นใช้สารละลายด่าง และใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับใช้สารละลายกรดจากนั้นใช้สารละลายด่างแล้วตามด้วย H_2O_2 อันดับสุดท้าย, ฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยกระบวนการใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับใช้สารละลายกรดจากนั้นใช้สารละลายด่างแล้วตามด้วย H_2O_2 มีอัตราการไฮโดรไลซิสสูงที่สุด และมีปริมาณกลูโคสใน hydrolysate สูงที่สุด

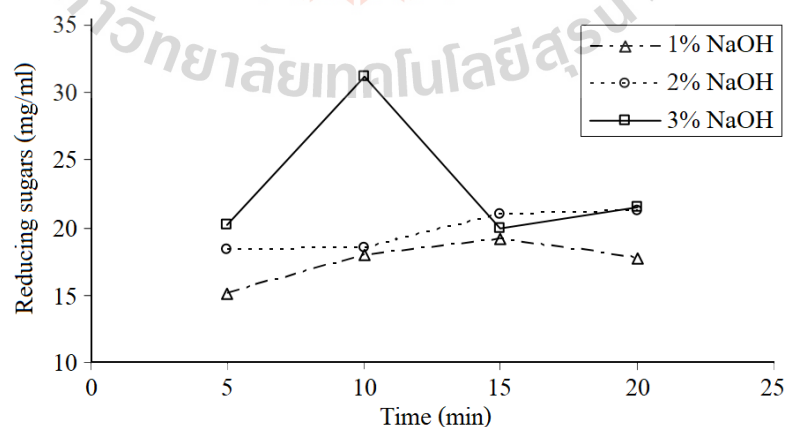
Zhu et al. (2006c) ใช้คลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพฟางข้าวเพื่อยกระดับการ EnH โดยเปรียบเทียบกับ microwave irradiation free hydrolysis, ฟางข้าวที่ผ่านการ MAP สามารถเพิ่มอัตราการไฮโดรไลซิสในระยะเริ่มแรกได้ ทว่าผลผลิตการ EnH รวมนั้นยังคงเท่าเดิม เมื่อฉายคลื่นไมโครเวฟแก่สารแขวนลอยเอนไซม์ อัตราการไฮโดรไลซิสขั้นต้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ผลผลิตลดลงอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ เมื่อใช้คลื่นไมโครเวฟแบบไม่สม่ำเสมอ (intermittent microwave irradiation) อัตราการ EnH ระยะแรกจะสูงอย่างมาก แต่ผลผลิตจะลดลงเล็กน้อย สภาพการ EnH ที่เหมาะสมที่สุดคืออุณหภูมิ $50^{\circ}C$, pH 4.8 และ enzyme loading 20 mg/g substrate

Zhu et al. (2006d) ได้ทำการผลิตน้ำตาลพร้อมๆ กับการหมัก (SSF) โดยใช้คลื่นไมโครเวฟความถี่ 2450 MHz กำลัง 700 W ร่วมกับสารละลายด่าง 1% NaOH 160 mL, ฟางข้าวสาลี 20 g, 25 min และความร้อนแบบดั้งเดิมร่วมกับสารละลายด่างเทียบกับการใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมร่วมกับสารละลายด่าง 1% NaOH 160 mL, ฟางข้าวสาลี 20 g, 60 min การปรับสภาพถูกหาค่าที่เหมาะสมที่สุดและเทียบกันระหว่างเซลล์ที่ได้จาก *Trichoderma reesei* และ *S. cerevisiae* YC-097 พบว่าค่าที่เหมาะสมที่สุดของ SSF สำหรับปรับสภาพฟางข้าวสาลีด้วย MAP ควรใช้ 100 g substrate/L ที่ $40^{\circ}C$ เอนไซม์เซลลูเลส 15 mg/g substrate pH เริ่มต้น 5.3 เป็นเวลา 72 h ภายได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดนี้จะให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงถึง 34.3 g/L และผลผลิตเอทานอลมีค่า 69.3%; ค่าที่เหมาะสมที่สุดของ SSF สำหรับการใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมร่วมกับสารละลายด่างเพื่อปรับสภาพฟางข้าวสาลี พบว่าควรใช้ 100 g substrate/L ที่ $40^{\circ}C$ เอนไซม์เซลลูเลส 20 mg/g substrate pH เริ่มต้น 5.3 เป็นเวลา 96 h ภายได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดนี้จะให้ความเข้มข้นของเอทานอล 31.1 g/L และผลผลิตเอทานอลมีค่า 64.8% สังเกตได้ว่าการผลิตเอทานอลโดยปรับสภาพฟางข้าวสาลีด้วยการ MAP ใช้ค่า enzyme loading ที่ต่ำกว่า เวลาที่ต้องใช้ในการทำปฏิกิริยาสั้นกว่า และสามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นและปริมาณผลิตผลที่สูงกว่าการให้ความร้อนแบบดั้งเดิมร่วมกับสารละลายด่าง ฉะนั้นการใช้คลื่นไมโครเวฟจึงมีประสิทธิภาพในการปรับสภาพฟางข้าวสาลีเพื่อผลิตเป็นเอทานอลได้ดีกว่า

Keshwani et al. (2007) ได้ใช้คลื่นไมโครเวฟ กำลัง 125-1,250 W ชีวมวลมี solid loading 10% (ตารางที่ 2.6) การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด ใช้ 1, 2, 3% H_2SO_4 การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง ใช้ 1, 2, 3% NaOH เวลาฉายคลื่น 5, 10, 15 หรือ 20 min เพื่อประเมินสถานะการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด ตัวอย่างหญ้าสวิตชกราสส์ถูกจุ่มในน้ำ, กรดซัลฟิวริกเจือจาง และสารละลายด่างเจือจาง โดยฉายคลื่นไมโครเวฟที่ระดับกำลังต่างๆ เป็นเวลาต่างๆ ของแข็งที่เหลือจากการปรับสภาพนำมาทำการ EnH ทำการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ใน hydrolysate พบว่าการฉายคลื่นไมโครเวฟที่ระดับกำลังต่างๆ ให้ประสิทธิภาพอย่างมากต่อการ EnH การใช้คลื่นไมโครเวฟ 250 W เป็นเวลา 10 min แก่หญ้าสวิตชกราสส์ที่จุ่มในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 3% w/v จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด (รูปที่ 2.14) ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับทำให้ความร้อนแบบดั้งเดิมด้วยการปรับสภาพหญ้าสวิตชกราสส์ด้วยสารละลายด่างเป็นเวลา 60 min (ตารางที่ 2.7) การทดลองสรุปว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพหญ้าสวิตชกราสส์ร่วมกับสารละลายด่างช่วยสนับสนุนการ EnH

ตารางที่ 2.6 ปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละกรรมวิธีปรับสภาพ (Keshwani et al., 2007)

Pretreatment conditions	Vessel type	Reducing sugar yield (mg/ml)
1250W-1 min	Capped glass	5.18
1250W-2 min	Capped glass	4.96
1250W-5 min	Capped glass	3.32
1250W-1 min	Sealed ptfe tube	5.99
Untreated biomass - control	-	4.87



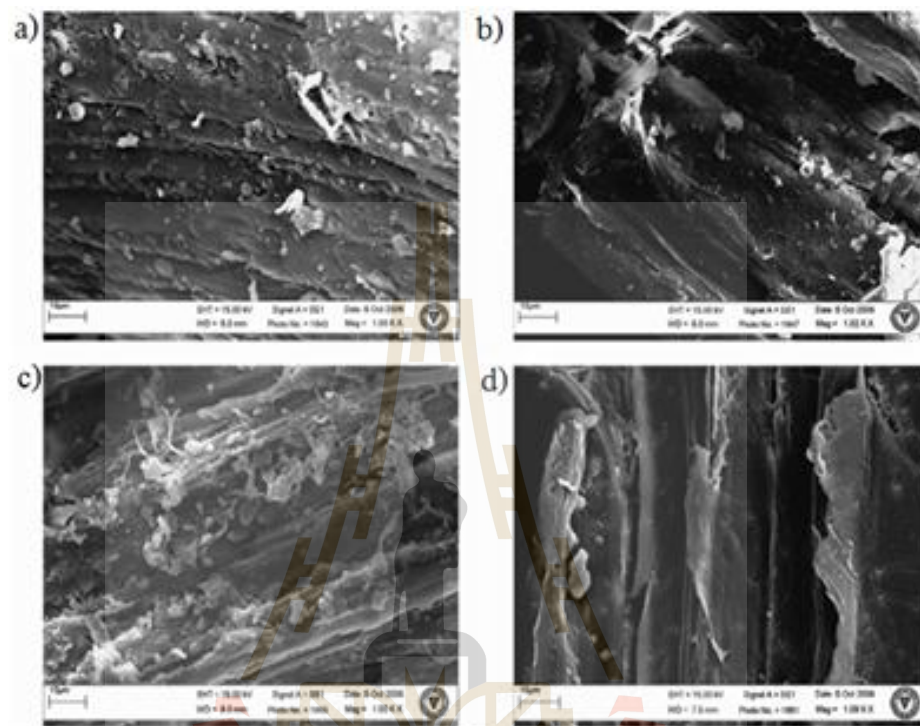
รูปที่ 2.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เมื่อทำการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ 250 W กับสารละลายด่างความเข้มข้นต่างๆ (Keshwani et al., 2007)

ตารางที่ 2.7 แสดงผลการเปรียบเทียบการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดหรือด่างโดยความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม หรือใช้คลื่นไมโครเวฟกำลัง 250 W (Keshwani et al., 2007)

Pretreatment conditions	Reducing sugar yield (mg/ml)
2% H ₂ SO ₄ – 60 min	8.53
2% NaOH – 60 min	27.03
Microwave - 2% H ₂ SO ₄ - 15 min	6.08
Microwave-2% NaOH - 10 min	21.23

Hu and Wen (2008) ได้ใช้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพหญ้าสวิตชกราสส์ ซึ่งจะถูกนำไป EnH ด้วยเซลลูเลส เมื่อหญ้าสวิตชกราสส์จุ่มในน้ำและปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ น้ำตาลทั้งหมด (กลูโคส+ไซโลส) ที่ผลิตได้จากสภาวะการปรับสภาพที่นำมาใช้ร่วมกันมีค่า 34.5g/100g ชีวมวล ซึ่งเทียบได้กับ 58.5% ของปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่สามารถปลดปล่อยให้ได้ ค่าน้ำตาลนี้สูงกว่าการให้ความร้อนหญ้าสวิตชกราสส์แบบดั้งเดิมถึง 53% เพื่อที่จะปรับปรุงผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ในขั้นต่อไป หญ้าสวิตชกราสส์จะถูกจุ่มเบื้องต้นในสารละลายด่างที่ความเข้มข้นแตกต่างกันและปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟหรือด้วยการให้ความร้อนแบบดั้งเดิม ปริมาณต่างบรรจุ (alkali loading) ที่ใช้มีค่าตั้งแต่ 0.05-0.3 g alkali/g biomass, การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟให้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีดั้งเดิม โดยผลิตภัณฑ์สูงสุด (90% ของศักยภาพน้ำตาลสูงสุด) ได้จาก 0.1 g/g ของปริมาณต่างบรรจุ. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดได้แสดงให้เห็นถึงข้อดีของการใช้คลื่นไมโครเวฟเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนแบบดั้งเดิม เนื่องจากคลื่นไมโครเวฟจะทำลายโครงสร้างที่แข็ง ในท้ายที่สุดนี้ ผลกระทบจากอุณหภูมิ, ปริมาณของแข็ง และเวลาการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟสำหรับหญ้าสวิตชกราสส์ได้ถูกตรวจสอบ ที่สภาวะเหมาะสมที่สุด 190°C, 50 g/L solid content, เวลาในการปรับสภาพ 30 min ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและไฮโดรไลซ์ มี 58.7 g/100 g biomass, เทียบเท่า 99% ของศักยภาพน้ำตาลสูงสุดที่สามารถให้ได้ ผลการสาธิตได้ทำให้เห็นว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างเป็นเส้นทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงความสามารถในการย่อยหญ้าสวิตชกราสส์โดยไซเอนไซม์ พิจารณารูปที่ 2.15 a) เนื้อของหญ้าสวิตชกราสส์ที่เป็นวัตถุดิบมีลักษณะรัดกุมและห่อหุ้มด้วยฟิล์มบาง ซึ่งอาจพบชั้นผิวที่เป็นไข (wax) อันพบได้ทั่วไปใน herbaceous biomass (ชีวมวลไม้ที่ไม่ใช่ไม้ยืนต้นเนื้อแข็ง) หลังจากปรับสภาพด้วยความร้อนโดยใช้วิธีดั้งเดิม 190°C ชั้นฟิล์มบางที่เป็นไขบนพื้นผิวจะหายไป แม้ว่าโครงสร้างโดยภาพรวมของตัวอย่างยังคงค่อนข้างครบถ้วน 2.15 b) เมื่อหญ้าสวิตชกราสส์ถูกปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ จะปรากฏเม็ดแกรนูลจำนวนมากบนพื้นผิว 2.15 c) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโครงสร้างลิกนินแตกออกบางส่วน แม้ว่า

ลิกนินเหล่านั้นยังคงอยู่บนผิวอนุภาค และสำหรับหญ้าสวิตชกราสส์ที่จุ่มเบื่องต้นในสารละลายต่าง และปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ พบว่าวัสดุจะมีลักษณะบางและเป็นริ้วลายขนาน 2.15 d) ซึ่งให้เห็นว่าลิกนินถูกละลายดั่งนั้นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกเปิดออกมากยิ่งขึ้น



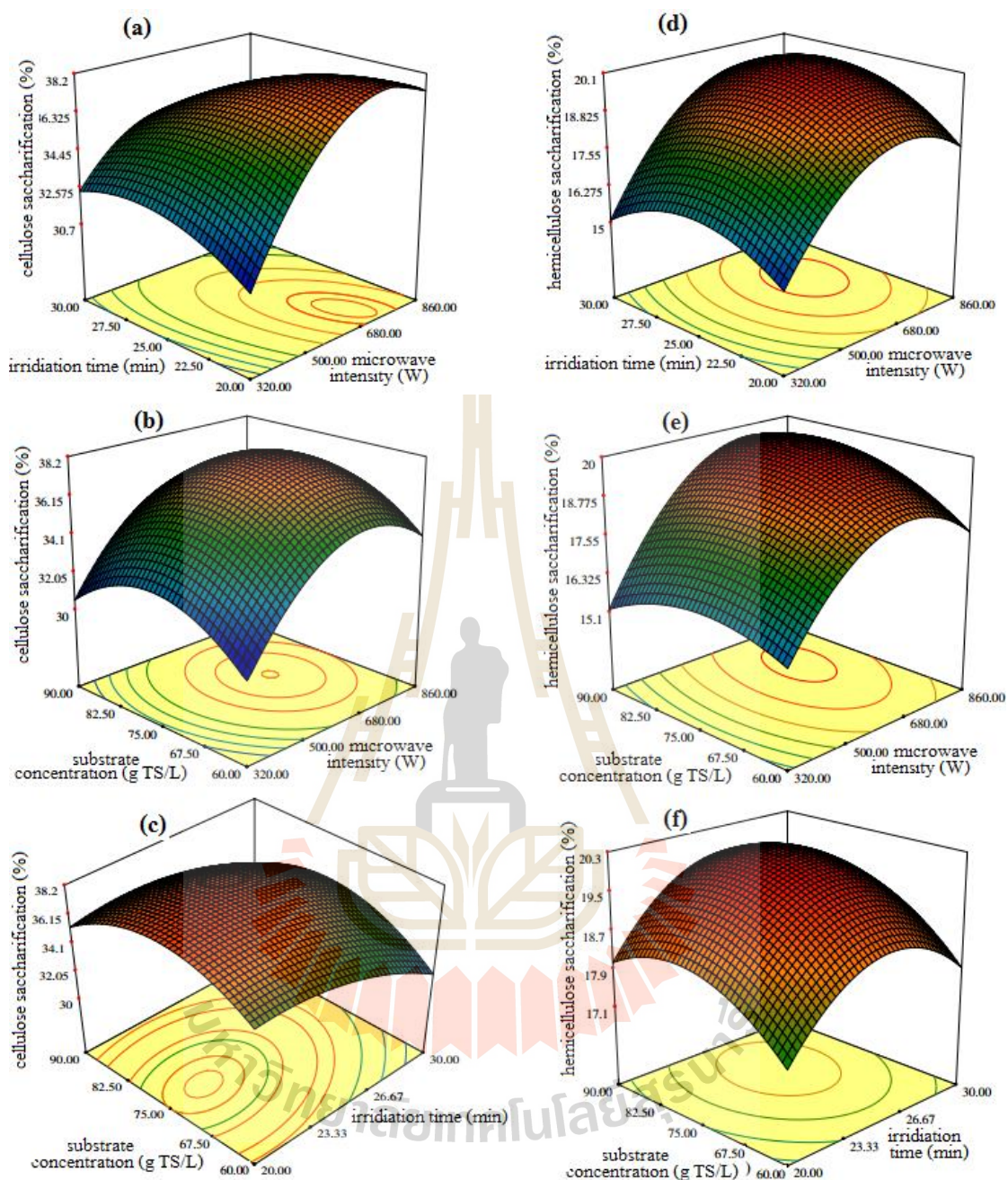
รูปที่ 2.15 ภาพถ่ายหญ้าสวิตชกราสส์จากงานของ Hu and Wen (2008) ถ่ายด้วยกล้อง SEM (1000x) a) หญ้าสวิตชกราสส์ดิบปราศจากการปรับสภาพ, b) วัสดุหลังจากผสมกับน้ำ และให้ความร้อนแบบดั้งเดิมที่ 190°C ปริมาณของแข็ง 100 g/L เป็นเวลา 30 min , c) วัสดุ หลังจากผสมกับน้ำและปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟที่ 190°C ปริมาณของแข็ง 100 g/L เป็นเวลา 30 min , d) วัสดุหลังจุ่มเบื่องต้นด้วยสารละลายต่าง $0.1\text{ g alkali/g biomass}$ เป็นเวลา 2 h และนำมาปรับสภาพโดยให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟที่ 190°C ปริมาณของแข็ง 100 g/L เป็นเวลา 30 min

Ma et al. (2008) ปรับสภาพฟางข้าวด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อเพิ่มการทำให้ได้น้ำตาลในกระบวนการ EnH ออกแบบการทดลองโดยใช้ Box-Behnken design และ RSM เพื่อวางแผนหาค่าที่เหมาะสมที่สุด การทดลองได้แสดงให้เห็นว่ากำลังของคลื่นไมโครเวฟ, ระยะเวลาการฉายคลื่น และความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นปัจจัยหลัก จะได้ค่าสูงสุดของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และการทำให้

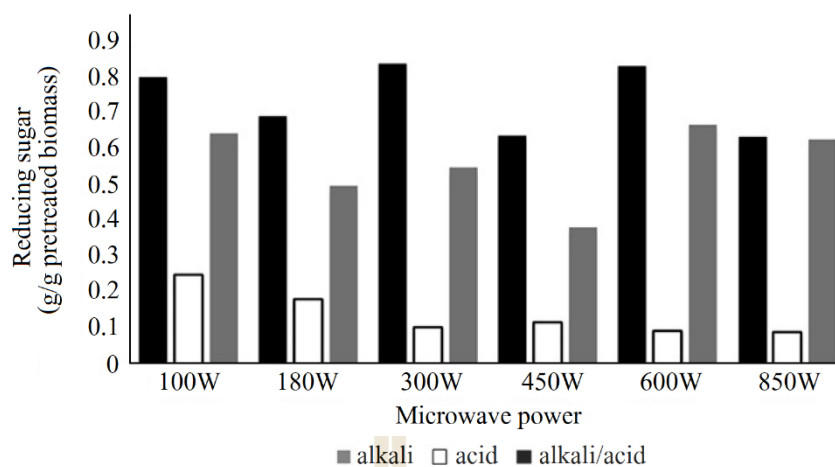
ได้น้ำตาลสูงสุด 30.6%, 43.3% และ 30.3% ตามลำดับเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ กำลังคลื่นไมโครเวฟ 680 W ระยะเวลาการฉายคลื่น 24 min ความเข้มข้นของสับสเตรท 75 g/L พิจารณารูปที่ 2.16 นอกจากนี้ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของฟางข้าวยังพบว่าการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟจะทำลายไซลิกอนที่ผิวใบฟาง สลายโครงสร้างที่ซับซ้อนของ lignin hemicellulose complex นอกจากนี้ยังขจัดปริมาณไซลิกอนและลิกนินออกบางส่วน

Singh et al. (2011) ใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (200-800 W 100°C เวลา 15-30 min) พิจารณาพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญต่อการปรับสภาพถูกระบุลงใน Plackett-Burman design และพารามิเตอร์ที่ส่งผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญจะถูกหาค่าที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ Box Behnken design (BBD) ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายต่าง, ระยะเวลาการฉายคลื่น และความเข้มข้นของสับสเตรท เป็นแฟกเตอร์หลักในการควบคุมการทำให้ได้น้ำตาลของฟางและแกลบ ขณะที่ BBD ได้คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปรับสภาพ คือความเข้มข้นของสารละลายต่าง 2.75% ระยะเวลาฉายคลื่น 22.50 min และความเข้มข้นของสับสเตรท 30 g/L การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ย่อยลิกโนเซลลูโลสจาก *Aspergillus heteromorphus* การหมักสถานะของแข็งถูกใช้กับฟางข้าวและแกลบที่ปรับสภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเซลลูเลสและไซลานเนสเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการหมัก ขณะที่ค่าสูงสุดของ Manganese peroxide (MnP) และกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสได้ปรากฏขึ้นในวันที่ 12

Binod et al. (2012) ทำการปรับสภาพขานอ้อย ใน 3 รูปแบบคือ a) ใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายกรด b) ใช้ MAP และ c) MAP จากนั้นใช้สารละลายกรด พบว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลต่ำในทุกสภาวะการปรับสภาพ (พิจารณารูปที่ 2.17) ขณะที่การใช้สารละลาย 1% NaOH ร่วมกับคลื่นไมโครเวฟกำลัง 600 W เวลา 4 min ตามด้วย EnH จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 0.665 g/g d.b. bagasse (พิจารณาองค์ประกอบในของแข็งคงเหลือหลังจากผ่านการปรับสภาพด้วยการ MAP ในตารางที่ 2.8) ขณะที่การ MAP แล้วใช้สารละลายกรด 1% H₂SO₄ จะได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มเป็น 0.83 g/g d.b. bagasse นอกจากนี้การ MAP ที่ 450 W 5 min สามารถขจัดลิกนินออกได้เกือบ 90% ประสิทธิภาพการปรับสภาพยังถูกตรวจสอบด้วย XRD, SEM และ FTIR



รูปที่ 2.16 (a) พื้นผิวตอบสนองแสดงผลของระยะเวลาการฉายคลื่นและกำลังของคลื่น ไมโครเวฟต่อ ปริมาณเซลลูโลสที่ให้น้ำตาลเมื่อกำหนดความเข้มข้นของสับسترทงตัว 75 g TS/L
 (b) พื้นผิวตอบสนองแสดงผลของความเข้มข้นของสับسترทและกำลังของคลื่นต่อ ปริมาณเซลลูโลสที่ให้น้ำตาลเมื่อกำหนดระยะเวลาฉายคลื่นคงตัว 24 min
 (c) พื้นผิวตอบสนองแสดงผลของความเข้มข้นของสับسترทและระยะเวลาการฉาย คลื่นต่อปริมาณเซลลูโลสที่ให้น้ำตาล (Ma et al., 2008)



รูปที่ 2.17 ผลิตกัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟที่กำลังต่างๆ ด้วยสารละลายต่าง, สารละลายกรด, และสารละลายต่างตามด้วยกรด (คัดแปลงจาก Binod et al., 2012)

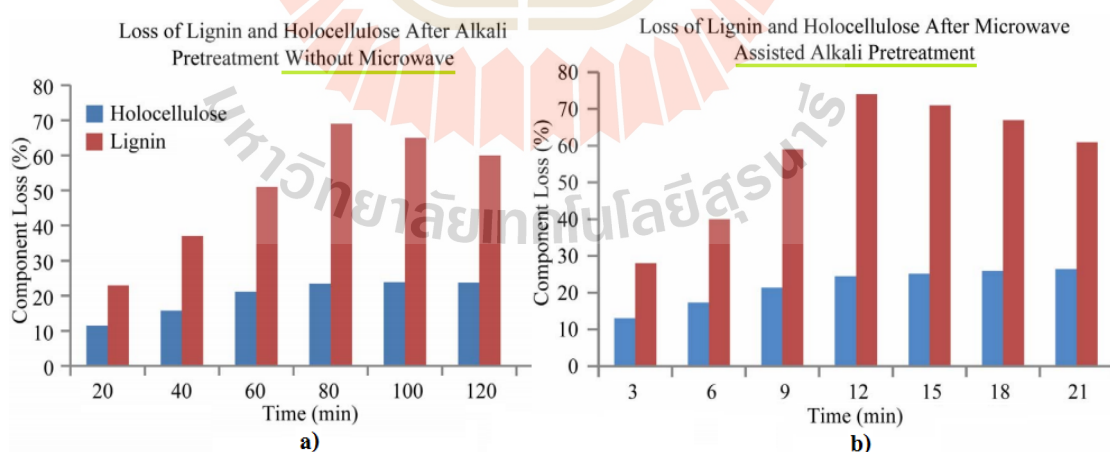
ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบในของแข็งคงเหลือหลังจากผ่านการ MAP (Binod et al., 2012)

Microwave pretreatment power (W) / treatment time (min)	Cellulose ^a (%)	Hemicellulose ^b (%)	Lignin (%)
100/17	49.3	10.9	7.4
100/12	56.4	18.0	5.3
180/8	52.2	26.5	2.9
300/7	57.3	26.8	3.9
450/5	50.3	26.4	1.8
450/4	65.3	26.5	0.6
600/4	66.5	26.3	3.9
600/3	66.6	26.5	4.9
850/2	46.7	26.4	7.8

^a Based on total glucan.

^b Based on total xylan and other C5 sugars

Xue et al. (2012) ทำการปรับสภาพไม้สนยูนาด้วย MAP เพื่อศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของลิกนินที่ละลายได้ ไม้สนยูนาถูกนำมาไว้ในอ่างน้ำร้อนเป็นกลุ่มกรรมวิธีการปรับสภาพหนึ่ง และปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟเป็นอีกกลุ่มกรรมวิธีการปรับสภาพหนึ่ง ทั้งสองนี้ปรับสภาพด้วยสารละลายต่าง 1% NaOH 100°C โดยใช้เวลาที่ตัวอย่างอยู่ในอ่างน้ำร้อนหรือให้ความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟเป็น 0/120, 20/100, 40/80, 60/60, 80/40, 100/20 และ 120/0 ลิกนินในแต่ละสภาวะการปรับสภาพที่ละลายได้ในสารละลายถูกแยกออกมาแล้วทำให้บริสุทธิ์ และลักษณะทางเคมีและกายภาพถูกเปรียบเทียบด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล, GPC, FTIR, 13C, HSQC, NMR ตลอดจน TGA จากการศึกษพบว่า การสกัดลำดับส่วนของลิกนินด้วยความร้อนจากอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟ 20-120 min มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และ polydispersity สูง เมื่อเทียบกับกรรมวิธีการปรับสภาพที่เตรียมโดยให้ความร้อนจากอ่างน้ำร้อน คุณลักษณะการเข้าชนส่วนใหญ่ของลิกนินมักไม่ปรากฏองค์ประกอบร่วมของน้ำตาล ผลการ TGA พบว่าเสถียรภาพทางความร้อนของส่วนของลิกนินจะเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้น FTIR และสเปกตรัมของ NMR ซึ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนของลิกนินมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับองค์ประกอบของ guaiacyl (G) และ ปริมาณเล็กน้อยของ p-hydroxyphenyl (H) units นอกจากนี้ HSQC และ NMR ของชิ้นส่วนลิกนินทั่วไป (ฉายคลื่นไมโครเวฟ 120 min) ได้แสดงว่ามีองค์ประกอบหลักของ β -O-4 linkages 64.6% และ phenylcoumaran (β -5) เป็นโครงสร้างย่อย 25.8% นอกจากนี้ยังมี resinol (β - β') อีกเล็กน้อย 6.7% และกลุ่มที่มีปลายโมเลกุลเป็น coniferyl alcohol

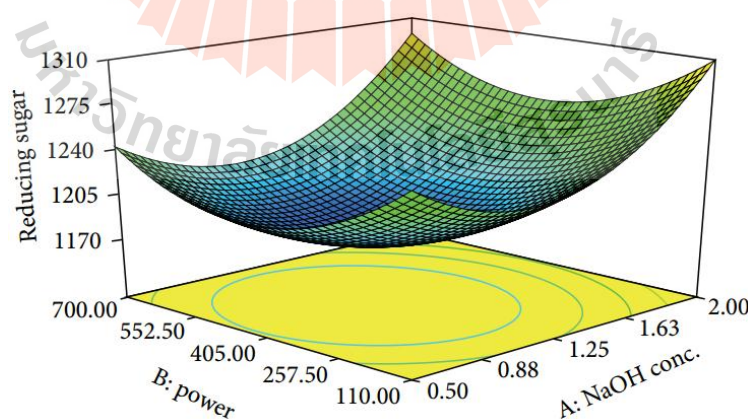


รูปที่ 2.18 a) ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการสูญเสียขององค์ประกอบของลิกนินและโฮโลเซลลูโลสเมื่อให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม 50°C แก่ EFB ใน 3% NaOH และ b) ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการสูญเสียขององค์ประกอบของลิกนินและโฮโลเซลลูโลสเมื่อให้ความร้อนด้วยคลื่น

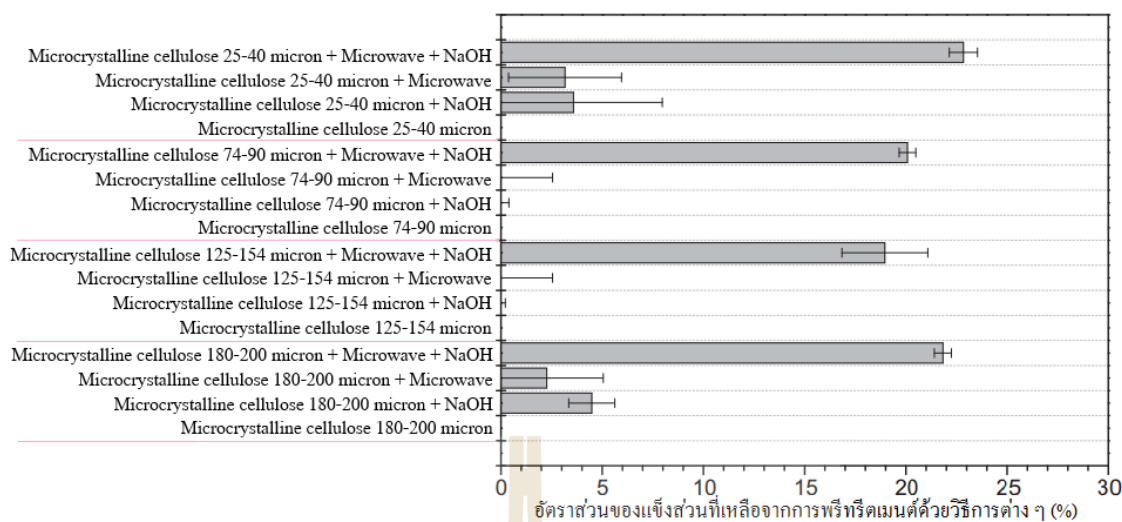
ไมโครเวฟ 180 W ร่วมกับสารละลายต่าง 3% NaOH (ดัดแปลงจาก Normanbhay et al., 2013)

Normanbhay et al. (2013) ทำการ MAP ทะลายปาล์มน้ำมัน โดยใช้คลื่นไมโครเวฟกำลัง 100, 180, 300, 450, 600 และ 850 W เป็นระยะเวลาต่างๆ Normanbhay และคณะได้พบว่าสภาพการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุดคือ 3% w/v NaOH 180 W 12 min (รูปที่ 2.18) ในสภาวะนี้จะทำให้การสูญเสียองค์ประกอบของกลีซินและโซโลเซลลูโลส (กลีโนเซลลูโลสที่แยกกลีซินออก) เป็น 74% และ 24.5% ตามลำดับ ตามมาด้วยการทำให้ได้น้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ (อัตราเอนไซม์ 20 FPU) แก่ ทะลายปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ได้น้ำตาลรีดิซ 411 mg/g EFB

Singh et al. (2014) ใช้คลื่นไมโครเวฟกำลัง 70-700 W ฟางข้าว 5 g ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1-2% ปริมาตร 30 mL เวลาฉายคลื่น 1-5 min ใช้ RSM ด้วย Design expert software พบว่าภายใต้สภาพที่เหมาะสมที่สุด (รูปที่ 2.19) สามารถให้น้ำตาลรีดิซสูงที่สุดถึง 1.33 g/L การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและภาพถ่าย SEM แสดงให้เห็นความสามารถในการขจัดกลีซิน เฮมิเซลลูโลส และซิลิกอนที่ทำได้มากกว่าฟางข้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ การวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ (XRD) แสดงดัชนีความเป็นผลึกของฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ ร่วมกับสารละลายต่าง (54.55%) มีนัยสำคัญที่สูงกว่า blank (49.07%) ซึ่งได้พิสูจน์ว่ากรรมวิธีการปรับสภาพฟางข้าวโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างสามารถส่งเสริมการ EnH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.19 พื้นผิวตอบสนองผลของปริมาณน้ำตาลรีดิซเมื่อใช้กำลังของคลื่นไมโครเวฟและความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่เวลาคงตัว (Singh et al., 2014)

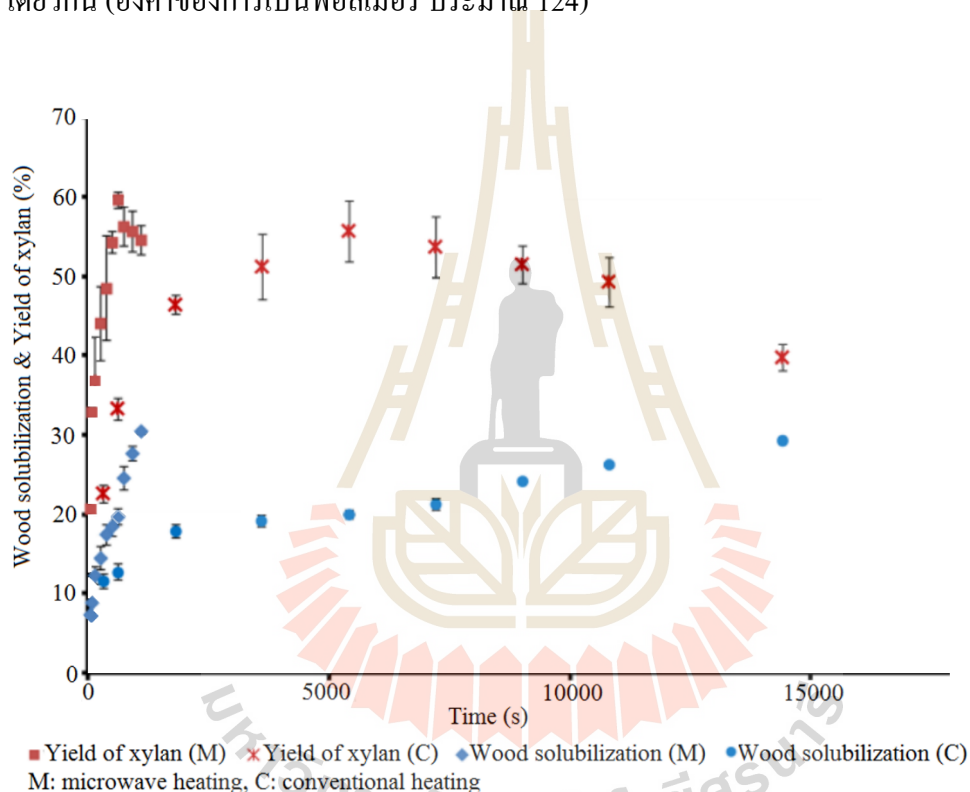


รูปที่ 2.20 อัตราส่วนของแฉ่งที่เหลือของผลิตภัณฑ์เซลลูโลสเมื่อปรับสภาพด้วยวิธีการต่างๆ (ดัดแปลงจาก Peng et al., 2014)

Peng et al. (2014) ศึกษาการแปลงทางชีวภาพของขนาดผลิตภัณฑ์เซลลูโลสขนาดเล็ก (microcrystalline) ที่แตกต่างกันเมื่อทำการฉายคลื่นไมโครเวฟกำลัง 800 W โดยใช้และไม่ใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1% กระบวนการฉายคลื่นไมโครเวฟในการปรับสภาพต่อขนาดของผลิตภัณฑ์เซลลูโลสขนาดเล็กถูกตรวจสอบบนความแปรผันของอัตราส่วนการสลายตัวของของแฉ่งที่เหลือ ขนาดอนุภาค และพื้นที่ผิวจำเพาะ ซึ่งอุณหภูมิที่สูงหรือความเข้มข้นของสารละลายต่างที่สูงมีผลต่อการละลายหรือสลายของเซลลูโลสหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา 120 h ตัวอย่างถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสอย่างสมบูรณ์ และมีผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีสูงถึง 58.91% ในทุกตัวอย่างที่ใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลาย NaOH นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 h ขนาดอนุภาคและสถานะการปรับสภาพจะมีผลโดยนัยสำคัญมากกว่าปัจจัยอื่นๆ (รูปที่ 2.20)

Panthapulakkal et al. (2015) สกัดไซแลน (พอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β 1-4 ไกลโคไซด์) จากไม้ birch ด้วยสารละลายต่างเพื่อให้เข้าใจกระบวนการทางความร้อนที่มีผลต่อการละลายได้ของไม้, ผลผลิตไซแลน และองค์ประกอบเป็นพอลิเมอร์ของไซแลนที่ถูกแยกออกมาเดี่ยวๆ (isolated xylan) โดยใช้คลื่นไมโครเวฟเทียบกับใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม ใช้ไม้ birch 3 g d.b. + 4% NaOH 30 mL หรือ 5 g d.b. + 4% NaOH 50 mL (solid to liquid ratio = 1:10 g/mL) คลื่นไมโครเวฟกำลัง 110 W อุณหภูมิทำร้อน 90°C ผลการทดลองที่พบว่าอัตราการละลายของไม้มีนัยสำคัญที่สูงกว่า (0.020/s) เมื่อใช้ความร้อนสกัด หากเทียบกับการสกัดด้วยความร้อนวิธีการดั้งเดิม (0.001/s) การละลายได้ของไม้หลังจากเริ่มการกระบวนการทำร้อนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจากการทำลายไฟเบอร์ โดยการใช้คลื่นไมโครเวฟจะแสดงอัตราที่รวดเร็วกว่าการให้ความร้อนด้วย

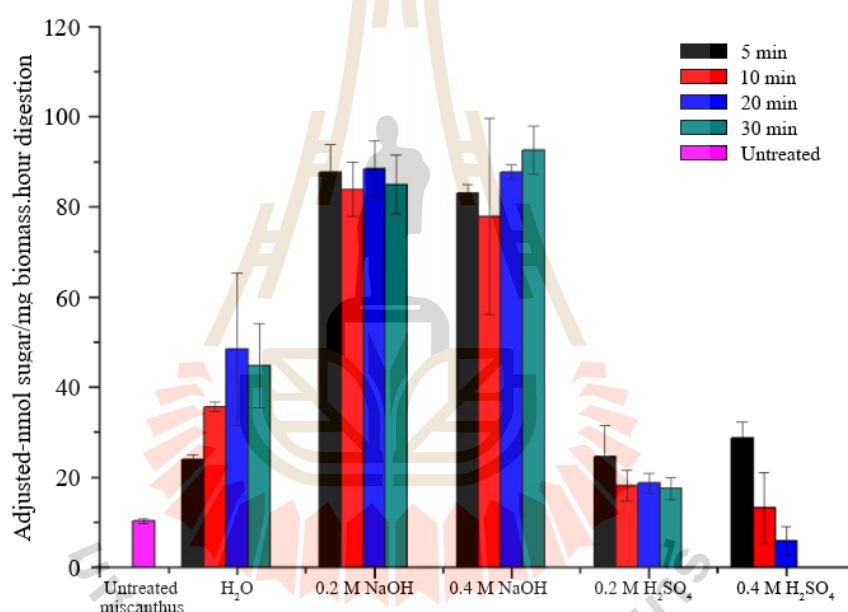
วิธีการดั้งเดิมถึง 20 เท่า ผลผลิตไซแลนมีค่าสูงไปถึงขีดจำกัดคือ 60% ในทั้ง 2 วิธีการและค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ ความร้อนจากอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟได้ผลผลิตสูงถึง 60% ด้วยเวลาเพียง 1/10 เมื่อเทียบกับกระบวนการให้ความร้อนด้วยวิธีดั้งเดิม (รูปที่ 2.21) การทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการสลายตัวของไซแลนมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงกว่า 95°C และธรรมชาติของไซแลนแยกเดี่ยวมีความแตกต่างกันสำหรับการให้ความร้อนใน 2 วิธีการ โดยไซแลนแยกเดี่ยวที่สกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ 20 min พบว่าเป็นพวกโมเลกุลสูง (องศาของการเป็นพอลิเมอร์สูงกว่า ประมาณ 150) เมื่อเทียบกับไซแลนแยกเดี่ยวที่ได้จากการสกัดด้วยความร้อนโดยวิธีการดั้งเดิมที่ระยะเวลาดำเนินการเดียวกัน (องศาของการเป็นพอลิเมอร์ ประมาณ 124)



รูปที่ 2.21 ปริมาณไซแลนและความสามารถในการละลายของไม้ในสารละลายต่างด้วยวิธีการใช้ความร้อนจากอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟและวิธีการดั้งเดิม (Panthapulakkal et al., 2015)

Zhu et al. (2015) ปรับสภาพหญ้า Miscanthus ด้วยวิธีอุณหภูมิโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (monomode microwave) 300 W ร่วมกับ NaOH และ H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 180°C พบว่าการปรับสภาพด้วยกรด H₂SO₄ ส่งผลต่อการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส เมื่อไฮโดรไลซิสแล้วทำให้ได้ปริมาณผลผลิตกลูโคสสูง โดยพบว่า (รูปที่ 2.22) ผลผลิตน้ำตาลสูงสุดจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นไปได้มีค่า 75.3% (0.2 M H₂SO₄ 20 min), ปริมาณกลูโคสที่ได้คิดเป็น 46.7% การปรับสภาพ

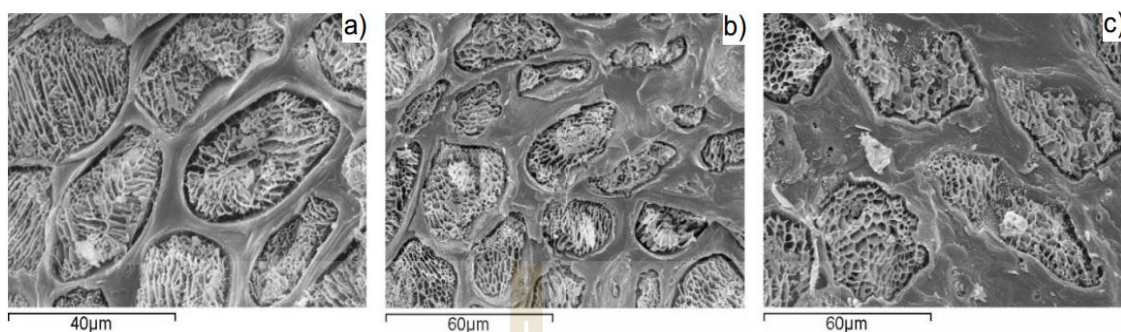
เบื้องต้นด้วย NaOH และน้ำมีแนวโน้มที่จะสลายเพียงเฮมิเซลลูโลสมากกว่าเซลลูโลส นอกจากนี้เมื่อเทียบการปรับสภาพเบื้องต้นด้วย NaOH/ H₂SO₄ การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟให้ปริมาณผลิตภัณฑ์น้ำตาลสูงกว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมถึง 12 เท่า โดยใช้เวลาเพียงครั้งเดียว การปรับสภาพด้วย NaOH ยกระดับความสามารถในการย่อยชีวมวลตัวอย่างเพราะขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทำให้ง่ายต่อการที่เซลลูเลสเข้าไฮโดรไลซิส จากการศึกษาฐานพบว่าสภาพแน่นของใบหญ้ากลายเป็นและแตกออกหลังจากปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH และนอกจากนี้การสลายตัวของน้ำตาลที่อยู่ในที่ถูกปรับสภาพโดยใช้กรด H₂SO₄ พบว่า 6-8% ของชีวมวลเปลี่ยนไปเป็น levulinic acid (LA) ขณะทำการปรับสภาพเบื้องต้น (เสียน้ำตาลที่ควรจะได้-ดังนั้นการใช้สารละลาย NaOH จึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการใช้สารละลาย H₂SO₄)



รูปที่ 2.22 ผลผลิตจากการไฮโดรไลซิสหญ้าที่ผ่านการปรับ-ไม่ปรับ สภาพเบื้องต้น (Zhu et al., 2015)

Zhu et al. (2016) ทำการปรับสภาพขานอ้อยโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลาย NaOH/ H₂SO₄ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพยกระดับผลผลิตน้ำตาล พบว่าการปรับสภาพโดยใช้คลื่นไมโครเวฟมีประสิทธิภาพมากกว่าการให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม โดยให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 4 เท่า และใช้เวลาน้อยกว่า 5.7 เท่า ผลผลิตน้ำตาลสูงสุดอาจได้ถึง 86% หากศึกษาโครงสร้างผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราดพบว่าโครงสร้างที่เกิดจากสารละลาย NaOH ขจัดลิกนินออกทำให้เกิดรู โพร่ง และการหลวมตัวของมัดเส้นใย (fiber bundles) ส่งผลดีต่อการ EnH อย่างไรก็ดีไม่

ควรปรับสภาพด้วยไมโครเวฟโดยใช้สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น/หรือเป็นเวลานาน เพราะชีวมวลจะเกิดกระบวนการ carbonization (กระบวนการแรกเริ่มที่ทำให้เกิด char)



รูปที่ 2.23 Cryo-SEM แสดง a) ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกรรมวิธี b) ผ่านการปรับสภาพ 510 W หรือ 6.375 W/g เป็นเวลา 10 s c) ผ่านการปรับสภาพ 510 W เป็นเวลา 180 s (Conesa et al., 2016)

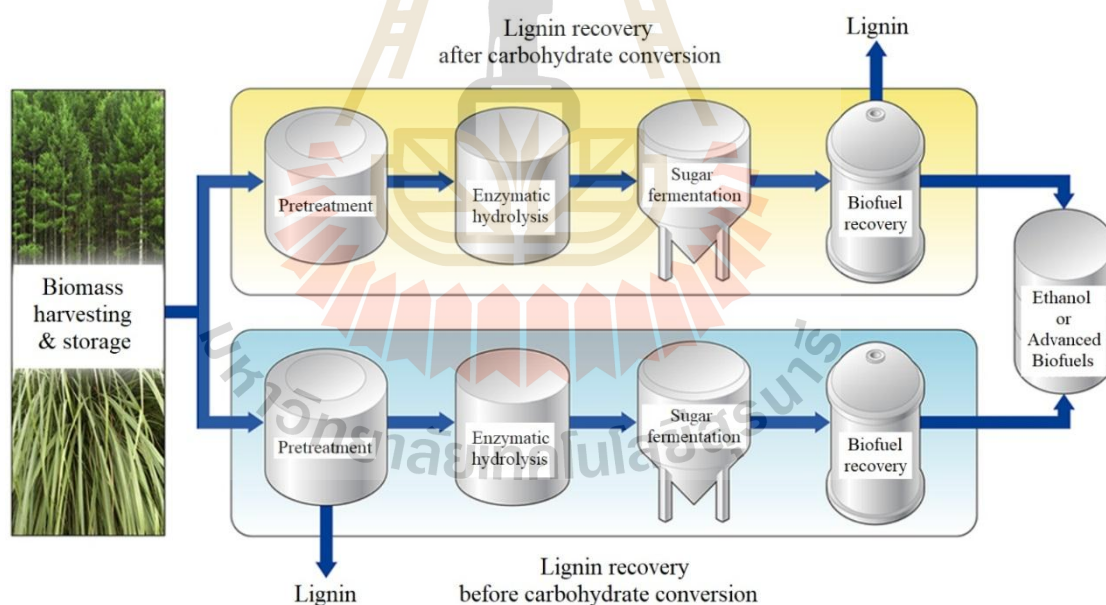
Conesa et al. (2016) ทำการปรับสภาพของเสี้ยวจากอุตสาหกรรมผลสับประดด้วยคลื่นไมโครเวฟ ความถี่ 2,450 MHz 3 ค่ากำลัง คือ 170, 340 และ 510 W ของแข็งสับประดเสี้ยว 40 g ใน 0.5 N หรือ 2% NaOH เวลาฉายคลื่น 5-180 s เพื่อสนับสนุนการทำให้ได้น้ำตาลพบว่า การปรับสภาพในระยะเวลาสั้นๆ (ระยะเวลา 60 s ลงมา) จะมีนัยสำคัญต่อการปรับปรุงผลผลิตในขั้น EnH โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากของ fermentable sugar 35.7% และ น้ำตาลทั้งหมด 33.5% ซึ่งได้มาจากการใช้คลื่นไมโครเวฟ กำลัง 510 W เพียง 5 s อย่างไรก็ดี การฉายคลื่นที่นานขึ้นกลับมีผลต่อการสลายตัวของน้ำตาลและการปลดปล่อยสารยับยั้งกระบวนการหมักเช่น phenols หรือ HMF อันเป็นผลที่ตามมาจากการสลายตัวทางความร้อน แม้กระนั้น phenols ที่ได้ก็มีไม่มากพอที่จะขัดขวางกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่อไป ภาพจากกล้อง SEM (รูปที่ 2.23) ได้ยืนยันว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟที่ระยะเวลาฉายคลื่นไม่นาน จะส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่อการปรับปรุงการ EnH แต่ในทางกลับกัน การปรับสภาพด้วยความรุนแรงกลับทำให้เกิดการกระชับตัวของโครงสร้างซึ่งทำให้ยากต่อการเข้าถึงของเอนไซม์ ผลที่ตามมาจะทำให้การปลดปล่อยน้ำตาลน้อยลง

2.6 การตกตะกอนลิกนินและการนำไปใช้ประโยชน์

2.6.1 การตกตะกอนลิกนิน

จากแนวความคิดการเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเชื้อเพลิง พลังงาน และสารเคมีที่มีมูลค่าเพิ่มนั้น จากการศึกษาโดย Ragauskas et al. (2014) พบว่าลิกนินซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลนั้น (รูปที่ 2.24) มีปริมาณสูงถึง 100,000-200,000 ตันต่อปี ดังนั้น

การวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากลิกนินอย่างคุ้มค่าและมีประสิทธิภาพนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง จากการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีผลทำให้ลิกนินบางส่วนถูกย่อยสลายกลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กละลายลงในสารละลายต่าง (Sun and Cheng, 2002; Buranov and Mazza, 2008) โมเลกุลลิกนินเหล่านี้สามารถละลายในสารละลายต่างได้เนื่องจากแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic repulsion) ระหว่างโมเลกุลลิกนินด้วยกันเอง และระหว่างโมเลกุลอื่นๆ ทำให้ลิกนินแต่ละโมเลกุลอยู่ห่างกันและไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาหาวิธีการนำลิกนินกลับคืนมาจากสารละลายต่าง โดยพบว่าการใช้กรดในการตกตะกอนเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด (Sun et al., 1999; Ghatak, 2008; Dimmel and Gellerstedt, 2010) โดยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของกรดที่ใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก และกรดไฮโดรคลอริก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในการลดค่า pH ของสารละลายเพื่อให้ลิกนินตกตะกอน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการแยกลิกนินด้วยวิธีการกรองโดยใช้เยื่อบาง (ultrafiltration) และวิธีอิเล็กโทรไลต์ (electrolytic methods) (Sun et al., 1999; Ghatak, 2008; Minu et al., 2012)

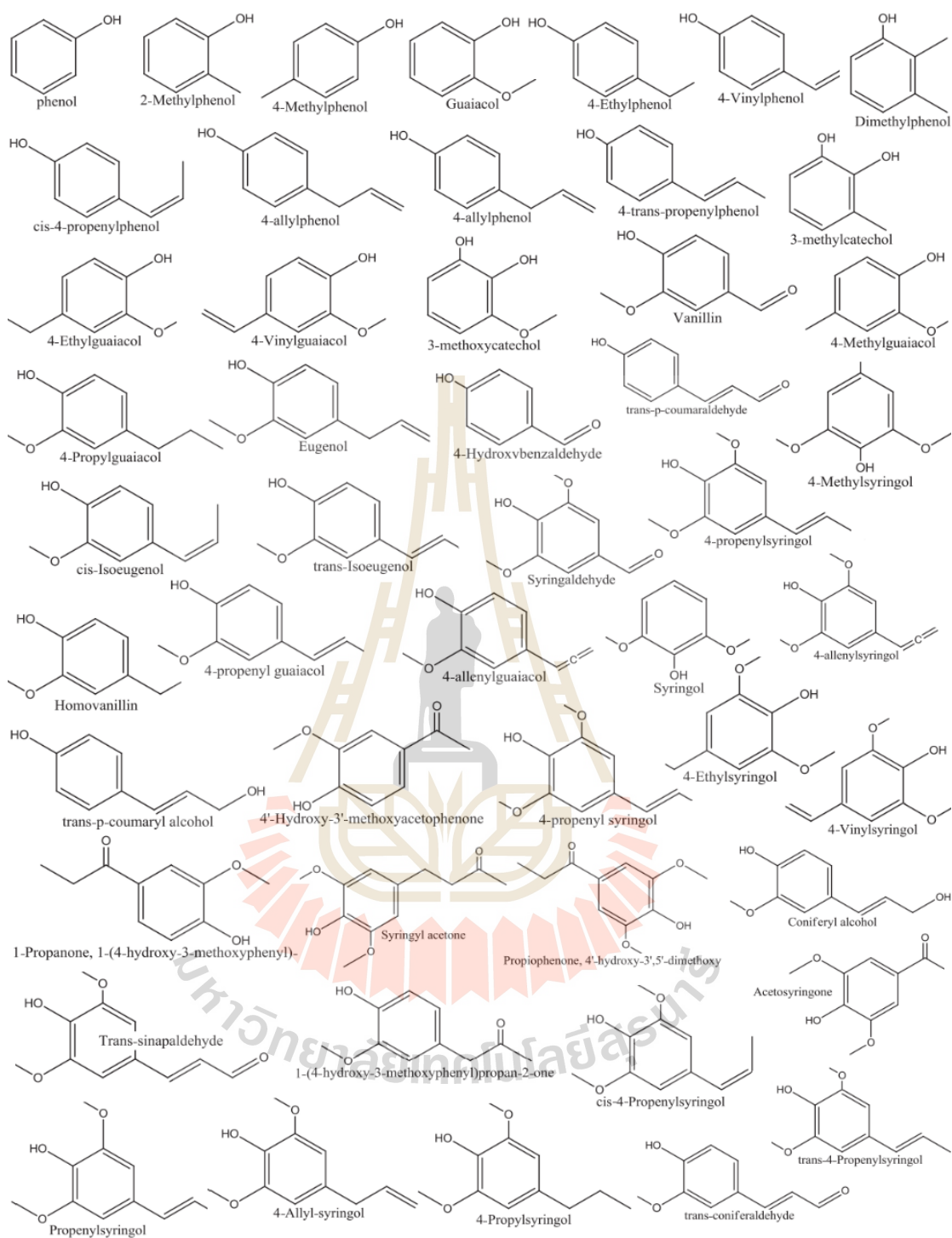


รูปที่ 2.24 ผลพลอยได้ลิกนินจากกระบวนการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ (Ragauskas et al., 2014)

ลิกนินที่ถูกย่อยสลายกลายเป็น โมเลกุลขนาดเล็กสามารถละลายในสารละลายต่างได้นั้น เนื่องจากแรงผลักทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic repulsion) ระหว่างโมเลกุลลิกนินด้วยกันเอง และระหว่างโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งทำให้ลิกนินแต่ละโมเลกุลอยู่ห่างกันและไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ การลดค่าพีเอชของสารละลายต่างเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลลิกนิน และระหว่างโมเลกุลอื่นๆ ได้ ซึ่งส่งผลให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลลิกนิน (hydrophobic interaction) เพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายของโมเลกุลลิกนินลดลงและโมเลกุลลิกนินรวมกันตกตะกอนแยกออกมาในที่สุด (Sun et al., 1999; Ghatak, 2008; Dimmel and Gellerstedt, 2010)

2.6.2 การนำลิกนินไปใช้ประโยชน์

ส่วนใหญ่ผลพลอยได้ลิกนินจากกระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส ทั้งในอุตสาหกรรมกระดาษหรืองานแปรรูปภาพเพื่อผลิตไบโอเอทานอล-บิวทานอลนั้น ส่วนใหญ่จะถูกนำกลับมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงด้วยการเผาไหม้โดยตรงเพราะมีค่าความร้อนสูง (Gordobil et al., 2016; Oluwadare et al., 2016) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ได้มีนักวิจัยศึกษาการนำลิกนินเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี (รูปที่ 2.25) หรืออาจพิจารณาโครงสร้างทางเคมีแล้วผ่านกระบวนการอีกชั้นเพื่อให้ได้คุณสมบัติเฉพาะยิ่งขึ้น (Calvo-Flores and Dobado, 2010; Doherty, et al., 2011; Welker et al., 2015) เช่น สลายลิกนินให้ได้สารวานิลลิน (vanillin) สารดูดซับคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon materials) สารเชื่อมติด (binding) เช่น กาว เรซิน และสารช่วยกระจาย (dispersing agent) ในอุตสาหกรรมเคมีและกระดาษ สารช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของพลาสติกย่อยสลายได้ในด้านความคงตัวเมื่อได้รับผลจากความร้อนหรือประกอบรวมในการผลิตวัสดุอื่นๆ (bio-based materials) (Tribot et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยศึกษาคุณสมบัติของลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินเพื่อนำไปใช้ทางการแพทย์ (Vinardell and Mitjans, 2017) เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านไวรัส (antiviral) ลดการดูดซึมกลูโคสในภาวะเบาหวาน (antidiabetic) อนุภาคนาโนนำส่งยา (lignin-based nanoparticles for drug delivery) สารช่วยลดสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ด้านการแข็งตัวของเลือดหรือละลายลิ่มเลือด (anticoagulant) (ตารางที่ 2.9)



รูปที่ 2.25 โมเลกุลของลิกนินที่สลายตัว Lupoi et al. (2015)

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของลิกนิน

คุณสมบัติของลิกนิน	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
สารต้านอนุมูลอิสระ	Pan et al. (2006), García et al. (2010), Kosanic et al. (2011), Sun et al. (2014), Rattana and Sungthong (2016), Qazi et al. (2017) Mahmood et al. (2018)
สารต้านสารก่อมะเร็ง, เซลล์มะเร็ง	ยับยั้งกิจกรรมของ Labaj et al. (2003), Funk et al. (2006), Wang et al. (2015)
ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (ละลายลิ่มเลือด)	Henry and Desai (2014), Mehta et al. (2016)
ยับยั้งไวรัส, แบคทีเรีย	Thakkar et al. (2010), Lee et al. (2011), Alzagameem et al. (2019)
อนุภาคนาโนนำส่งยา	Dai et al. (2017), Figueiredo et al. (2017)a, Figueiredo et al. (2017)b
สารช่วยกระจายในสี ยิปซัม ซีเมนต์	Matsushita and Yasuda (2005), Ouyang et al. (2009), Qin et al. (2015)
สารช่วยปรับปรุงคุณภาพของพลาสติกชีวภาพ	Alexy et al. (2000), Lepifre et al. (2004), Chung and Washburn (2012), Kaewtatip and Thongmee (2013), Duval and Lawoko (2014), Laurichesse and Avérous (2014)

2.6.3 ความสามารถของลิกนินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1) อนุมูลอิสระ (free radicle) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบ ที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในออร์บิทัล (orbital) วงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง อิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่นๆ ทำให้มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสถานะที่มีประจุไฟฟ้าโดยอาจเป็นได้ทั้งประจุบวกและประจุลบ นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (บังอร วงศ์รักษ์ และศศลักษณ์ ปิยะสุวรรณ, 2549)

อิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียร มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน มีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ สามารถเกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลอิสระต่อเนื่องไปเป็นลูกโซ่ (chain reaction) เมื่อสะสมในเซลล์จะก่อให้เกิดความเครียดออกซิเดทีฟ (oxidative stress) ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การเสียหายที่เป็นอันตรายต่อ DNA และ โปรตีนส่งผลเกี่ยวเนื่องไปถึงการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ (mutation) (Valko et al., 2004) ความเสียหายต่อการรับส่งของสัญญาณประสาท (neuro-degeneration) เป็นหนึ่งในสาเหตุโรคอัลไซเมอร์ของ (Alzheimer's disease), โรคประสาทพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (Uttara et al., 2009), ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และอื่นๆ อนุมูลอิสระเกิดได้จากปฏิกิริยาทางชีวเคมีของร่างกายเอง เช่น กิจกรรมของไมโทคอนเดรียในการหายใจระดับเซลล์ (cellular respiration) การออกกำลังกายที่มากเกินไป กิจกรรมของเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด (Iuliano L et al., 1997) ต่อการอักเสบของเนื้อเยื่อและบาดแผล (และชนิดที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต มลพิษ ยาปฏิชีวนะ ยาฆ่าแมลง โอโซน ควันทูหรือ ตัวทำลายอินทรีย์ ไบโอมทรานส์ ลีและสารปรุงแต่งบางชนิดในอาหาร ฯลฯ (Ware and Olsen, 2018)

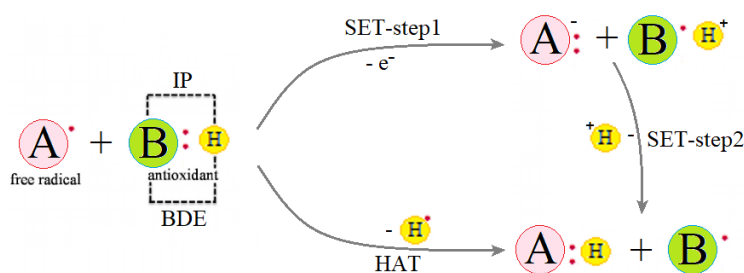
สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลของสารที่สามารถป้องกัน, หน่วงหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์เข้าจับกับสารอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดสมดุลของระดับออกซิเดทีฟ (oxidative state) ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระจะหยุดได้ต่อเมื่อทำปฏิกิริยากับ radical inhibitors หรือสารต้านอนุมูลอิสระ เกิดอนุมูลใหม่อยู่ในรูปที่เสถียรมากกว่า หรือเป็นอนุมูลที่ไม่ทำปฏิกิริยา (unreactive) ซึ่งมักอยู่ในสถานะเรโซแนนซ์ (resonance) หรืออยู่ในรูปที่ไม่ได้ตำแหน่งเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา (steric effect) (Karogodina et al., 2011) สารต้านอนุมูลอิสระจึงไม่กลายเป็นอนุมูลอิสระไปด้วย (วารานนท์ ทองอินตา และคณะ, 2557; An et al., 2017; Menezes Nogueira et al., 2019) แต่ในร่างกายสิ่งมีชีวิตอาจใช้กลไกอื่นๆ นอกจากการจับอนุมูลอิสระด้วยการรีดิวซ์โดยตรง (e^- scavenging) ร่วมด้วย เช่น เอนไซม์, โปรตีน, โลหะ เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่ร่างกายมนุษย์สามารถสร้างเองได้ (endogenous antioxidant) (Da Costa et. al., 2012) ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ก) เอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, paraoxanase, heme-oxygenase, catalase, glutathione peroxide, glutathione S-transferase, glutathione reductase, aldehyde dehydrogenase ฯลฯ ข) ไมโครเอนไซม์ เช่น glutathione, bilirubin, melatonin, uric acid ฯลฯ ค) กลุ่มโปรตีนที่จับกับโลหะ เช่น ferritin, lactoferrin, metallothionein, transferrin ฯลฯ และที่รับจากภายนอกร่างกาย (exogenous antioxidant) อาจเป็นได้ทั้งสารจากธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์ ได้แก่ ก) วิตามินซี (ascorbic acid, ascorbate), ข) วิตามินอี (tocopherols, tocotrienols), ค) carotenoids ซึ่งพบกว่าพันชนิด แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม carotenes เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น α , β , γ , δ , ϵ , และ ζ -carotene และกลุ่ม xanthophylls มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น lutein, zeaxanthin, ง) polyphenols (flavonols, flavanols, anthocyanins, isoflavones, tannin, phenolic acid), จ) ธาตุ เช่นซิลิเนียม สังกะสี

ปัจจุบันสาเหตุของอนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมที่ความรุนแรงขึ้น ร่างกายไม่สามารถขจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาคุณภาพ เช่น จากผักและผลไม้ (ตารางที่ 2.10) เพราะพืชหลายชนิดสร้างสารที่เป็น secondary metabolite ที่หลากหลาย เช่น terpenes, polyphenolics, และ alkaloids มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Sengupta et al., 2018)

ตารางที่ 2.10 ปริมาณฟีนอลทั้งหมดในผักและผลไม้ (Chandra et al 2014, Lutz et al 2015)

Chandra et al. (2014)		Lutz et al. (2015)	
Vegetable/fruit	mg GAE/g DW	Vegetable/fruit	mg GAE/g DW
Chard	54-58	Blackberry	126.3
Basil	52-57	Eggplant	80.1
Red kale	24-29	Blueberry	67.1
Cherry tomato	24	Tomato	63.1
Bellpepper	18-22	Red pepper	62.6
Parsley	16-22	Apple	51.8
Cucumber	14-19	Spinach	51.4
Squash	8	Carrot	19.9



รูปที่ 2.26 กลไกของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ (ดัดแปลงจาก Liang and Kitts, 2014)

กลไกของปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระมี 2 ลักษณะ (Liang and Kitts, 2014; บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ, 2549) พิจารณารูปที่ 2.26

1) การส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (single electron transfer, SET) ในกลไกนี้ศักย์ไอออไนเซชัน (ionization potential) ในการขับเคลื่อนของสารต้านอนุมูลอิสระเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้พลังงานกระบวนการ

2) การหลุดออกของไฮโดรเจนอะตอม (hydrogen atom abstraction, HAT) เอนทาลปีการแยกตัวของพันธะ (bond dissociation enthalpy, BDE) จะเป็นปัจจัยหลักในการดำเนินไปของกระบวนการ

2) การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

หลักการวัดปริมาณคือสารประกอบฟีนอลิกในลิกนินจะทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับ phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid ซึ่งอยู่ใน Folin-Ciocalteu's reagent โดย phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid จะถูกรีดิวซ์เป็นสีฟ้าของ molybdenum และ tungsten oxide จุดคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น ประมาณ 765 nm กรดแกลลิกเป็นตัวแทนสารประกอบฟีนอลิกที่นิยมใช้เทียบจึงใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับเทียบปริมาณสมมูล (Leng et al., 2018)

หลักการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้คือ decolorimetric assay กล่าวคือ วัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระที่ให้สี สารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนครบคู่ ความเข้มของสีจึงลดลงแปรผันตรงกับความความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (วรานนท์ ทองอินตา และคณะ, 2557)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compound, TPC)

สารประกอบฟีนอลิกมีองค์ประกอบเป็นวงแหวนเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ในพืชสามารถพบกระจายได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช มีศักยภาพที่สูงมากโดยเฉพาะในสารเสริมอาหารที่

ให้ผลทางเภสัช (neutraceutical supplement) และสารตั้งต้นในยา (Wildman, 2007) โครงสร้างทางเคมีมีรูปแบบได้มากมาย ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย มีขนาดเล็ก เช่น กรดฟีนอลิก อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล เช่น แทนนิน (tannin) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ต่อกันเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน สารประกอบฟีนอล กลุ่มใหญ่ที่สามารถพบได้คือสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยสารประกอบฟีนอลชนิดต่างๆ อาจรวมตัวกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น (เนตรนภา เมกกลาง และเฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2014) สารประกอบฟีนอลิกประเภทที่ไม่ละลายน้ำพบได้ในผนังเซลล์พืชขณะที่ประเภทละลายน้ำจะพบได้ในแควิวโอล (Sengupta et al., 2018)

Faustino et al. (2010) ได้อธิบายวิธีวิเคราะห์ปริมาณ TPC ในลิกนิน โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method อ้างอิงตามงานของ Bonoli et al. (2004) ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานสำหรับเทียบ นำสารสกัดลิกนินละลายในเมทานอล ปริมาตร 50 μL เติมน้ำกลั่น 450 μL และ 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent solution ปริมาตร 2.50 mL จากนั้นเขย่า 5 min เติมน้ำกลั่น 75 g/L ปริมาตร 2 mL) เขย่าบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1.5 h วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm (25°C) สร้างกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงในช่วงที่เหมาะสมของปฏิกิริยาระหว่างกรดแกลลิกกับ Folin-Ciocalteu reagent และสารละลายลิกนินในเมทานอลกับ Folin-Ciocalteu reagent ค่าที่ได้แสดงในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมลิกนินแห้ง (mg GAE/g lignin)

Lutz et al. (2015) ก็ได้นำเสนอวิธีของเขาและคณะ โดยดัดแปลงจาก Singleton and Rossi (1965) เตรียมสารสกัดตัวอย่าง 25 μL เติมลงใน 96-well plate multi-mode microplate reader, เติมน้ำกลั่น 12.5 μL Folin Ciocalteu reagent, 37.5 μL sodium carbonate (20% w/v), และ 175 μL น้ำกลั่น บ่ม 37°C 30 min แล้วตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm สร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิก ค่าที่ได้แสดงในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g lignin)

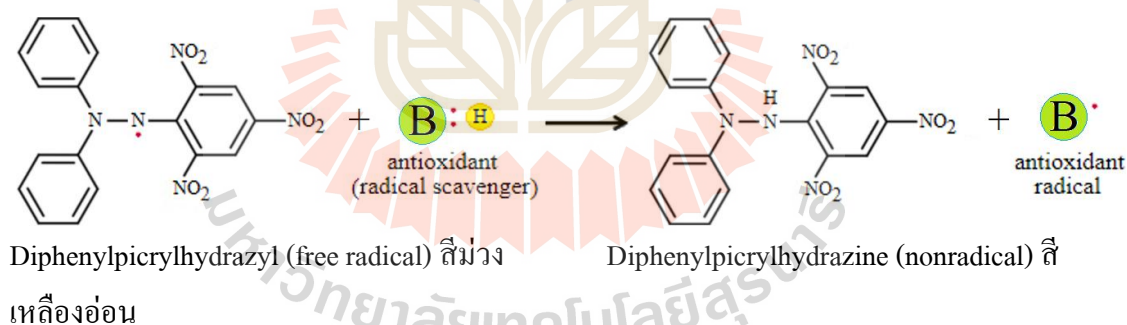
นอกจากนี้ การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ในไพโรไลติกลิกนินของ Qazi et al. (2017) ได้ดัดแปลงวิธีการจาก Singleton et al. (1999) เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และ/หรือ สารละลายตัวอย่างที่ปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมต่อช่วงการดูดกลืนแสง ปริมาตร 2 μL ใน microplate well, และน้ำกลั่น ultrapure water (type 1) ปริมาตร 158 μL จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 10 μL ลง microplate แกว่งให้เกิดปฏิกิริยา จากนั้น 8 min เติมน้ำกลั่น 30 μL บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 h วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 nm คำนวณปริมาณ TPC ออกมาในหน่วยของ mg GAE/g pyrolytic lignin ตามสมการ (2.2)

$$T = C \times V/M \quad (2.2)$$

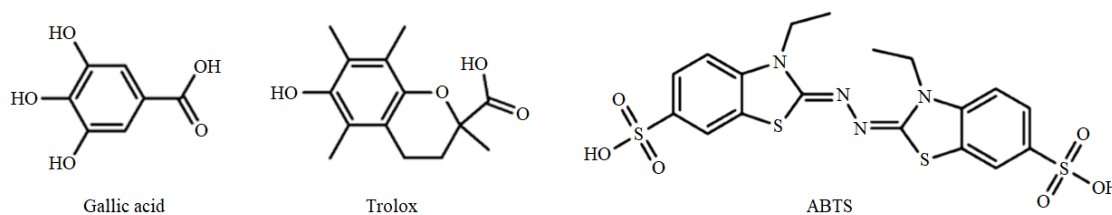
โดยที่	T	คือปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วย mg GAE/g สารละลาย (extract solution)
	C	คือความเข้มข้นของกรดแกลลิกได้จากกราฟเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในหน่วย mg/mL
	V	คือปริมาตรสารละลาย (extract solution) ในหน่วย mL
	M	น้ำหนักของสาร (extract) ในหน่วย g

DPPH free radical scavenging activity assay (DPPH_{AA})

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระมาตรฐานที่นิยมใช้ มีมวลโมเลกุล 394.32g/mol มีสีม่วงในรูปอนุโมลอยู่แล้วจึงไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล (บังอร วงศ์รัศม์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ, 2549) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514-518 nm หลักการคือวัดค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้น จากนั้นให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยารีดิวซ์ DPPH แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (เทียบไปสู่ปริมาณ DPPH) ที่ลดลง คำนวณความสามารถของสารตัวอย่างเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่น โทโรลอก (Trolox, อนุพันธ์ของวิตามินอี) หรือวิตามินซี



รูปที่ 2.27 อนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (ดัดแปลงจาก Liang and Kitts, 2014)



รูปที่ 2.28 กรดแกลลิก, โทรล็อกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) และ ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (ดัดแปลงจาก กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์ กัลชาญ, 2560)

Lutz et al. (2015) เสนอวิธีการวัดปริมาณการรีดิวซ์อนุมูล DPPH โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Brand-Williams et al. (1995) โดยเติมสารสกัดปริมาณ 10 μL ใน microplate reader, ผสมกับ DPPH ความเข้มข้น 103.5 μM ในเมทานอล ปริมาตร 240 μL เขย่าให้ดี จากนั้นบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 20°C 60 min ปริมาณการลดลงของอนุมูล DPPH ถูกวัดโดยอาศัยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm สร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน โดยใช้โทรล็อกซ์เทียบสมมูลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง คำนวณค่าออกมาในรูป $\mu\text{mol TE/g DW}$

Qazi et al. (2017) อธิบายวิธีวิเคราะห์หสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของไฟโรไลติกลิกนิน; ในการวิเคราะห์ DPPH assay ทำได้โดยวัดกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH ใน microplate assay ซึ่งได้อ้างการดัดแปลงมาจาก Yu et al. (2002) เตรียมสารละลาย 100 μM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 150 μL เติมลงในสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในเมทานอลที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 150 μL เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสง, และสารละลายตัวอย่างไฟโรไลติกลิกนินในเมทานอลปริมาตร 150 μL ด้วย เขย่าบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min ค่าการลดลงของ DPPH ถูกวัดที่ 517 nm อุณหภูมิห้องโดยใช้ TECAN plate reader ค่าที่ได้แสดงในหน่วย mg ascorbic acid equivalents/g pyrolytic lignin

ABTS free radical scavenging activity assay (ABTS_{AA})

ABTS มีมวลโมเลกุล 514.62 g/mol เป็นสารคงตัว (ไม่เหมือน DPPH ที่เป็นอนุมูล) จึงต้องกระตุ้นด้วย potassium peroxide (K_2O_2) (นพวัฒน์ เฟ็งคำศรี และคณะ, 2554) หรือ potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Rattana and Sungthong, 2016) ก่อนเพื่อให้เป็นอนุมูล ABTS^+ สีฟ้าเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (นพวัฒน์ เฟ็งคำศรี และคณะ, 2554) หรือ 415 nm (Rattana and Sungthong, 2016) เมื่อได้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น โทรล็อกซ์ จะทำให้อนุมูล ABTS^+ เปลี่ยนกลับไปเป็น ABTS (6 min) อย่างไรก็ตามการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ ABTS มีหลายช่วง เช่น

415, 645, 734, และ 815 nm (วรานนท์ ทองอินลา และคณะ, 2557) แต่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้ที่ 734 nm (Cerretani and Bendini, 2010)

การวิเคราะห์ ABTS assay ของ Teixeira et al. (2017) ได้ดัดแปลงวิธีการของ Re et al. (1999) โดยเตรียม 7 mM ABTS ปริมาตร 5 mL, ผสมเข้ากับ 140 mM โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 88 μ L บ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 hr เจือจางด้วยเอทานอลลงให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm = 0.70 เมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่าง ให้เติมสารละลายตัวอย่าง 30 μ L ลงใน 3.0 mL ABTS radical solution บ่มในที่มืดเป็นเวลา 6 min ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm อีกครั้ง ใช้ทรอโลกซ์สร้างกราฟมาตรฐานและเทียบสมมูล ค่าที่ได้แสดงในหน่วย mg trolox equivalents/g

การวิเคราะห์ ABTS assay ของ Qazi et al. (2017) ทำได้โดยละลายไพโรไลติกลิกนิน (pyrolytic lignins) ในเมทานอล (20 mg/mL) กรองด้วยกระบอกฉีดยาหัวกรอง (acrodisc syringe GHP filters) 0.22 μ m filters ทำการวิเคราะห์ค่า TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) assay โดยใช้กิจกรรมการจับอนุมูล ABTS^{•+} ของไพโรไลติกลิกนิน โดยอนุมูล ABTS^{•+} สีฟ้าอมเขียว นี้จะถูกตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm สารต้านอนุมูลอิสระในลิกนินจะไปฟอกสี ABTS^{•+} ให้ลดจางลง Qazi et al. (2017) ได้ทำการดัดแปลงมาจาก Re et al. (1999) สารละลาย ABTS^{•+} ถูกเตรียมโดยผสมเกลือ ABTS (7 mM) เข้ากับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (2.45 mM) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 12-16 h ก่อนนำมาใช้ โดยก่อนใช้ สารละลาย ABTS^{•+} จะถูกเจือจางเพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นประมาณ 0.70 (± 0.002) ที่ 734 nm โดยทั่วไปแล้วการเติมสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้อนุมูลประจวบกับ ABTS^{•+} ถูกรีดิวซ์ ฟอกสี (decolourizes) กลับไปเป็น ABTS ในการนี้ สารละลายมาตรฐานทรอโลกซ์ในเมทานอลที่ทราบความเข้มข้นถูกนำมาสร้างกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงเพื่อใช้เทียบกับสารละลายตัวอย่างไพโรไลติกลิกนินในเมทานอลด้วย; ทำปฏิกิริยาโดยเติม 300 μ L ABTS^{•+} ในช่อง TECAN plate reader เหล่านั้น บ่มในที่มืด 25°C เวลา 6 min ค่าที่ได้แสดงในหน่วย mg trolox equivalents/g pyrolytic lignin

อย่างไรก็ดี ในการวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH[•] หรือ ABTS^{•+} สามารถใช้กรดแอสคอร์บิก, BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) (Tadhani et al., 2007; Kosanic et al., 2011; Olugbami et al., 2014; Yunfeng et al., 2018) และอื่นๆ เป็นสารมาตรฐานสำหรับเทียบสมมูลแทนทรอโลกซ์ และค่าที่คำนวณออกมาอาจอยู่ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิก, มิลลิกรัมสมมูลของทรอโลกซ์, หรือมิลลิโมลาร์สมมูลของทรอโลกซ์ ต่อกรัมของสารตัวอย่าง หรือต่อมิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่าง หรือวัดในลักษณะความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] หรือ ABTS^{•+} ลดลง 50% (IC₅₀, Inhibition concentration หรือ EC₅₀, Effective concentration) (Chen et al., 2013; Okoh et al., 2014; Turapra et al., 2015; Matuszewska et al., 2018; Michelin et al., 2018) นอกจากนี้ อาจแสดงค่าความสามารถใน

การฟอกสีอนุมูล DPPH[•] หรือ ABTS^{•+} โดยการเทียบ % ค่าการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่นที่เวลาเริ่มต้นเทียบเป็น 100% และลดลงเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระให้ทำปฏิกิริยา (Faustino et al., 2010; García et al., 2010; Li et al., 2012; Santos, et al., 2014; Matuszewska et al., 2018; Michelin et al., 2018) เช่น

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ sample}}) / A_{517 \text{ control}}] \times 100 \quad (2.3)$$

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{734 \text{ control}} - A_{734 \text{ sample}}) / A_{734 \text{ control}}] \times 100 \quad (2.4)$$

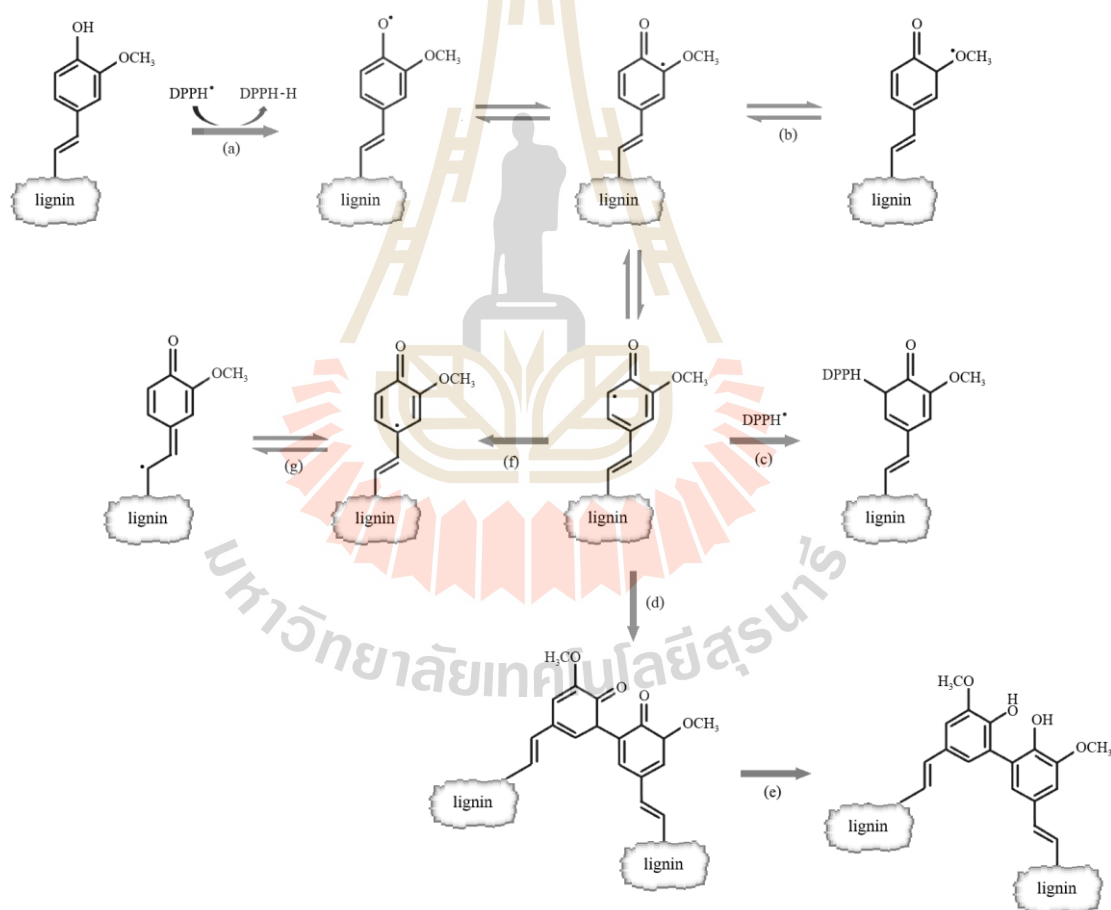
สมการที่ (2.3) และ (2.4) สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมการจับอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} ตามลำดับ (Boonma et al., 2018)

3) สมบัติของลิกนินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

พิจารณารูปที่ 2.29 แสดงกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของลิกนินที่ (Bondet et al., 1997) เสนอไว้ โดยเริ่มจากสารประกอบ โพลีฟีนอลิกของลิกนินให้โปรตอนจากหมู่ไฮดรอกซิลของตนเพื่อจับกับอนุมูล DPPH[•] (a) จากนั้นหมู่เมทอกซิล (-OCH₃) จะเข้าทำเสถียร (stabilizes by resonance) ให้อนุมูลไฮดรอกซิล (b) อาจกล่าวได้ว่าหมู่เมทอกซิลเหล่านี้ได้สนับสนุน/ยกระดับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของลิกนิน จากนั้นอนุมูล DPPH[•] อื่นอาจจะเข้าไปจับกับอนุมูลเอริลเพื่อสร้างคู่อิเล็กตรอน (c) หรืออาจเกิดปฏิกิริยาการรวม (dimerization) ระหว่าง 2 อนุมูลฟีนอกซิลเพื่อสร้างสารเชิงซ้อนที่สามารถให้ไฮโดรเจนแก่หมู่ไฮดรอกซิลดังสมมติฐานอื่นๆ (รูปย่อย d และ e) [An et al. (2017) อ้าง Barclay et al. (1997)] นอกจากนี้ Menezes Nogueira et al. (2019) ยังได้เพิ่มเติม (มาทางลูกศร f) ว่าอนุมูลอาจถูกทำให้เสถียรโดยเกิดพันธะคู่ที่สายโซ่ (conjugate) ทำให้อิเล็กตรอนเคลื่อนที่หรือเปลี่ยนสภาวะได้ง่ายขึ้น

García et al. (2010) ปรับสภาพหมักมีสแคนทัส (*M. sinensis*) โดยเริ่มจากตากแห้ง บดลดขนาด จากนั้นแยกมาปรับสภาพ 3 กรรมวิธี ได้แก่ autohydrolysis, ค้าง และวิธีใช้ตัวทำละลาย โดยมีฐานทฤษฎีที่ว่าวิธีการปรับสภาพจะมีผลต่อคุณสมบัติของลิกนินที่ได้ (ซึ่งในที่สุดงานวิจัยนี้ก็ได้ผลการทดลอง ยืนยันตามหลักการดังกล่าว), การขจัดลิกนินด้วยสารละลายด่างใช้ 7.5% NaOH โดยน้ำหนักในภาชนะปฏิกรณ์แก้วขนาด 20 L อัตราส่วนหมักมีสแคนทัส:สารละลายด่าง = 1:18 อุณหภูมิ 90°C ใช้เวลา 90 min, การปรับสภาพด้วยวิธีใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ใช้หมักดังกล่าว 1 ส่วน : สารละลาย (น้ำ/เอทานอล 40:60 v/v) 10 ส่วน ในภาชนะปฏิกรณ์ทนแรงดันปริมาตร 4 L ดำเนินการที่อุณหภูมิ 180°C ใช้เวลา 90 min กวนด้วยความเร็วคงที่; ภาชนะปฏิกรณ์ทนแรงดันที่สภาวะดังกล่าวใช้ในกระบวนการทำการแยกสลายด้วยน้ำเช่นกัน โดยใช้อัตราส่วนหมัก:น้ำ = 1:20

ที่อุณหภูมิ 180°C ใช้เวลา 30 min; สารผสมในสารละลายต่างถูกกรองและนำมาตกตะกอนลิกนินด้วยกรดซัลฟิวริกกระทั่ง pH<2 จากนั้นล้างลิกนินอีก 2 ครั้งด้วยสารละลายกรด (ซัลฟิวริก pH<2), สารผสมในตัวทำละลายอินทรีย์ถูกกรองออกและส่วนใสนำมาตกตะกอนด้วยการเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก pH<2 ปริมาตร 2 เท่า กรองของแข็ง (ลิกนิน) ไว้, และสำหรับกระบวนการทำการแยกสลายด้วยน้ำพบว่าสารน้ำมีความเจือจางมาก จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นขึ้นอีก 50% ก่อนทำการตกตะกอนลิกนินด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก pH<2 ปริมาตร 2 เท่า จากนั้นลิกนินที่ได้จากทุกกระบวนการถูกทำแห้งสูญญากาศที่ 40°C ผลปริมาณฟีนอลิกเทียบกรัมสมมูลกรดแกดลิกต่อลิกนิน 100 g และปริมาณ DPPH เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 nm เมื่อเวลาเปลี่ยนไป มีค่าดังตารางที่ 2.11 และรูปที่ 2.30



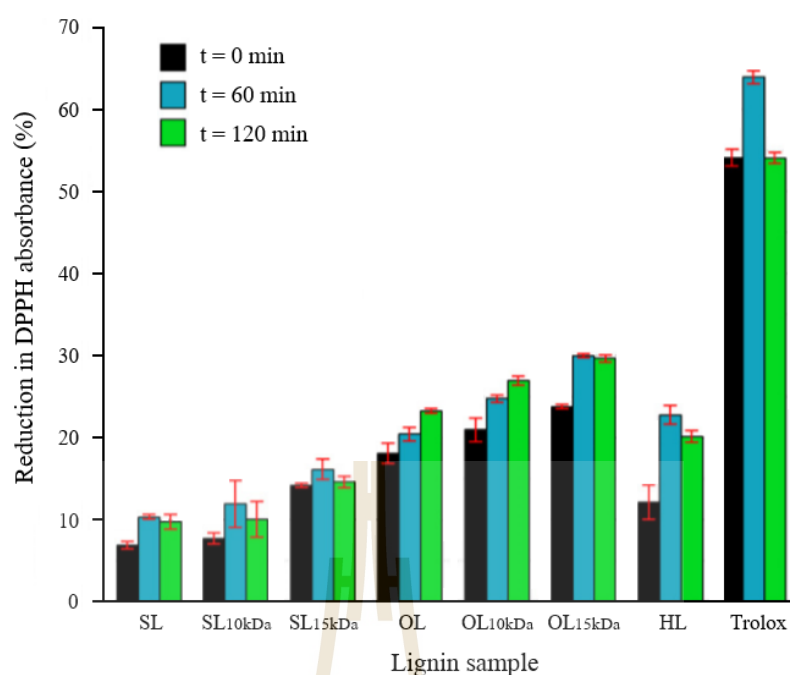
รูปที่ 2.29 หังเส้นทางการจับอนุมูลอิสระที่เป็นไปได้ของลิกนิน ดัดแปลงจาก An et al. (2017) และ Menezes Nogueira et al. (2019)

ตารางที่ 2.11 ปริมาณฟีนอลิกเทียบกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อลิกนิน 100 g และปริมาณ TAC% DPPH จากงานของ García et al. (2010)

Lignin sample	g GAE/100 g lignin	TAC%		
		t = 0 min	t = 60 min	t = 120 min
SL	14.19	12.71	16.07	18.05
SL 10 kDa	16.05	14.18	18.64	18.56
SL 15 kDa	14.93	26.15	25.22	26.98
OL	17.62	33.38	31.97	43.05
OL 10 kDa	18.24	38.79	38.71	49.89
OL 15 kDa	19.68	43.93	46.79	54.83
HL	22.73	22.40	35.61	37.26

SL, OL และ HL คือลิกนินจากการปรับสภาพด้วยต่าง, สารละลายเอทานอล, และน้ำตามลำดับ; 10 หรือ 15 kDa กล่าวคือ García et al. ต้องการพิสูจน์ว่าขนาดโมเลกุลของลิกนินที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการเดียวกัน (SL หรือ OL) ก็ส่งผลต่อคุณลักษณะของลิกนินที่แสดงออกเมื่อวัดค่าด้วยวิธีการต่างๆ (Phenolic content, DPPH assay, FTIR, TGA) แตกต่างกันไป

ในการทดลองนี้ García et al. (2010) พบว่า ลิกนินจากการปรับสภาพด้วยสารละลายเอทานอล และน้ำ (OL, HL) มีปริมาณฟีนอลมากกว่าลิกนินจากการปรับสภาพด้วยต่าง และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ลดปริมาณ DPPH) จะแปรผันตามปริมาณฟีนอลิกเทียบกรัมสมมูลกรดแกลลิก นอกจากนี้ลิกนินที่ผ่านการกรอง (ultrafiltrate) ด้วยเซรามิกเมมเบรน 10 และ 15 kDa มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าลิกนินที่มีได้ผ่านการกรอง



รูปที่ 2.30 ปริมาณ DPPH ของตัวอย่างลิกนินที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆ และสารละลายมาตรฐาน Trolox เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 nm เมื่อเวลาเปลี่ยนไป 0, 60 และ 120 นาที คัดแปลงจาก Garcia et al. (2010)

2.7 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM)

วิธีการนี้เรียกอีกอย่างว่าวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิว เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่มีประโยชน์สำหรับใช้ในการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหา โดยผลตอบ (response variable) จะขึ้นอยู่กับตัวแปรอิสระ (independent variables) โดยวิธีการนี้สามารถใช้หาจุดที่เหมาะสมต่อผลตอบ ในการนำเสนอแบบพื้นผิวผลตอบนั้นต้องมีการออกแบบการทดลองที่เหมาะสม โดยการทดลองนั้นจะต้องมีตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไป และมีตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวที่เป็นตัวแปรเชิงปริมาณ การออกแบบการทดลองที่นิยมใช้สร้างพื้นผิวผลตอบได้แก่ Factorial design, Central composite design และ Box-Behnken design ข้อมูลของตัวแปรอิสระ (independent variables: X_1, X_2, X_3) ที่สัมพันธ์กับข้อมูลของตัวแปรตามหรือผลตอบ (response variable: Y) สามารถนำมาสร้างเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ในการทำนายหรือปรับกระบวนการให้เหมาะสม (process optimization) ได้ (อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2545) ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามหรือผลตอบเหล่านี้สามารถอธิบายได้โดยสมการที่ (2.5)

$$Y = f(X_1 + X_2) + \varepsilon \quad (2.5)$$

เมื่อกำหนดให้ ε คือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นในค่าผลตอบ Y ซึ่งค่า Y นี้ได้มาจากการทดลอง และถ้าแสดงค่าคาดหวังของผลตอบเป็น

$$\begin{aligned} Y - \varepsilon &= f(X_1 + X_2) \\ E(Y) &= f(X_1 + X_2) = \eta \end{aligned} \quad (2.6)$$

สามารถเขียนสมการของพื้นผิวผลตอบได้ดังแสดงในสมการที่ (2.7)

$$\eta = f(X_1 + X_2) \quad (2.7)$$

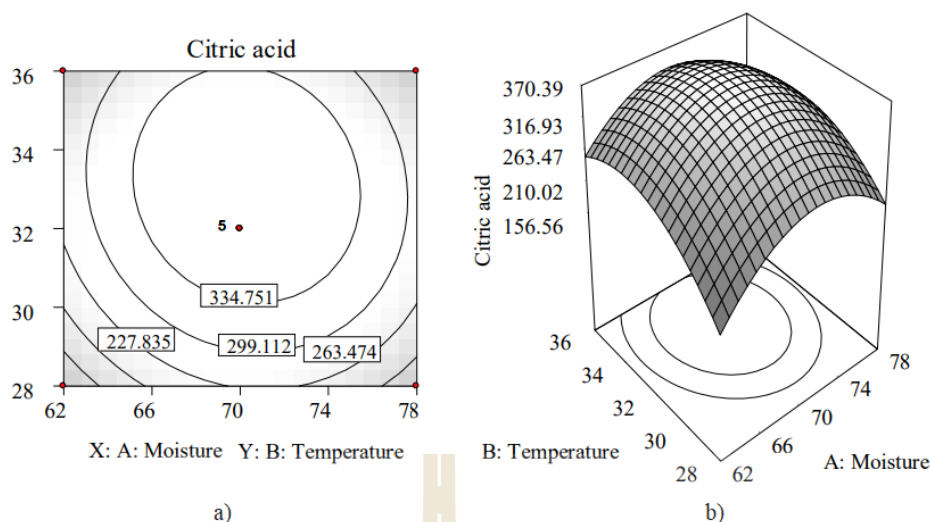
การแสดงผลของพื้นผิวตอบสนองนั้นส่วนมากจะแสดงในรูปกราฟฟิก โดยนำค่า η มา plot กับค่าของตัวแปรอิสระ X_1 และ X_2 ซึ่งจะช่วยให้มองเห็นรูปร่างของพื้นที่ผิวผลตอบได้ดียิ่งขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.31 แต่ในการศึกษาเกี่ยวกับพื้นผิวผลตอบนั้น ส่วนใหญ่จะไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและผลตอบ ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและผลตอบโดยหาตัวประมาณที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ได้โดยใช้ฟังก์ชันพหุนาม (polynomial) ที่มีเลขยกกำลังต่ำ ๆ ถ้าแบบจำลองของค่าผลตอบมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ฟังก์ชันที่ใช้ในการประมาณค่าความสัมพันธ์คือแบบจำลองกำลังหนึ่ง (1st order model) (อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2545) ดังสมการที่ (2.8)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.8)$$

หากความสัมพันธ์เป็นเส้นโค้ง จะต้องใช้พหุนามที่มีเลขยกกำลังสูงขึ้น เช่น แบบจำลองกำลังสอง (2nd order model) ดังแสดงในสมการที่ (2.9)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (2.9)$$

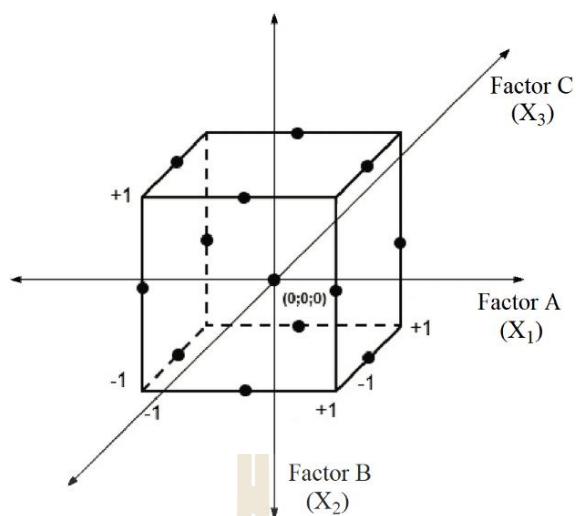
วิธีการพื้นผิวตอบสนองเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ใช้จัดการกับข้อมูลที่ซับซ้อน ทำให้ง่ายต่อการอธิบาย (Box and Behnken, 1960; Gan and Latiff, 2011) ช่วยลดจำนวนชุดทดลองที่มีอิทธิพลจากตัวแปรหลายตัวและปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านั้น การหาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนองจึงช่วยประหยัดแรงงานและเวลา (Giovanni, 1983; Ma et al., 2008)



รูปที่ 2.31 ภาพ 2 และ 3 มิติ ของพื้นผิวผลตอบ (a และ b ตามลำดับ) (Bari et al., 2012)

2.8 การออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box Behnken Design, BBD)

การออกแบบการทดลองเป็นกระบวนการวางแผนการทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความเหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติให้ได้ข้อสรุปที่สมเหตุสมผล การออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน เป็นการออกแบบการทดลองแบบ 3 ระดับ หรือ 3 ปัจจัย เพื่อใช้สำหรับลงค่าในแบบจำลองกำลัง 2 ในการหาค่าผลตอบ ข้อดีของการออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้คือมีประสิทธิภาพในด้านการออกแบบจำนวนการทดลองที่ต้องการ โดยการออกแบบเป็นรูปทรงกลมที่ทุกจุดวางอยู่บนผิวรัศมี 1 หน่วย หากนำมาลงแกนพิกัดจะได้ดังรูปที่ 2.32 ตัวอย่างการออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคนแบบ 3 ตัวแปรอิสระดังแสดงในตารางที่ 2.12 โดยจำนวนการทดลองทั้งหมดจะเท่ากับ 15 การทดลอง กำหนดให้พารามิเตอร์อยู่ในรูป -1 , 0 และ $+1$ (Paixoto et al., 2018) การทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคนมีจำนวนครั้งการทดลองที่น้อย ต้นทุนการทดลองจะถูกกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองแบบ fractional factorial design (FFD) หรือ central composite design (CCD) ในกรณีที่มีจำนวนปัจจัยเท่ากัน และสามารถมองภาพกว้าง เมื่อไม่สนใจจำนวนของปัจจัยภายใต้สภาวะที่ศึกษา (Ray et al., 2010; ดาริกา อวะภาค และคณะ, 2556; โอริส มณีสาย และ ปริญญา ศรีสัตยกุล, 2557, นพรัตน์ มะเห และคณะ, 2558)



รูปที่ 2.32 การออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน 3 ตัวแปรอิสระรอบพิกัด (0,0,0) (Paixoto et al., 2018)

ตารางที่ 2.12 แผนการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน 3 ตัวแปรอิสระ

Run	Box-Behnken experimental design		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

2.9 รายการอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2555). บทสรุปสำหรับผู้บริหารโครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับบริษัท จีอีอี. แมเนจเม้นท์ จำกัด. *กระทรวงพลังงาน*. 22 หน้า. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/2.รายงานสรุปสำหรับผู้บริหาร.pdf> วันที่ 25 มิถุนายน 2562.
- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. (2557). *ฐานข้อมูลศักยภาพชีวมวลในประเทศไทย ประจำปีเพาะปลูก พ.ศ. 2556*. กระทรวงพลังงาน. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://webkc.dede.go.th/testmax/node/2450> วันที่ 25 มิถุนายน 2562.
- กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ และปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. (2560). การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. *ว. วิทย. เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*. 3(1): 86-94.
- ชัชพันธ์ นิวาสวงษ์ และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2555). การผลิตเซลลูโลสเอทานอลในประเทศไทย. *ว. วิทย. มข.* 40 (4): 1073-1088.
- ดาริกา อวะภาค, นพรัตน์ มะเห และคลฤดี พิษย์รัตน์. 2556. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง. *ว. วิทย. มข.* 41(2): 414-430.
- นพรัตน์ มะเห, ดาริกา อวะภาค และคลฤดี พิษย์รัตน์. 2558. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณโปรตีนสูงจากหอยดัล (Meretrix casta) โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง. *ว. วิทย. มข.* 43(3): 425-438.
- นพวัฒน์ เฟ็งคำศรี, จตุพล กันทะมูล, ภัทรภรณ์ ไคว์พัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ราษฎร์, วนิตา ใจหมั่น, นิภาพร เมืองจันทร์ และ สุภารัตน์ จันทร์เหลือง. (2554). การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*. 6(3): 195-201.
- เนตรนภา เมฆกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2014). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องคั้นน้ำผลไม้. *KKU Res J (GS)*. 14(4): 69-79.
- บึงอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. (2549). การต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. โครงการพิเศษ (project) ตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. 41 หน้า.
- ปารเมศ ชูติมา. (2545). การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ 542 หน้า.

- ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช. (2551). พื้นฐานการทำความร้อนด้วยไมโครเวฟ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย
 ธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ 265 หน้า.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์. 2553. Microwave/ไมโครเวฟ. in **Food Network
 Solution-ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร**. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.
 foodnetworksolution.com/wiki/word/0401microwave-ไมโครเวฟ](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0401microwave-ไมโครเวฟ) 28 มิถุนายน 2562.
- วรานนท์ ทองอินลา, ชลธิชา วรณวิมลรักษ์ และภารดี ช่วยบำรุง. (2557). ความสัมพันธ์ระหว่าง
 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DMPD กับปริมาณฟีนอลิก วิตามิน
 ซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา**. 19(2): 93-104.
- วรวิภา จุฬาลักษณ์านุกุล. 2558. เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ. บทที่ 2 ไบโอบีโกลอจี. สำนักพิมพ์
 แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 124 หน้า.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. การปรับสภาพวัตถุดิบพวกกลีโคไลสสำหรับการผลิตเอทานอล.
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(5): 641-649.
- อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2545. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรม
 เกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนากสิกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร,
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 168 หน้า.
- โอริส รมณีสาย และ ปริญญา ศรีสัตยกุล. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเคลือบผิวโพลีดิโนนัม
 คาร์ไบด์ด้วยกระบวนการสเป็คเตอริง. ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์,
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ. 24 หน้า.
- Alexy, P., Kosiková, B., and Podstránska, G. (2000). The effect of blending lignin with
 polyethylene and polypropylene on physical properties. **Polymer**. 41(13): 4901-4908.
- Altınta MM, Ülgen KÖ, Kırdar B, Ilsen Z, Oliver ÖSG (2002) Improvement of ethanol production
 from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. **J Enz
 Microbial Tech**. 31: 640-647.
- Alzageem, A., Klein, S.E., Bergs, M., Do, X.T., Korte, I., Dohlen, S., Hüwe, C.,
 Kreyenschmidt, J., Kamm, B., Larkins, M., and Schulze, M. (2019). Antimicrobial
 activity of lignin and lignin-derived cellulose and chitosan composites against selected
 pathogenic and spoilage microorganisms. **Polymers**. 11(670): 1-18.
- An, L., Wang, G., Jia, H., Liu, C., Sui, W. and Si, C. (2017). Fractionation of enzymatic hydrolysis
 lignin by sequential extraction for enhancing antioxidant performance. **International
 Journal of Biological Macromolecules**. 99: 674-681.

- Banik S, Bandyopadhyay S, Ganguly S (2003) Bioeffects of microwave-a brief review. **Bioresour Technol.** 87: 155-159.
- Barclay, L.R.C., Xi, F., and Norris, J.Q. (1997). Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology.* 17(1-2): 73-90.
- Bari, N., Alam, Z., Muyibi, S.A., Jamal, P. and Mamun, A.A. (2012). Statistical optimization of process parameters for the production of citric acid from oil palm empty fruit bunches. **African Journal of Biotechnology.** 9(4): 554-563.
- Bastawde KB (1992) Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. **World J Microbiol.** Biotechnol 8: 353-368.
- Binod P, Satyanagalakshmi K, Sindhu R, Janu KU, Sukumaran RK, Pandey A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renew Energ.** 37: 109-116.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., and Caboni, M.F. (2004). Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **J. Agr. Food Chem.** 52: 5195-5200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., and Berset, C., (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method, *LWT-Food Sci. Technol.* 30(6): 609-615.
- Boonma S., Rangsee, W., and Chaiklangmuang, S. (2018). Effect of hydrothermal pre-treatment on ferulic acid content and antioxidant activities of corn hydrolysate. **Japan Journal of Food Engineering.** 19(1): 27-34.
- Boonsombuti, A., Luengnaruemitchai, A., and Wongkasemjit, S. (2013). Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology. **Cellulose.** 20(4): 1957-1966.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W., (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics.** 2: 455-475.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology.** 28(1): 25-30
- Browning, B.L., (1963). *The Chemistry of wood.* **Interscience (Wiley).** New York. 589 pp.
- Buranov, A.U., and Mazza, G. (2008)., Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products.** 28(3): 237-259.

- Calvo-Flores, F.G., and Dobado, J.A. (2010). Lignin as Renewable Raw Material. **ChemSusChem**. 3(11): 1227-1235.
- Cerretani, L., and Bendini, A. (2010). Section 3: Specific components of olive oil and their effects on tissue and body systems. pp.625-635. *in* Olives and olive oil in health and disease prevention. Edited by Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson. **Academic press**. 1520 pages.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., ElSohly, M.A., and Khan, I.A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** Article ID 253875: 1-9.
- Chen, M., Zhao, J., and Xia, L.M. (2009). Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Biomass and Bioenergy**. 33(10): 1381-1385.
- Chen, W.-H., Pen, B.-L., Yu, C.-T., and Hwang, W.-S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**. 102: 2916-2924.
- Chen, Z., Bertin, R., and Froidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH· assay using several statistical programs. **Food Chem**. 138(1): 414-420.
- Cheng, J., Huang, R., Yu, T., Li, T., Zhou, J., and Cen., K. (2014). Biodiesel production from lipids in wet microalgae with microwave irradiation and bio-crude production from algal residue through hydrothermal liquefaction. **Bioresource Technology**. 151: 415-418.
- Chung, H., and Washburn, N.R., (2012). Chemistry of lignin-based materials. **Green Mater**. 1(3): 137-160.
- Conesa, C., Seguí, L., Laguarda-Miró, N., and Fito, P. (2016). Microwave-assisted alkali pretreatment for enhancing pineapple waste saccharification. **BioRes**. 11(3): 6518-6531.
- Da Costa, L.A., Badawi, A., and El-Sohehy, A. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Ann Nutr Metab**. 60(suppl 3): 27-36.
- Dai, L., Liu, R., Hu, L.-Q., Zou, Z.-F., and Si, C.-L. (2017). Lignin nanoparticle as a novel green carrier for the efficient delivery of resveratrol. **ACS Sustainable Chem. Eng**. 5(9): 8241-8249.

- Dimmel, D., and Gellerstedt, G. (2010). Chapter 10: Chemistry of Alkaline Pulping. *in book: Lignin and Lignans*, Edited by Heitner, C., Dimmel, D.R., and Schmidt, J.A. CRC Press, Taylor & Francis Group. pp.349-391.
- Doherty, W., Mousavioun, P., Fellows, C. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**. 33(2): 259-276.
- Dudley, G.B., Richert, R., and Stiegman A.E., (2015). On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. **Chem Sci**. 6(4): 2144-2152.
- Duval, A., and Lawoko, M. (2014). A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. **Reactive and Functional Polymers**. 85: 78-96.
- Fan, J. (2013). The microwave activation of cellulose. PhD Dissertation. Department of Chemistry. **University of York**. 212 p.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C. and Duarte, A.P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. **Molecules**. 15: 9308-9322.
- Fellows, P.J. (2000). Dielectric, ohmic and infrared heating. pp. 365-384. *in Food Processing Technology: Principles and Practice*. 2nd ed. P.J. Fellows (ed.). **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge.
- Figueiredo, P., Lintinen, K., Kiriazis, A., Hynninen, V., Liu, Z., Bauleth-Ramos, T., Rahikkala, A., Correia, A., Kohout, T., Sarmento, B., Yli-Kauhaluoma, J., Hirvonen, J., Ikkala, O., Kostianen, M.A., and Santos, H.A. (2017)a. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. **Biomaterials**. 121: 97-108.
- Figueiredo, P., Ferro, C., Kemell, M., Liu, Z., Kiriazis, A., Lintinen, K., Florindo, H.F., Yli-Kauhaluoma, J., Hirvonen, J., Kostianen M.A., and Santos, H.A. (2017)b. Functionalization of carboxylated lignin nanoparticles for targeted and pH-responsive delivery of anticancer drugs. **Nanomedicine**. 12(21).
- Funk, C., Weber, P., Thilker, J., Grabber, J.H., Steinhart, H., and Bunzel, M. (2006). Influence of Lignification and Feruloylation of Maize Cell Walls on the Adsorption of Heterocyclic Aromatic Amines. **J. Agric. Food Chem**. 54(5): 1860-1867.
- Gabhane, J., Prince William, S.P.M., Vaidya, A.N., Mahapatra, K., and Chakrabarti T. (2011). Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment-A cellulosic ethanol perspective. **Biomass and Bioenergy**. 35(1): 96-102.

- Gan, C.-Y. and Latiff, A. (2011). Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*Garcinia mangostana*) rind: Optimization using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**. 83(2): 600-607.
- García, A., Toledano, A., Andres, M. A., and Labidi, J. (2010). Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. **Process Biochem**. 45(6): 935-940.
- Ghatak H.R. (2008). Electrolysis of black liquor for hydrogen production: some initial findings, **Int. J. Hydrogen Energy**. 31(7): 934-938.
- Giovanni, M. (1983). Response Surface Methodology and product optimization. **Food Technology**. 37(11): 41-45.
- Gordobil, O., Moriana, R., Zhang, L., Labidi, J., and Sevastyanova, O. (2016). Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products**. 83: 155-165.
- Goshadrou, A., Karimi, K., and Taherzadeh, M.J. (2011). Improvement of sweet sorghum bagasse hydrolysis by alkali and acidic pretreatments. Conference: **World Renewable Energy Congress**; 8-13 May 2011. Linköping, Sweden. 374-380.
- Han, H., Mou, J., Ma, W., and Jia, S. (2013). Effect of microwave on cell wall broken of penicillin fermentation residue. **Huagong Xuebao/CIESC Journal**. 64: 3812-3817.
- Henry, B.L., and Desai, U.R. (2014). Sulfated low molecular weight lignins, allosteric inhibitors of coagulation proteinases via the heparin binding site, significantly alter the active site of thrombin and factor Xa compared to heparin. **Thromb. Res**. 134(5): 1123-1129.
- Hu, F., and Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **Bioenerg. Res**. 5: 1043-1066.
- Hu, Z. H., and Wen, Z. Y. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**. 38(3): 369-378.
- Iuliano, L., Colavita, A.R., Leo, R., Praticò, D., and Violi, F. (1997). Oxygen free radicals and platelet activation. **Free Radic Biol Med**. 22(6): 999-1006.
- Jacob, J., Chia, L.H.L., and Boey, F.Y.C., (1995). Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials. **Journal of Materials Science**. 30(21): 5321-5327.

- Jaisamut, K., Paulová, L., Patáková, P., Rychtera, M., and Melzoch, K. (2013). Optimization of alkali pretreatment of wheat straw to be used as substrate for biofuels production. **Plant Soil Environ.** 59(12): 537-542.
- Junyusen, T. (2013). Wheat Lignin as a Functional Dietary Fiber Component. PhD Dissertation in Food Science and Technology, **Oregon State University**. 154 p.
- Kaewtatip, K., and Thongmee, J., (2013). Effect of Kraft lignin and esterified lignin on the properties of thermoplastic starch. **Mater. Des.** 49: 701-704.
- Kappe, C.O. (2008). Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry. **Chem. Soc. Rev.**, 37: 1127-1139.
- Karogodina, T.Y., Sergeeva, S.V., and Stass, D.V., (2011). Stability and reactivity of free radicals: A physicochemical perspective with biological implications. **Hemoglobin.** 35(3): 262-275.
- Keshwani, D.R., Cheng, J.J., Burns, J.C., Li, L., and Chiang, V. (2007). Microwave Pretreatment of Switchgrass to Enhance Enzymatic Hydrolysis. Conference: **ASABE Annual International Meeting**, Technical Papers. June 17-20, 2007. Minneapolis, Minnesota.
- Kim S.-Y., Shin S.J., Song C.-H., Jo E.-K., Kim, H.-J., and Park, J.-K. (2009). Destruction of *Bacillus licheniformis* spores by microwave irradiation. **Journal of Applied Microbiology.** 106(3): 877-885.
- Kosanic, M., Rankovic, B., and Vukojevic, J. (2011). Antioxidant properties of some lichen species. **J Food Sci Technol.** 48(5): 584-590.
- Kratchanova, M., Pavlova, E., and Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. **Carbohydrate Polymers.** 56(2): 181-185.
- Kriegsmann, G.A., (1997). Hot spot formation in microwave heated ceramic fibres. **IMA Journal of Applied Mathematics.** 59(2): 123-148.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., and Wyman, C.E. (2009). Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology.** 100(17): 3948-3962.
- Kute, A., Mohapatra, D., Babu, B., and Sawant, B.P. (2015). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel using response surface methodology. **Journal of Food Research and Technology.** 3(2): 62-70.

- Labaj, J., Slamenova, D., and Kosikova, B. (2003). Reduction of genotoxic effects of the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by dietary lignin in mammalian cells cultured in vitro. **Nutrition and Cancer**. 47(1): 95-103.
- Lee, J.B., Yamagishi, C., Hayashi, K., and Hayashi, T. (2011). Antiviral and immunostimulating effects of lignin-carbohydrate-protein complexes from *Pimpinella anisum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 75(3): 459-465.
- Laurichesse, S., and Avérous, L., 2014. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. **Prog. Polym. Sci.** 39(7): 1266-1290.
- Leng, L.Y., Nadzri, N.B., Yee, K.C., Razak, N.B.A., and Shaari, A.R. (2018). Antioxidant and total phenolic content of breadfruit (*Artocarpus altilis*) leaves. **MUCET 2017, MATEC Web of Conferences**. 150, 06007 pp. 1-4.
- Lepifre, S., Froment, M., Cazaux, F., Houot, S., Lourdin, D., Coqueret, X., Catherine, L., and Baumberger, S. (2004). Lignin incorporation combined with electron-beam irradiation improves the surface water resistance of starch films. **Biomacromolecules**. 5(5): 1678-1686.
- Li, M.-F., Sun, S.-N., Xu, F., and Sun, R.-C. (2012). Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. **Food Chemistry**. 134: 1392-1398.
- Liang, N., and Kitts, D.D. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. **Molecules**. 19(11): 19180–19208.
- Lupoi, J.S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B.A., and Henry, R.J. (2015). Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renew. Sustain. Energy. Rev.** 49: 871-906.
- Lutz, M., Hernández, J., and Henríquez, C. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. **CYTA J. Food**. 13(4): 541–547.
- Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y.-J., and Yu, Z.-L. (2008). Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource technology**. 100 (3): 1279-1284.
- Mahmood, Z., Yameen, M., Jahangeer, M., Riaz, M., Ghaffar, A., and Javid, I. (2018). Chapter 8: Lignin as natural antioxidant capacity. *in* Lignin – Trends and applications. Edited by M. Poletto. **Intech Open**. London. pp. 181-205.

- Matsushita Y., and Yasuda, S. (2005). Preparation and evaluation of lignosulfonates as a dispersant for gypsum paste from acid hydrolysis lignin. *96(4): 465-470.*
- Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., and Matuszewski, L. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus *Cerrena unicolor*. **Plos One**. 13(6): 1-14.
- McIntosh, S., and Vancov, T. (2011). Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**. 35(7): 3094-3103.
- Meesukanun, K., and Satirapipathkul, C. (2014). Production of acetone-butanol-ethanol from cassava rhizome hydrolysate by *Clostridium saccharobutylicum* BAA 117. **Chemical Engineering Transactions**. 37: 421-426.
- Mehta, A.Y., Mohammed, B.M., Martin, E.J., Brophy, D.F., Gailani, D., and Desai U.R. (2016). Allosterism-based simultaneous, dual anticoagulant and antiplatelet action: Allosteric inhibitor targeting the glycoprotein Iba and heparin-binding site of thrombin. **J. Thromb. Haemost.** 14(4): 828-838.
- Menezes Nogueira, I.d., Avelino, F., Oliveira, D,R.d., Souza, N.F., Rosa, M.F. Mazzetto, S.E. and Lomonaco, D. (2019). Organic solvent fractionation of acetosolv palm oil lignin: The role of its structure on the antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. 122: 1163-1172.
- Michelin, M., Liebentritt, S., Vicente, A.A., and Teixeira, J.A. (2018). Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. 120: 159-169.
- Minu, K., Kurian, J., and Kishore, V.V.N. (2012). Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw. **Biomass and Bioenergy**. 39(4): 210-217.
- Mirahmadi, K., Kabir, M.M., Jaihanipor, A., Karimi, K., and Taherzadeh, M.J., (2010). Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. **BioResources**. 5(2): 928-938.
- Mohsenzadeh, A., Jeihanipour, A., Karimi, K., and Taherzadeha, M.J. (2012). Alkali pretreatment of softwood spruce and hardwood birch by NaOH/thiourea, NaOH/urea,

- NaOH/urea/thiourea, and NaOH/PEG to improve ethanol and biogas production. **J Chem Technol Biotechnol.** 87: 1209-1214.
- Mosier, N.S., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N., Sedlak, M., Dreshel, R., Welch, G., Dien, B.S., Aden, A., and Ladisch, M.R., (2005). Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol.** 125(2): 77-97.
- Notley, S.M., and Norgren, M. (2009). Lignin: functional biomaterial with potential in surface chemistry and nanoscience. *in* **Nanoscience and Technology of Renewable Biomaterials**. Eds. Lucia, L.A. and Rojas, O., 173-205. John Wiley & Sons Ltd.
- Obermayer, D., Gutmann, B., and Kappe, C.O. (2009). Microwave chemistry in Silicon carbide reaction vials: Separating thermal from nonthermal effects. **Angewandte Chemie.** 48 (44): 8321-8324.
- Okoh, S.O., Asekun, O.T., Familoni, O.B., and Afolayan, A.J. (2014). Antioxidant and free radical scavenging capacity of seed and shell essential oils extracted from *Abrus precatorius* (L). **Antioxidants (Basel).** 3(2): 278-287.
- Olugbami, J.O., Gbadegesin, M.A., and Odunola, O.A. (2014). In vitro evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *Anogeissus leiocarpus*. **Afr J Med Med Sci.** 43(Suppl 1): 101-109.
- Oluwadare, A., Angguruwa, G.T., and Sotannde O. (2016). Characterization of energy value og lignin extracted from mill wood residues of *Gmelina arborea* and *Tectona grandis*. **J. For. Sci. Env.** 1(1): 14-20.
- Ouyang, X., Ke, L., Qiu, X., Guo, Y., and Pang, Y. (2009). Sulfonation of alkali lignin and its potential use in dispersant for cement. **Journal of Dispersion Science and Technology.** 30(1): 1-6.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., and Huang, F. (2008) Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) peel. **Food Chemistry.** 106: 1264-1270.
- Panthapulakkal, S., Kirk, D., and Sain, M. (2015). Alkaline Extraction of Xylan from Wood Using Microwave and Conventional Heating. **Journal of Applied Polymer Science.** 132(4).

- Peng, H., Luo, H., Jin, S., Hongqiang, L., and Xu, J. (2014). Improved bioethanol production from corn stover by alkali pretreatment with a novel pilot-scale continuous microwave irradiation reactor. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 19(3): 493-502.
- Peixoto, A.L., & Esperança, M., Salazar, R., and Costalonga, A. (2018). Chapter 3: Design of experiments applied to antibiotics degradation by Fenton's reagent. *in* Statistical approaches with emphasis on design of experiments applied to chemical processes. 1st edition, Editors: Valter Silva, Nuno Tiago Dinis Couto, **InTech**. 21-42.
- Plazanet, I., Zerrouki, R., Lhernould, S., Breton, C., and Costa, G. (2015). Direct immunological detection of wood cell wall polysaccharides after microwave-assisted ionic liquid disruption. **J Glycobiol**. 4 (115).
- Prakobboon, N., and Vahdati, M. (2013). Review of the potential for co-firing of cassava rhizome for generating heat and power in cassava based bio-ethanol plant in Thailand. **International Journal of Biomass & Renewables**. 2(2): 14-22.
- Puligundla, P., Oh, S.-E., and Mok, C. (2016). Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review. **Carbon Letters**. 17(1): 1-10.
- Qazi, S.S., Li, D., Briens, C., Berruti, F., and Abou-Zaid, M.M. (2017). Antioxidant activity of the lignins derived from fluidized-bed fast pyrolysis. **Molecules**. 22(3), 372: 1-14.
- Qin, Y., Yand, D., and Qiu, X. (2015). Hydroxypropyl sulfonated lignin as dye dispersant: Effect of average molecular weight. **ACS Sustainable Chem. Eng.** 3(12): 3239-3244.
- Quitain, A.T., Kai, T., Sasaki, M., and Goto, M. (2013). Microwave-hydrothermal extraction and degradation of Fucoidan from supercritical Carbon dioxide deoiled *Undaria pinnatifida*. **Ind. Eng. Chem. Res.** 52(23): 7940-7946.
- Ragauskas, J., Beckham, G.T., Bidy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A.K., Saddler, J.N., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., and Wyman, C.E. (2014). Lignin valorization: Improving lignin processing in the biorefinery. **Science**. 344(6185): 1246843.
- Rattana, S., and Sungthong, B. (2016). Antioxidant activities and total phenolic contents of methanolic extract from five fragrant flowers. Conference: **The 12th Mahasarakham University Research Conference**. At Maha Sarakham, Thailand, Volume: special. 360-365.

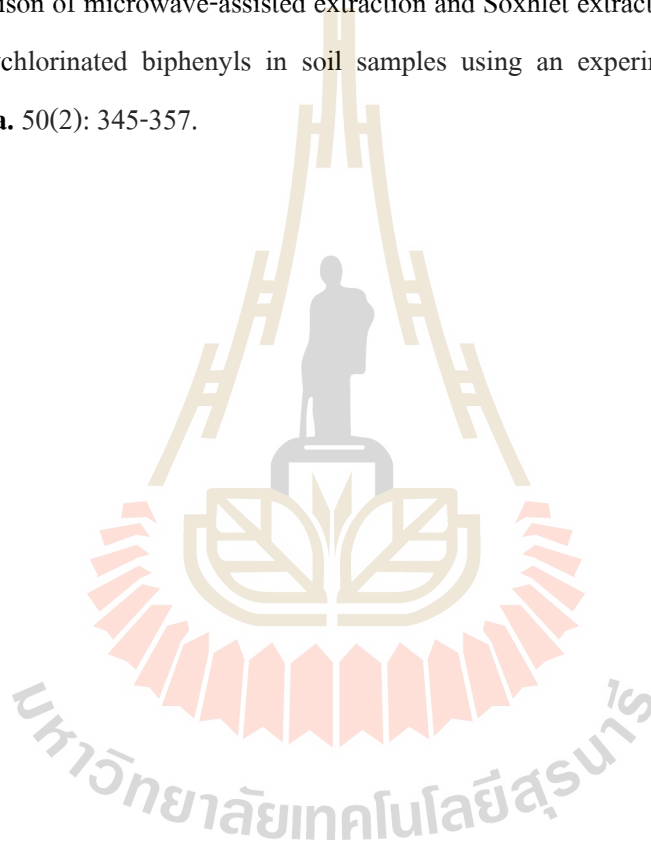
- Ray, S., Reaume, S.J., and Lalman, J.A. (2010). Developing a statistical model to predict hydrogen production by a mixed anaerobic mesophilic culture. **International Journal of Hydrogen Energy**. 35(11): 5332-5342.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A.S., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.** 26(9-10): 1231-1237.
- Rosana, M.R., Hunt J., Ferrari, A., Southworth, T.A., Tao, Y., Stiegman, A.E., Dudley, G.B. (2014). Microwave-specific acceleration of a Friedel-Crafts reaction: evidence for selective heating in homogeneous solution. **J. Org. Chem.** 79(16): 7437-7450.
- Rosenthal, I. (1992). Microwave radiation. *in* Electromagnetic radiations in food science. **Advance Series in Agricultural Sciences**. Springer Verlag. Berlin. 19.
- Salehian, P., Karimi, K., Zilouei, H., and Jeihanipour, A. (2013). Improvement of biogas production from pine wood by alkali pretreatment. **Fuel**. 106: 484-489.
- Santos, P.S.B., Erdocia, X., Gatto, D.A. and Labidi, J. (2014). Characterisation of kraft lignin separated by gradient acid precipitation. **Industrial Crops and Products**. 55: 149-154.
- Sengupta, G., Gaurav, A., and Tiwari, S. (2018). Chapter 3: Substituting medicinal plants through drug synthesis. pp. 47-74. *in* Synthesis of medicinal agents from plants. Edited by A. Tewari and S. Tiwari. **Elsevier Ltd**, Amsterdam. 384 pages.
- Shamis, Y., Alex, T., Mitik-Dineva, N., Croft, R., Crawford, R.J., and Ivanova, E.P. (2011). Specific electromagnetic effects of microwave radiation on *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**. 77(9): 3017-3023.
- Singh, A., Tuteja, S., Singh, N., and Bishnoi, N.R. (2011). Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave-alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production. **Bioresource Technology**. 102(2): 1773-1782.
- Singh, R., Tiwari, S., Srivastava, M., and Shukla, A. (2014). Microwave assisted alkali pretreatment of rice straw for enhancing enzymatic digestibility. Hindawi Publishing Corporation, **Journal of Energy**. 2014: 1-7.
- Singleton, V., and Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16: 144-148.

- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** 299: 152-178.
- Sudrik, S.G., Chavan, S.P., Chandrakumar, K.R.S., Pal, S., Date, S.K., Chavan, S.P., and Sonawane, H.R. (2002). Microwave Specific Wolff Rearrangement of α -Diazoketones and Its Relevance to the Nonthermal and Thermal Effect. **J. Org. Chem.** 67(5): 1574-1579.
- Sun, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology.** 83: 1-11.
- Sun, R., Lawther, J.M., and Banks, W.B. (1997). A tentative chemical structure of wheat straw lignin. **Industrial Crops and Products.** 6: 1-8.
- Sun, R.C., Tomkinson, J., and Bolton, J. (1999). Effects of precipitation pH on the physicochemical properties of the lignins isolated from the black liquor of oil palm empty fruit bunch fiber pulping. **Polym. Degrad. Stabil.** 63: 195-200.
- Sun, S.-L., Wen, J.-L., Ma, M.-G., Sun, R.-C., Gwynn, L.J. (2014). Structural features and antioxidant activities of degraded lignins from steam exploded bamboo stem. **Industrial Crops and Products.** 56: 128-136.
- Suttibak, S., Sriprateep, K., and Pattiya, A. (2012). Production of bio-oil via fast pyrolysis of cassava rhizome in a fluidised-bed reactor. **Energy Procedia.** 14: 668-673.
- Tadhani, M.B., Patel, V.H., and Subhash, R. (2007) In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis.** 20: 323-329.
- Teixeira, T.S., Cássia do Vale, R., Almeida, R., Ferreira, T.P.S., Guimarães, L.G.L. (2017). Antioxidant potential and its correlation with the contents of phenolic compounds and flavonoids of methanolic extracts from different medicinal plants. **Rev. Virtual Quím.** 9 (4): 1546-1559.
- Thakkar, J.N., Tiwari, V., and Desai, U.R. (2010). Nonsulfated, cinnamic acid-based lignins are potent antagonists of HSV-1 entry into cells. **Biomacromolecules.** 11(5): 1412-1416.
- Tribot, A., Amer, G., Alio, M.A., Baynast, H.D., Delattre, C., Pons, A., Mathias, J.-D., Callois, J.M., Vial, C., Michaud, P., and Dussap, C.-G., (2019). Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. **European Polymer Journal.** 112: 228-240.

- Tsubaki, S., Azuma, J., Yoshimura, T., Maitani, M.M., Suzuki, E., Fujii, S., and Wada, Y. (2016). Microwave-induced biomass fractionation, in **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. 1st ed (S. Mussatto), Elsevier. Amsterdam. 103-126.
- Turapra, B., Boonyarat, C., Chulikhit, Y., and Daodee, S. (2015). Determination of Active Constituents and Antioxidative Activity in *Citrus maxima* (Burm.) Merr. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 11(Suppl 5): 80-91.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni P., and Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**. 7(1): 65-74.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 266(1-2): 37-56.
- Vinardell, M.P., and Mitjans, M. (2017). Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **Int J Mol Sciv**. 18(6): 1219, 15 pages.
- Wang, Q., Mu, H., Zhang, L., Dong, D., Zhang, W., and Duan, J. (2015). Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. **Int. J. Biol. Macromol**. 74: 507-514.
- Ware, M., and Olsen, N. (2018). How can antioxidants benefit our health? **Healthline Media UK Ltd**, Brighton, UK. Last updated May, 29 2018. [On line] available: <https://www.medicalnews today.com/articles/301506.php> June, 6 2019.
- Welker, C.M., Balasubramanian, V.K., Petti, C., Rai, K.M., BeBolt, S., and Mendu, V., (2015). Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. **Energies**. 8: 7654-7676.
- Wildman, R.E.C. (2007). Handbook of nutraceuticals and functional foods. 2nd edition. Boca Raton London New York, **Taylor & Francis Group, CRC Press**. 560 pages.
- Xiong, J., Ye, J., Liang, W.Z., and Fan, P.M. (2000). Influence of microwave on the ultrastructure of cellulose I. **J Sou Chin Uni Technol**. 28: 84-89.
- Xue, B.-L., Li, M.-F., Xu, F., Sun, R.-C., and Jones G., (2012). Microwave-enhanced alkali treatment of *Pinus yunnanensis*: Physicochemical characterization of the dissolved lignins. **Industrial Crops and Products**. 36(1): 209-216.

- Yarris, L., (2010). Figure: Lignocellulose *in* The Evolutionary Road to Biofuels. Berkeley lab., **U.S. Department of Energy**. [On line] available: <https://www2.lbl.gov/Publications/YOS/> Feb/On June 28, 2019.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. **J. Agric. Food Chem.** 50(6): 1619-1624.
- Yunfeng, Z., Lin, L., Lan, S., Lidong, Z., and Yang, X. (2018). In comparison with vitamin C and butylated hydroxytoluene, the antioxidant capacity of aqueous extracts from buds and flowers of *Lonicera japonica* Thunb. **Journal of Traditional Chinese Medicine.** 38(3): 373-379.
- Zhong, R., Morrison, W.H., Negrel, J., and Ye, Z.H. (1998) Dual methylation pathway in lignin biosynthesis. **The Plant Cell.** 10: 2033-2045
- Zhu, S.D., Yu, Z.N., Wu, Y.X., Zhang, X., Li, H., and Gao., M. (2005)a. Enhancing enzymatic hydrolysis of rice straw by microwave pretreatment. **Chem. Eng. Commun.** 192(10-12): 1559-1566.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Liao, J.T., and Zhang, Y. (2005)b. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry.** 40(9): 3082-3086.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Zhao, Y., Tu, S.Y., and Xue, Y.P. (2005)c. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pretreated rice straw to ethanol. **Biosystems Engineering.** 92(2): 229-235.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Chen, Q., Wu, G., Yu, B., Wang, C., and Jin, S. (2006)a. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering.** 94: 437-442.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R., Liao, J., and Zhang, Y. (2006)b. Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Biosystems Engineering.** 93(3): 279-283.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Zhang, X., Li, H., and Gao, M. (2006)c. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology.** 97(15): 1964-1968.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C.W., Quan, Y.F., and Jin, S.W. (2006)d. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. **Process Biochemistry.** 41(4): 869-873.

- Zhu, Z., Simister, R., Bird, S., McQueen-Mason, S.J., Gomez, L.D., and Macquarrie, D.J. (2015). Microwave assisted acid and alkali pretreatment of Miscanthus biomass for biorefineries. **AIMS Bioengineering**. 2(4): 449-468.
- Zhu, Z., Rezende, C.A., Simister, R., McQueen-Mason, S.J., Macquarrie, D.J., Polikarpov, I., and Gomez L.D. (2016). Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. **Biomass and Bioenergy**. 93: 269-278.
- Zuloaga O., N. Etxebarria, L.A. Fernandez and J.M. Madariaga. (1999). Optimization and comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. **Talanta**. 50(2): 345-357.



บทที่ 3

การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างเพื่อเพิ่มผลิตภาพกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

3.1 บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างเพื่อเพิ่มผลิตภาพกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH) โดยใช้วิธีการพินผิวตอบสนอง ทำการออกแบบการทดลอง Box-Behnken design ปัจจัยในการปรับสภาพได้แก่ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (300-900 W), ระยะเวลาการฉายคลื่น (5-15 min), และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH (3-7% w/v); การ EnH ที่เวลา 24 และ 48 h. แบบจำลองพหุนามกำลังสองได้ถูกสร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ร่วมระหว่างพารามิเตอร์การปรับสภาพที่มีการตอบสนอง การวิเคราะห์ทางสถิติถูกดำเนินการและผลลัพธ์ถูกตรวจสอบถึงความเพียงพอ (adequate) ของแบบจำลองการพยากรณ์ ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง มีค่ากำลังของคลื่นไมโครเวฟที่ 840 W, ระยะเวลาการฉายคลื่น 9 min, และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH 3% ภายใต้สภาวะดังกล่าว สำหรับการ EnH เป็นเวลา 24 h ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการพยากรณ์และการทดลองมีค่า 15.39 และ 15.82 g/100 g NCR DM., สำหรับการ EnH เป็นเวลา 48 h ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการพยากรณ์และการทดลองมีค่า 16.40 และ 16.95 g/100 g NCR DM., บ่งชี้ถึงความสามารถในการพยากรณ์ที่ดีของแบบจำลอง นอกจากนี้การศึกษายังได้ทำการตรวจสอบถึงสมบัติทางกายภาพ-เคมี ทั้งเริ่มต้นและที่ทำกรปรับสภาพแล้ว แสดงลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างมีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเข้าถึงของเอนไซม์และเพิ่มปริมาณผลิตกลูโคส

คำสำคัญ: เหง้ามันสำปะหลัง, การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส, คลื่นไมโครเวฟ, สารละลายต่าง, กลูโคส, วิธีการพินผิวตอบสนอง, ค่าเหมาะสมที่สุด

3.2 บทนำ

องค์ประกอบของชีวมวลพืชส่วนใหญ่แล้ว มีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เกือบ 90% ของมวลแห้ง ลิกนินในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสในไปสู่ความยากลำบากในการแปลงสภาพ และนำไปใช้ ในธรรมชาติลิกนินเป็นองค์ประกอบของพืชที่ต่อต้านการถูกทำลายของเซลล์จาก จุลินทรีย์ การย่อยสลายของเอนไซม์ และสารเคมี แม้กระทั่งความแข็งแรงทางกายภาพของโครงสร้าง เนื้อเยื่อพืช ความยากในการแยกองค์ประกอบดังกล่าวยังจำกัดการเข้าถึงและใช้ประโยชน์ การปรับสภาพ (ทำให้ง่ายต่อการแยกสลายลิกโนเซลลูโลส) และแปลงสภาพ (แปลงแต่ละส่วนของ องค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสไปใช้) จากชีวมวลไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มจึงเป็นสิ่งที่ท้าทาย (Kumar et al., 2009; Yuan et al., 2010) และไม่ว่าการแปลงสภาพจากลิกโนเซลลูโลสไปสู่น้ำตาล สารให้ความหวานพลังงานต่ำ สารหล่อลื่น พอลิเมอร์ชีวภาพ เพื่อเพลิงเอทานอล บิวทานอล หรือ ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มใดๆ ล้วนต้องผ่านปัญหาขอขวดในการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อแยก ลิกโนเซลลูโลสให้ได้องค์ประกอบเดี่ยวๆ (isolate) ที่ต้องการนำไปใช้เสียก่อน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงศึกษา ถึงสภาวะการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแห่งมันสำปะหลัง โดยดำเนินการในระดับ ห้องปฏิบัติการ

การแปลงสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสไปสู่ผลิตภัณฑ์จากชีวภาพ (bio-products) โดยทั่วไป ย่อมเกี่ยวข้องกับการปรับสภาพ โดยแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก ลดสภาพผลึกของเซลลูโลส และเพื่อความพรุนของเซลลูโลสก่อน EnH เซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคส การปรับสภาพที่แตกต่างกันมีความเหมาะสมสำหรับชีวมวลแต่ละชนิด เพื่อลดปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลส แต่ยังคงมวลของ เซลลูโลสเอาไว้ (Mosier et al., 2005) งานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างมี ประสิทธิภาพสูงและเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน (Safari et al., 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับสภาพ โดยใช้สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มีประสิทธิภาพในการสลายลิกนิน ละลายเฮมิ เซลลูโลส และทำให้เซลลูโลสพองตัว การพองตัวนี้จะเพิ่มพื้นที่ผิวและปริมาตรช่องว่างในเนื้อมวล เซลลูโลส อย่างไรก็ดี การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง NaOH ยังคงต้องใช้เวลาและมีความ จำเป็นที่ต้องล้างสภาวะต่าง (neutralization)

จากรายงานการวิจัยของ Zhu et al. (2006) พบว่าการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟกำลังสูง แต่ใช้ระยะเวลาสั้นส่งผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างฟางข้าวสาลีเช่นเดียวกันกับการปรับสภาพ ด้วยคลื่นไมโครเวฟกำลังต่ำแต่ใช้ระยะเวลานาน การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับ สารละลายด่างช่วยเพิ่มอัตราการ EnH โดยใช้เอนไซม์ในปริมาณน้อยลง ความเข้มข้นของน้ำตาล ริคิวิซ์และปริมาณกลูโคสมากกว่า และได้ปริมาณเอทานอลมากกว่าการใช้สารละลายด่างด้วยวิธีการ ดั้งเดิม Xu et al. (2011) พบว่าปริมาณเอทานอล จะได้มากขึ้นจาก 26.78 เป็น 148.93 g/kg เมื่อปรับ สภาพฟางข้าวสาลีด้วยคลื่นไมโครเวฟเทียบกับฟางข้าวสาลีดิบที่มีได้ทำการปรับสภาพ และได้

ปริมาณเอทานอลมากกว่าวิธีการให้ความร้อนแบบธรรมดาที่ใช้สารละลายกรดหรือด่างร่วมด้วย ตั้งแต่ 67.7-104.3 g/kg นอกจากนี้ Ma et al. (2008) ได้ออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design และใช้วิธี response surface methodology โดยกำหนดปัจจัยในการทดลองคือ กำลังของไมโครเวฟ, ระยะเวลาฉายคลื่น และปริมาณของแข็งในสารละลายทำการ พบว่าคลื่นไมโครเวฟจะช่วยทำลายผิว wax บนใบฟางข้าวและทำลายความซับซ้อนของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส รวมทั้งซัลฟอนและลิกนินบางส่วน Singh et al. (2011) ได้ใช้การออกแบบการทดลอง Box-Behnken พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพฟางข้าวและเคลือบด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่าง ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสารละลายด่างอยู่ที่ 2.75%, เวลาการปรับสภาพ 22.50 min และความเข้มข้นของสับสเตรท 30 g/L Binod et al. (2012) พบว่าการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟกำลัง 450 W ร่วมกับสารละลายด่างเป็นเวลา 5 min ช่วยลดปริมาณลิกนินในชานอ้อยได้กว่า 90% Mohamad et al. (2012) พบว่าการปรับสภาพเนื้อไม้คอร์เทกของลำต้นปาล์มสาแควด้วยคลื่นไมโครเวฟ 250 W ร่วมกับสารละลายด่าง 3% w/v NaOH เป็นเวลา 5 min จะส่งเสริมการ EnH ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด Panthapulakkal et al. (2015) พบว่าการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างช่วยให้เกิดการไฮโดรไลซิส xylan จากไม้ Birch wood ได้ดีกว่าการใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมและใช้ระยะเวลาสั้นกว่าถึง 20 เท่า Peng et al. (2014) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายด่างและอุณหภูมิที่สูงขึ้นจำเป็นต่อการสลายและละลายของเซลลูโลส เมื่อทำการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่าง ตัวอย่างสามารถถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์และด้วยปริมาณเอทานอลที่สูงเมื่อเทียบกับปริมาณที่จะได้ทางทฤษฎี Conesa et al. (2016) พบว่าการปรับสภาพของเสี้ยจากโรงงานสับประรดด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างช่วยส่งเสริมการ EnH ทำให้ได้น้ำตาลปริมาณมาก และควรใช้ระยะเวลาการปรับสภาพไม่นานนัก มิฉะนั้นจะเกิดการสลายตัวของน้ำตาลและเกิดสารขัดขวางกระบวนการหมัก เช่น phenols และ HMF เมื่อทำการตรวจโครงสร้างด้วยกล้อง SEM แสดงให้เห็นว่าการปรับสภาพโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างด้วยระยะเวลาการฉายคลื่นที่สั้น ช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง อันสนับสนุนการ EnH ให้ได้น้ำตาลและจะได้เอทานอลปริมาณมาก แต่หากเพิ่มความรุนแรงในการปรับสภาพกลับทำให้โครงสร้างเกิดความกระชับตัว ยากต่อการเข้าไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ และทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง

ด้วยเหตุนี้ การปรับสภาพโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่าง (microwave-assisted alkali pretreatment, MAP) จึงถูกนำมาใช้เพื่ออำนวยความสะดวกการทำลายโครงสร้างที่แข็งแกร่งของชีวมวลนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตกลูโคสหลังการ EnH ตามรายงานของ Hu and Wen (2008), Saifuddin et al. (2013) MAP มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเข้าถึงของเอนไซม์ในลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีงานที่ทำการปรับสภาพในฟางข้าว (Zhu et al., 2005), ฟางข้าวสาลี (Singh and Bishnoi, 2012), ชั้

ข้าวโพด (Peng et al., 2014), ซานอ้อย (Huang et al., 2017), และทะลายน้าลิ้ม (Saifuddin et al., 2013). อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการ MAP ในเหง้ามันสำปะหลัง และการหาสภาวะการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุดเพื่อยกระดับผลผลิตกลูโคส

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาสภาวะการ MAP เหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดซึ่งจะยกระดับผลผลิตกลูโคสหลังจาก EnH โดยแสดงผลบนพื้นผิวดอบสนองจากออกแบบการทดลองด้วย BBD พารามิเตอร์ในการปรับสภาพประกอบด้วยกำลังของคลื่นไมโครเวฟ 300, 600 และ 900 W ระยะเวลาการฉายคลื่น 5, 10 และ 15 min และความเข้มข้นของสารละลายต่าง NaOH 3, 5, และ 7% (w/v), ตามลำดับ ทำการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h นอกจากนี้ การศึกษาสมบัติทางกายภาพ-เคมีของเหง้ามันสำปะหลังเริ่มต้นและที่ผ่านการ MAP แล้ว จะถูกนำมาเปรียบเทียบและอภิปรายร่วมด้วย

3.3 วัตถุประสงค์

เพื่อหาสภาวะการ MAP เหง้ามันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะยกระดับผลผลิตกลูโคสหลังจาก EnH โดยแสดงผลบนพื้นผิวดอบสนองจากออกแบบการทดลองด้วย BBD พารามิเตอร์ในการปรับสภาพประกอบด้วยกำลังของคลื่นไมโครเวฟ 300, 600 และ 900 W ระยะเวลาการฉายคลื่น 5, 10 และ 15 min และความเข้มข้นของสารละลายต่าง NaOH 3, 5, และ 7% (w/v), ตามลำดับ ทำการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h นอกจากนี้ การศึกษาสมบัติทางกายภาพ-เคมีของเหง้ามันสำปะหลังเริ่มต้นและที่ผ่านการ MAP แล้ว จะถูกนำมาเปรียบเทียบและอภิปรายร่วมด้วย

3.4 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมวัสดุ

ใช้มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง อายุปลูก 14 เดือน เก็บเกี่ยวเหง้า (cassava rhizome, CR หรือ cassava stump/base of stem) สดจากแปลงปลูกใน จ.นครราชสีมา ปี 2559 สภาพปลูกดินร่วนปนทราย (coarse-loamy) นอกเขตชลประทาน ส่วนล่างของเหง้าตัดส่วนที่เป็นรากสะสมแป้ง (starchy tuberous root) ออก จนแน่ใจว่าเป็นส่วนของเหง้าลิกโนเซลลูโลส มิได้ปะปนด้วยส่วนที่เป็นรากสะสมแป้ง ส่วนบนตัดส่วนที่เป็นลำต้นใหม่ที่งอกจากเหง้าออก เพื่อไม่ให้ปะปนกับส่วนที่เป็นลำต้นใหม่ที่เจริญจากท่อนพันธุ์ในรอบปีปลูก นำเหง้าดังกล่าวซึ่งมีขนาด 26.50 ± 3.04 cm (ค่าเฉลี่ยจากการเก็บเกี่ยวในงานวิจัยนี้) มาล้างด้วยน้ำประปา ชัดด้วยแปรงขนอ่อนให้สะอาดจากทรายและดิน ตัดเป็นแว่นหนา 3-5 mm อบแห้งชั้นบาง 40°C 72 h (Memmert Universal Oven UF 110, Germany) กระบวนการตั้งแต่ตัดเหง้าสดจากต้นกระทั่งเข้าสู่อบได้ทำในระยะเวลาไม่เกิน 12 h ไม่เก็บเหง้าที่เกยตรกรทิ้งคาแปลง นำเหง้ามันสำปะหลังแห้งแว่นแห้งดังกล่าวบดผ่านเครื่องบด (Cross Beater Mill SK 300, Retsch, Germany) ตะแกรงทางออกของเครื่องขนาด 2.0 mm นำมวลที่ได้ร่อนผ่านตะแกรง

ขนาด 1.0 mm ใช้เฉพาะส่วนคาง (1.0-2.0 mm) ตามมาตรฐานการวิเคราะห์ของ NREL ความชื้นสุดท้ายหลังบดมีค่าประมาณ 7% w.b. จากการตรวจสอบด้วยการอบลมร้อน 105°C จนมวลคงที่ (5 h) เหง้ามันสำปะหลังที่ได้ (native cassava rhizome, NCR) เก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทในตู้ทำแห้งอัตโนมัติที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะทำการทดสอบ

3.4.2 การหาค่าประกอบเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ

องค์ประกอบทางเคมีถูกวิเคราะห์ตามมาตรฐานของ Laboratory Analytical Procedures of the National Renewable Energy Laboratory (Sluiter et al., 2008; Sluiter et al., 2012)

3.4.3 การปรับสภาพโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง

มวลเหง้ามันสำปะหลังขนาด 1.0-2.0 mm ดังกล่าวถูกชั่งตัวอย่าง (sampling) ตรวจสอบความชื้นขณะนั้น แล้วคำนวณกลับว่าหากใช้เฉพาะมวลแห้ง (DM.) 1.5000 g จะใช้เหง้ามันสำปะหลังดังกล่าวน้ำหนักเท่าใด แขนงลอยในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 3, 5 หรือ 7% w/v ปริมาตรสารละลายต่าง 50 mL (3% solid loading w/v) สารแขวนลอยดังกล่าวถูกฉายด้วยเครื่องปฏิกรณ์ไมโครเวฟย่อยสาร Microwave digestion (Multiwave 3000, Anton Paar GmbH, Austria) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ 300, 600 และ 900 W ระยะเวลาการฉายคลื่น 5, 10 และ 15 min ตามลำดับ การทดลองและขนาดของปัจจัยใน BBD กรองสารแขวนลอยดังกล่าวด้วยถ้วยกระเบื้องกรอง ดึงสารด้วยปั๊มสุญญากาศ มวลของแข็งบนถ้วยกระเบื้องกรองถูกล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจนกระทั่งสารละลายจากการล้างมวลดังกล่าวมีค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 7-8 ทำแห้งเยือกแข็งมวลเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพ (pretreated cassava rhizome, PCR) ดังกล่าว คำนวณร้อยละของปริมาณของแข็งคงเหลือ, ร้อยละของปริมาณลิกนินที่สามารถขจัดได้ และร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือ คำนวณตามสมการที่ (3.1)-(3.4) ดังต่อไปนี้

$$\text{Solid recovery (\%)} = \frac{\text{Weight of pretreated CR (g)}}{\text{Weight of initial NCR (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Lignin removal (\%)} = \left(1 - \frac{\text{LPCR (g)}}{\text{LNCR (g)}}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Glucan recovery (\%)} \text{ base on NCR} = \frac{\text{Glucan content of pretreated CR (g)}}{\text{Glucan content of NCR (g)}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Glucan recovery (\%)} \text{ base on PCR} = \frac{\text{Glucan content of pretreated CR (g)}}{\text{Glucan content of PCR (g)}} \times 100 \quad (3.4)$$

เมื่อ LPCR คือ ปริมาณลิกนินของแห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว
 LNCR คือ ปริมาณลิกนินของแห้งมันสำปะหลังที่มีได้ผ่านการปรับสภาพในงานวิจัยนี้
 พบว่ามีค่า 23.9106% w.b. ในมวลแห้ง

3.4.4 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH)

การไฮโดรไลซิส NCR และ PCR ด้วยเอนไซม์ ดำเนินการตามมาตรฐานของ NREL (Selig et al., 2008) อาจมีการดัดแปลงบางส่วนเพื่อให้สะดวกต่อการปฏิบัติงานโดยไม่ทำให้เสียสาระของวิธีการ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ใช้ sodium citrate buffer (pH 4.8) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 5 mL และ sodium azide ความเข้มข้น 2% (w/v) ปริมาตร 0.1 mL ถูกเติมลงในหลอด EnH ซึ่งมี NCR หรือ PCR ที่มีเซลลูโลสหรือ กลูแคน 0.1 g แล้วเติมน้ำซึ่งคำนวณไว้ว่าเมื่อเติมเอนไซม์แล้วสารแขวนลอยทั้งหมดในแต่ละหลอดจะมีน้ำหนักทั้งสิ้น 10 g (1.5% solid loading) รวบรวมหุ้มน้ำสารแขวนลอยในเครื่องบ่มเขย่าเป็น 50°C เติม Cellulase complexes (cellulases, β -glucosidase, and hemicellulase) (Cellic® CTec2, Novozymes A/S, Denmark) นับเวลาครบ 24 และ 48 h ฉีดผ่านหลอดฉีดยาหัวกรอง 0.45 μ m เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยการใช้ oxidase/peroxidase (GOPOD) assay (D-glucose assay kit, Megazyme, Ireland) วัดค่าการดูดกลืนแสง 510 nm เทียบปริมาณกลูโคสในไฮโดรไลเสทด้วยการสร้างสมการปรับเทียบกับกลูโคสที่ทราบปริมาณแน่นอน แปลงค่ากลูโคสที่เกิดขึ้นเป็นกลูแคนเทียบกับกลูแคนเริ่มต้น ดังสมการที่ (3.5)

$$\text{Enzymatic digestibility (\%)} = \frac{\text{Glucan digested (g)}}{\text{Glucan added (g)}} \times 100 \quad (3.5)$$

สามารถคำนวณผลผลิตในแต่ละสภาวะการปรับสภาพได้ดังต่อไปนี้

กำหนดให้ Solid recovery หรือ Solid remaining มีค่า R% ในสมการดังกล่าวต่อไปนี้ อ้างไปถึงวัสดุตั้งต้นด้วยว่ามาจาก 100 g NCR DM. กล่าวคือ

100 g NCR เมื่อทำการ MAP แล้วได้ PCR ซึ่งมี Solid recovery เป็น R g

ในที่นี้ จำนวน R มีหน่วยเป็น (g) แล้ว, มิใช่หน่วย %

เมื่อใช้มวล PCR จำนวนหนึ่งในการทำ EnH (g) จะได้กลูโคส (glucose in hydrolysate, g) หากใช้ PCR ทั้งหมดที่ได้จาก NCR 100 g (คือจำนวน R g) จะเขียนปริมาณเป็นกรัมของกลูโคสที่จะได้จาก NCR 100 g ผ่านการปรับสภาพในแต่ละสภาวะได้ดังสมการที่ (3.6)

$$24 \text{ or } 48 \text{ h hydrolysis glucose yield from } 100 \text{ g NCR} = \frac{R \text{ (g)} \times \text{Glucose in hydrolysate (g)}}{\text{Mass of PCR used for enzymatic hydrolysis (g)}} \times 100 \quad (3.6)$$

และเมื่อกำหนดค่าให้ Enzymatic digestibility มีค่า D%

กล่าวคือ 1000 g glucan ย่อยได้ D g glucan

เพราะฉะนั้น ในที่นี้ จำนวน D มีหน่วยเป็น (g) แล้ว, ไม่ใช่ว่ามีหน่วย %

0.1 g glucan ย่อยได้ D/1000 g glucan

และ 1 g glucan ไฮโดรไลซิสได้ 1.11 g glucose

ดังนั้น D/1000 g glucan ไฮโดรไลซิสได้ $0.0011 \times D$ g glucose ดังสมการที่ (3.7)

$$\text{Glucose in hydrolysate (g)} = 0.0011 \times D \text{ (g glucose)} \quad (3.7)$$

เหง้ามันสำปะหลังแห้งเริ่มต้นที่ยังไม่ปรับสภาพ (NCR) 100 ส่วน เมื่อทำการ MAP แล้ว (เป็น PCR) จะเหลือมวล R ส่วน (ดู R นี้ในตารางที่ 3.3 Solid recovery) และการ MAP ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพ ปริมาณเซลลูโลสใน PCR จะไม่เท่ากัน แต่การ EnH ตามระเบียบวิธี NREL ให้ซึ่งมวล PCR ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพมาให้มีเซลลูโลส เท่ากับ 0.1 g เพราะฉะนั้น PCR ที่มีองค์ประกอบเซลลูโลสมากจะใช้ปริมาณที่นำไปไฮโดรไลซิสน้อยกว่า และ PCR ที่มีองค์ประกอบเซลลูโลสน้อยจะใช้ปริมาณที่นำไปไฮโดรไลซิสมากกว่า (ดูตารางที่ 3.4) หลังจากนั้นทำการ EnH เป็นเวลา 24, 48 h จะได้กลูโคส อาจแสดงค่ากลูโคสเป็น %Digestibility (ดูตารางที่ 3.5) นำค่าผลผลิตกลูโคสที่ได้นี้ (หรือใช้ค่า %Digestibility แปลงกลับเป็นกลูโคส) โดยคำนวณว่า เมื่อใช้มวล PCR ดังตารางที่ 3.4 จะได้ผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 3.5, ฉะนั้นมวลคงเหลือทั้งหมดที่ได้จากการ MAP ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพ ดังตารางที่ 3.3 Solid recovery จะให้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์เป็นปริมาณเท่าใด ทั้งนี้ Solid recovery ก็มาจาก NCR 100 g DM.; เพราะด้วยเหตุเหล่านี้ทั้งสิ้น จะได้ผลผลิตกลูโคสที่ได้จาก NCR 100 g DM. เริ่มต้น ผ่านการ MAP ในแต่ละสภาวะ ดังตารางที่ 3.7 (Experimental) อันมาจากการเทียบบัญชีได้ตรงกลางมาทีละส่วน โดยอาจเขียนสมการที่ (3.6) และ (3.7) รวมรูปเป็นสมการที่ (3.8)

$$24 \text{ or } 48 \text{ h hydrolysis glucose yield from } 100 \text{ g NCR} = \frac{R \text{ (g)} \times 0.0011 \times D \text{ (g glucose)}}{\text{Mass of PCR used for enzymatic hydrolysis (g)}} \times 100 \quad (3.8)$$

จากนั้นนำผลผลิตเป็นกรัมของกลูโคสที่ได้จาก NCR เริ่มต้น 100 g ผ่านการ MAP ในแต่ละสภาวะจากการทดลองแล้วคำนวณผ่านสมการที่ (3.8) ประมวลผลด้วยโปรแกรมสถิติแล้วสร้างแบบจำลอง

ทางคณิตศาสตร์ ได้สมการพยากรณ์ผลผลิตเป็นกรัมของกลูโคสที่จะได้จาก NCR เริ่มต้น 100 g เมื่อผ่านการปรับสภาพแล้ว (PCR) และทำการ EnH เป็นเวลา 24 หรือ 48 h พร้อมกับวิเคราะห์ความแปรปรวน ค่าเปรียบเทียบจากการทดลองแบบพหุคูณ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน ดังตารางที่ 3.8-3.11 และเมื่อปรับปรุงแบบจำลองโดยนำพจน์ที่ไม่มีนัยสำคัญออกแล้วดังตารางที่ 3.12-3.15

อย่างไรก็ดี เทคนิคการวัดน้ำตาลกลูโคส GOPOD assay (Trinder, 1969; McCleary and Codd, 1991, Yuen and McNeil, 2000; Danielson et al., 2010) สำหรับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ อาจถูกตั้งข้อสังเกตว่าเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายที่ไม่สามารถยืนยันความแม่นยำ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเทคนิคนี้จะสามารถเชื่อถือได้มากน้อยอย่างไร การใช้เทคนิคทางเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกลูโคส glucose oxidase/peroxidase และ hexokinase ในที่นี้ใช้ glucose oxidase/peroxidase (GOPOD) หรือที่เรียกว่า Trinder method เพราะนำเสนอครั้งแรกโดย Trinder (1969) และนักวิจัยท่านอื่นพัฒนาตลอดมาเพื่อเพิ่มความแม่นยำในตรวจวัดปริมาณกลูโคส ทั้งในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และวิทยาศาสตร์อาหาร ฉะนั้นการใช้ GOPOD assay นี้ตั้งอยู่บนฐานความรู้ที่เป็นมาตรฐานและยอมรับกันในปัจจุบัน

3.4.5 การออกแบบการทดลอง

วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM, response surface methodology) ถูกใช้ในการหาสภาวะการปรับสภาพแห้งมันต่ำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างที่เหมาะสมที่สุดเพื่อยกระดับผลผลิตกลูโคส การออกแบบการทดลอง Box-Behnken design (BBD) 3 ปัจจัย 3 ระดับ ซึ่งปัจจัยทั้ง 3 ประกอบด้วย กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1), ระยะเวลาที่ฉายคลื่น (X_2), และความเข้มข้นของสารละลายต่าง NaOH (X_3) ค่าระดับต่ำ, กลาง และสูง ถูกแสดงด้วย -1, 0 และ 1 ผลผลิตกลูโคสจากการ EnH เป็นตัวแปรตาม (response variable) ตารางที่ 3.1 แสดงค่าของปัจจัยที่ใช้ทดลอง การทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง มีจุดกลาง (center point) 3 ซ้ำถูกสุ่มลำดับ แผ่นโค้งตอบสนองของพหุนามกำลังสองถูกสร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (X_i) และผลตอบสนองหรือตัวแปรตาม (Y) ดังแสดงในสมการที่ (3.9)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.9)$$

โดย Y คือผลพยากรณ์กลูโคส; X_1 , X_2 , และ X_3 คือตัวแปรอิสระ; β_0 คือพจน์คงที่; β_1 , β_2 , และ β_3 คือสัมประสิทธิ์เส้นตรง; β_{12} , β_{13} , และ β_{23} คือสัมประสิทธิ์อันตรกิริยา; และ β_{11} , β_{22} , and β_{33} คือสัมประสิทธิ์พหุนามกำลัง 2 ซอฟต์แวร์จะสร้างพื้นผิว 3 มิติซึ่งเป็นความสัมพันธ์ร่วมระหว่างตัวแปรอิสระและค่าที่ตอบสนอง

ตารางที่ 3.1 ระดับค่าตัวแปรอิสระที่ใช้ทดลอง

Factors	Symbols	Factor levels		
		-1	0	1
Microwave power (W)	X_1	300	600	900
Irradiation time (min)	X_2	5	10	15
NaOH concentration (% w/v)	X_3	3	5	7

3.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติและตรวจสอบแบบจำลอง

ประมวลผลข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วย Design Expert software (Version 7.0, Stat-Ease, Inc., USA) และ Minitab ในการสร้างแบบจำลองผิวโค้งพหุนามกำลังสอง, การวิเคราะห์ผลคูณการถดถอยเชิงเส้น (multiple linear regression analysis) ใช้ประเมินนัยสำคัญทางสถิติของแบบจำลอง, การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ทำเพื่อตรวจสอบนัยสำคัญของสัมประสิทธิ์เส้นตรง สัมประสิทธิ์อันตรกิริยา และสัมประสิทธิ์การถดถอยกำลังสอง (linear, interaction and quadratic regression coefficients), ค่าการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit, LOF) ใช้ในการประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองต่อการตอบสนองของข้อมูล, ความสมบูรณ์ของแบบจำลองจะพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2), นอกจากนี้ สมรรถภาพการพยากรณ์ของแบบจำลอง (predictive capacity) จะถูกประเมินด้วยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (adjusted R^2) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเชิงพยากรณ์ (predicted R^2), ประเมินผลการ MAP ด้วยการใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA), การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้ Tukey-HSD multiple comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ 5% ($p < 0.05$)

3.4.7 การศึกษาลักษณะทางกายภาพ-เคมี

3.4.7.1 โครงสร้างจุลภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM, Jeol JSM-6010LV, Jeol Ltd., Tokyo, Japan) ตรวจสอบรูปพื้นฐานของโครงสร้างผนังเซลล์ทั้ง NCR, ผนังเซลล์แห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการ MAP ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (pretreated cassava rhizome, OPCR) ซึ่งพบว่าสภาวะการปรับสภาพดังกล่าวมีค่า 840 W, 9 min, 3% NaOH; และโครงสร้างเซลล์แห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพอย่างรุนแรง (extreme pretreated cassava rhizome, EPCR) ที่ 900 W, 15 min, 5% NaOH

3.4.7.2 พื้นที่ผิวจำเพาะ, ปริมาตรช่องว่างทั้งหมดในโครงสร้าง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางช่องว่างในโครงสร้าง

เทคนิค BET (Brunauer, Emmett, และ Teller) ถูกใช้ในการอธิบายลักษณะพื้นที่ผิวจำเพาะ โดยวัดปริมาตรของก๊าซไนโตรเจนที่ถูกดูดซับบนผิววัสดุแล้วคำนวณ

$$\frac{1}{W[(P_0/P)-1]} = \frac{1}{W_m C} + \frac{(C-1)(P/P_0)}{W_m C} \quad (3.10)$$

เมื่อ

W = น้ำหนักที่ถูกดูดซับที่ความดัน P_0

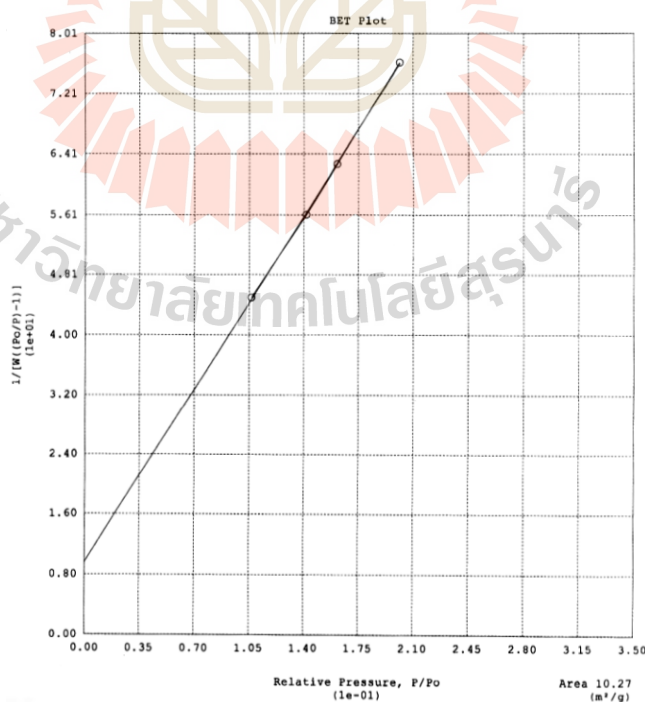
W_m = น้ำหนักที่ถูกดูดซับแบบชั้นเดียว

P = ความดันของก๊าซไนโตรเจนที่ใช้ขณะทดลอง หน่วยมิลลิเมตรปรอท

P_0 = ความดันอิ่มตัวของก๊าซไนโตรเจน

C = ค่าคงที่

การหาพื้นที่ผิวจากทฤษฎี BET เป็นการนำสมการที่ 1 มาใช้โดยตรง เมื่อสร้างกราฟระหว่าง $\frac{1}{W[(P_0/P)-1]}$ กับ P/P_0 ได้เป็นเส้นตรง



รูปที่ 3.1 กราฟ BET

แทน slope, s และ intercept, i ตามลำดับ จากกราฟ BET

$$s = \frac{C-1}{W_m C} \quad (3.11)$$

และ

$$i = \frac{1}{W_m C} \quad (3.12)$$

จาก slope และ intercept ในสมการที่ (3.11) และ (3.12) สามารถนำมาแก้สมการหาค่า W_m และ C ได้ดังนี้

$$W_m = \frac{1}{s+i} \quad (3.13)$$

$$C = \frac{s}{i} + 1 \quad (3.14)$$

และ

$$S_t = \frac{W_m N A_{cs}}{M} \quad (3.15)$$

S_t = พื้นที่ผิวของสารตัวอย่าง หน่วย m^2

A_{cs} = พื้นที่หน้าตัดของโมเลกุลของก๊าซในโตรเจนที่ถูกดูดซับ (16.2×10^{-20}) หน่วย m^2

M = น้ำหนักโมเลกุลของตัวถูกดูดซับ (ก๊าซในโตรเจน 28.0134 g/mol)

N = เลขอวกาโดร (6.02×10^{23}) หน่วย molecules/mol

พื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area, S) สามารถคำนวณได้จากพื้นที่ผิวทั้งหมด (S_t) ต่อน้ำหนักของสารตัวอย่าง ดังสมการที่ (3.16)

$$S = \frac{S_t}{W} \quad (3.16)$$

ปริมาตรรูพรุนรวม (total porosity volume) หาได้จากน้ำหนักของก๊าซที่ถูกดูดซับ ที่ความดันใกล้เคียงความดันไอ นั่นคือที่ $P/P_0 \approx 1$ เท่าที่สามารถทำการทดลองได้ ภายใต้สมมติฐานว่าวัสดุของแข็งไม่มีพื้นที่ผิวอื่นใดนอกจากพื้นที่ผิวของผนังภายในรูพรุน สามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ดังสมการที่ (3.17)

$$V_p = \frac{W_s}{\rho_i} \quad (3.17)$$

V_p = ปริมาตรของรูพรุน หน่วย cm^3/g

W_s = น้ำหนักของก๊าซที่ถูกดูดซับ หน่วย g/g solid

ρ_i = ความหนาแน่นของก๊าซในโตรเจนในสถานะของเหลว หน่วย g/cm^3

ขนาดรัศมีรูพรุนเฉลี่ย (pore radius volume) หาได้ด้วยสมมติฐานว่าช่องรูพรุนมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ขนาดรัศมีรูพรุนเฉลี่ยสามารถคำนวณได้จากปริมาตรรูพรุนและพื้นที่ผิวที่ได้จากวิธี BET

$$r_p = \frac{2V_p}{S} \quad (3.18)$$

การหาปริมาตรรูพรุนทั้งหมดและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของรูพรุนของ NCR, OPCR และ EPCR โดยใช้การวัดการดูดซับและการคายก๊าซในโตรเจน N_2 ด้วยเครื่องวิเคราะห์พื้นที่ผิวและรูพรุน Quantachrome instrument, Autosorb 1 MP, USA at -196°C . ก่อนทำการวัด ตัวอย่างแห้ง ปริมาณ 0.1-0.2 g ถูกย้ายเข้าสู่หลอดไล่ความชื้นและก๊าซเป็นเวลา 24 h พื้นที่ผิวจำเพาะ ปริมาตรรูพรุนทั้งหมด และขนาดรูพรุนเฉลี่ยถูกประเมินจากความสัมพันธ์ของกราฟการดูดซับและคายก๊าซในโตรเจน (Hsu et al., 2010)

3.4.7.3 การวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเป็นผลึกของเซลลูโลสทั้งก่อนและหลังการปรับสภาพ ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer โดย Max Von Laue อธิบายถึง X-ray diffraction ว่า ถ้าผลึกประกอบด้วยอะตอมที่เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบ เมื่ออยู่ใน 3 มิติ จะสามารถเลี้ยวเบนรังสีที่มีความยาวคลื่นสั้นๆ อย่าง X-ray ได้ (แมน อมรสิทธิ์ และคณะ, 2555) ความเป็นผลึกของเซลลูโลสในงานวิจัยนี้ NCR, OPCR และ EPCR ถูกตรวจสอบโดยใช้เครื่อง XRD Analyzer, D2-Phaser, Bruker, USA ดำเนินการที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 30 kV ค่ากระแส 10 mA ความเป็นผลึกของตัวอย่างถูกวิเคราะห์ด้วยการแผ่รังสีของ $\text{Cu-K}\alpha$ ความยาวคลื่น 0.154 nm พิสัยมุม (2θ) มีค่า $10-40^\circ$ อัตราการกวาดมุม $2^\circ/\text{min}$ ค่าดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index, CrI) คำนวณได้ดังสมการที่ (3.19)

$$\text{CrI} (\%) = \left(\frac{I_1 - I_2}{I_1} \right) \times 100 \quad (3.19)$$

เมื่อ I_1 คือความเข้มของการเลี้ยวเบนของรังสีในขณะกระทบความเป็นผลึกของเซลลูโลสที่มุม $2\theta = 22^\circ$ และ I_2 คือความเข้มของการเลี้ยวเบนในขณะที่ยังไม่กระทบวัสดุผลึก มุม $2\theta = 18^\circ$ (Kumar et al., 2009; Terinte et al., 2011).

3.4.7.4 การวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

สเปกตรัมการดูดซับรังสีอินฟราเรดของ NCR, OPCR และ EPCR ได้จากเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Tensor 27, Bruker, USA) ใช้ซอฟต์แวร์ OPUS 7.0 สเปกตรัมการดูดซับรังสีอินฟราเรดในทุกตัวอย่างถูกบันทึกในตั้งแต่ $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ที่ 64 scans, ความละเอียด 4 cm^{-1} ใช้การอ้างอิงเทียบกับอากาศ (Mahmoud, 2016)

3.4.7.5 การวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA)

Thermogravimetric analyzer เป็นวิธีการวิเคราะห์มวลของสารซึ่งเป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิในขณะที่สารได้รับความร้อนตามอุณหภูมิที่โปรแกรมไว้ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2555) ซึ่งเครื่อง TGA จะประกอบด้วยเครื่องซึ่งที่มีความละเอียดและความไวสูง เต็มเป่า ระบบจ่ายก๊าซ และส่วนควบคุมระบบ

การสลายตัวของ NCR, OPCR และ EPCR ถูกเปรียบเทียบกันโดยใช้เครื่อง TGA/DSC 1 Star System, Mettler Toledo, Switzerland ตามขั้นตอนของนักวิจัยหลายท่าน ในที่นี้ได้ดัดแปลงตาม Song et al. (2004) ตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 5 mg ถูกวางในถ้วยอลูมินา และให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 25°C ขึ้นไปถึง $1,000^\circ\text{C}$ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ในบรรยากาศไนโตรเจน $35\text{ cm}^3/\text{min}$ น้ำหนักที่ลดลงแสดงตัวเป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

3.5 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.5.1 องค์ประกอบทางเคมีของเหง้ามันสำปะหลัง

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของเหง้ามันสำปะหลังก่อนการปรับสภาพ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน เถ้า และส่วนละลายจากการสกัด (extractives) มีค่า 29.82%, 10.31%, 23.91%, 4.77% และ 19.20% ตามลำดับ, บ่งชี้ว่าเซลลูโลสและลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของ NCR สอดคล้องกับ Meesukanun and Satirapipathkul (2014) และ Martín et al. (2017) นอกจากนี้ยังพบรายงานองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีนและไขมัน (Alain et al., 2016) ทว่าอยู่นอกกรอบการวิจัยนี้

ตารางที่ 3.2 ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของ NCR DM.

Chemical composition	Content (%) ⁽¹⁾
Glucan	33.89±0.61
Hemicellulose	10.57±0.25
Lignin	23.91±0.40
Extractives	19.51±1.60
Ash	4.77±0.81

⁽¹⁾ ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.2 ผลของตัวแปรอิสระต่อปริมาณผลผลิตกลูโคส

ตารางที่ 3.3 ค่าร้อยละของปริมาณของแข็งคงเหลือ, ร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือ และร้อยละของปริมาณลิกนินที่สามารถขจัดได้ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพตามแผนการทดลอง BBD มีค่าตั้งแต่ 21.93-66.94%, 41.21-87.14%, และ 13.58-95.20%, ตามลำดับ สภาวะการทดลองที่ทวีความรุนแรงขึ้น (กำลังไมโครเวฟที่เพิ่มขึ้น, ระยะเวลาการฉายคลื่นที่เพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของสารละลายต่างดังกล่าวนี้ ได้ปรับปรุงความสามารถในการขจัดลิกนิน แต่ก็มีได้นำพوائญัก ที่สภาวะการปรับสภาพเหล่านี้สำหรับหลังจากที่รุนแรงขึ้นก็ได้ลดปริมาณกลูแคน โดยการลดปริมาณมวล PCR ลงไปด้วย



ตารางที่ 3.3 ร้อยละของปริมาณของแข็งคงเหลือ, ร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือ และร้อยละของปริมาณลิกนินที่สามารถขจัดได้เทียบกับ NCR DM.

Run	Microwave power (W)	Time (min)	NaOH conc. (%w/v)	Solid recovery (%) ⁽¹⁾	Lignin removal (%) ⁽²⁾	Glucan recovery (%) ⁽³⁾
1	600	10	5	55.00±0.90	48.19±1.47	79.28±7.31
2	900	15	5	21.93±0.02	95.20±0.49	41.21±1.56
3	600	10	5	55.17±1.23	45.46±1.37	81.99±6.40
4	300	5	5	66.94±0.64	13.58±1.99	87.14±2.42
5	600	5	3	64.92±0.36	26.18±1.78	82.54±9.91
6	600	5	7	63.11±1.99	28.19±1.13	82.85±4.08
7	600	10	5	53.37±0.62	44.18±0.30	75.89±4.15
8	300	15	5	60.35±1.96	31.40±1.09	83.19±4.64
9	300	10	3	66.69±0.89	21.03±1.32	87.01±7.42
10	600	15	7	47.44±0.21	65.70±0.52	72.43±5.37
11	900	5	5	56.00±1.14	40.78±0.96	82.56±3.76
12	900	10	3	44.41±0.04	67.98±0.43	68.62±5.25
13	900	10	7	32.97±0.06	71.16±0.60	60.99±2.05
14	600	15	3	51.23±1.44	62.74±1.23	75.73±5.50
15	300	10	7	65.80±0.39	23.01±0.94	86.56±5.95

^{(1), (2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.4 ร้อยละของปริมาณกลูแคนคงเหลือเทียบโดยมวลของแห้งน้ำมันในแต่ละสภาวะการปรับสภาพ และปริมาณแห้งน้ำมันที่ใช้ในการ EnH (เทียบเท่า 0.1 g เซลลูโลส)

Run	Microwave power (W)	Time (min)	NaOH conc. (%w/v)	Glucan recovery base on PCR (%) ⁽¹⁾	DM. of PCR used for Enz. hyd. (g) ⁽²⁾
1	600	10	5	49.3649±4.46	0.2026±0.0178
2	900	15	5	64.3683±2.44	0.1554±0.0059
3	600	10	5	50.8987±3.77	0.1965±0.0149
4	300	5	5	44.5806±3.45	0.2243±0.0179
5	600	5	3	43.5396±5.23	0.2297±0.0297
6	600	5	7	44.9595±2.21	0.2224±0.0109
7	600	10	5	48.6920±2.66	0.2054±0.0114
8	300	15	5	47.2109±2.63	0.2118±0.0122
9	300	10	3	44.6847±2.12	0.2238±0.0104
10	600	15	7	52.2837±3.88	0.1913±0.0149
11	900	5	5	50.4845±2.30	0.1981±0.0090
12	900	10	3	52.9108±4.05	0.1890±0.0147
13	900	10	7	63.3450±2.13	0.1579±0.0053
14	600	15	3	50.6276±3.67	0.1975±0.0139
15	300	10	7	45.0508±3.10	0.2220±0.0152

^{(1), (2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.5 ร้อยละของปริมาณกลูแคนที่ถูก EnH ที่เวลา 24 และ 48 h

Run	Microwave power (W)	Time (min)	NaOH conc. (%w/v)	Enzymatic digestibility at 24 h (%) ⁽¹⁾	Enzymatic digestibility at 48 h (%) ⁽¹⁾
1	600	10	5	47.8974±1.95	51.0498±1.58
2	900	15	5	84.1158±1.21	91.1735±1.96
3	600	10	5	47.4942±1.67	50.3008±2.23
4	300	5	5	34.6751±0.86	36.9798±2.05
5	600	5	3	44.6999±1.83	47.5724±1.14
6	600	5	7	45.0168±1.79	47.1979±2.45
7	600	10	5	50.0003±1.35	53.1362±1.14
8	300	15	5	39.4859±1.78	43.0251±1.19
9	300	10	3	39.1690±0.80	41.6341±2.04
10	600	15	7	52.5641±1.27	56.2926±2.33
11	900	5	5	46.0538±2.37	48.7494±2.20
12	900	10	3	60.6876±1.33	63.9429±2.62
13	900	10	7	64.2597±1.61	67.3133±3.73
14	600	15	3	51.4983±1.33	53.6712±1.62
15	300	10	7	39.5147±0.86	42.5436±2.31

^{(1),(2),(3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.6 ความดันและอุณหภูมิสูงสุดในหลอดปฏิกิริยาไมโครเวฟ (ค่าที่ปรากฏในวินาทีสุดท้ายของการฉายคลื่น)

Run	Microwave power (W)	Time (min)	NaOH conc. (%w/v)	Pressure (bar) ⁽¹⁾	Temperature (°C) ⁽²⁾
1	600	10	5	18.20±0.10	107.17±0.75
2	900	15	5	32.60±0.72	175.33±2.25
3	600	10	5	18.63±0.91	108.17±1.17
4	300	5	5	10.57±2.28	58.00±1.90
5	600	5	3	13.13±0.45	79.67±1.63
6	600	5	7	15.90±1.82	80.50±1.76
7	600	10	5	17.90±0.36	106.67±1.37
8	300	15	5	11.80±0.61	85.67±1.37
9	300	10	3	11.83±0.80	75.00±0.89
10	600	15	7	21.53±0.86	132.33±1.63
11	900	5	5	15.87±0.90	106.50±2.81
12	900	10	3	24.07±0.76	148.33±1.97
13	900	10	7	23.57±1.48	149.83±2.48
14	600	15	3	21.67±1.24	128.83±1.17
15	300	10	7	13.13±1.33	75.67±1.86

^{(1), (2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทดลอง run#2 (900 W, 15 min, 5% w/v) ยังผลให้ปริมาณของแข็งคงเหลือและปริมาณกลูแคนคงเหลือมีค่าต่ำที่สุด แต่สามารถขจัดลิกนินได้สูงสุด ขณะที่แห้งมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพใน run#4 (300 W, 5 min, 5% w/v) มีค่าปริมาณของแข็งคงเหลือและปริมาณกลูแคนคงเหลือมากที่สุด แต่มีความสามารถในการขจัดลิกนินต่ำที่สุด เหล่านี้บ่งชี้ว่ากำลังของคลื่นไมโครเวฟและระยะเวลาในการฉายคลื่นแสดงผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดปริมาณลิกนินและกลูแคน สอดคล้องกับรายงานของ Boonsombuti et al. (2013), Nomanbhay et al. (2013), Agu et al. (2017) และ Akhtar et al. (2017)

ในงานวิจัยนี้ ปริมาณของแข็งคงเหลือ PCR ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจะถูกดำเนินการต่อด้วยการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h การแปลงสภาพกลูแคน (glucan conversion) โดยการ EnH PCR (คำนวณโดยหารปริมาณกลูแคนที่สามารถย่อยได้ด้วยปริมาณกลูแคนเริ่มต้น, x100%) ค่า

ความสามารถในการแปลงกลูแคนเพิ่มเป็นสัดส่วนแบบเส้นตรงเมื่อสภาวะการปรับสภาพรุนแรงยิ่งขึ้น ตั้งแต่ 34.68-84.12% และ 36.98-91.17% สำหรับการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 ตามลำดับ การแปลงกลูแคนมีความสัมพันธ์ร่วมอย่างสูงกับระดับความสามารถในการขจัดลิกนินของแต่ละสภาวะการปรับสภาพ โดยมีค่า $R^2 = 0.8686$ และ 0.8716 สำหรับการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ, แสดงให้เห็นว่า เมื่อลดปริมาณลิกนินใน PCR ใด ๆ ให้ต่ำลง สภาวะการปรับสภาพนั้นๆ ก็จะเพิ่มความสามารถในการย่อยกลูแคนของเอนไซม์ให้ได้มากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับ Kim and Han (2012)

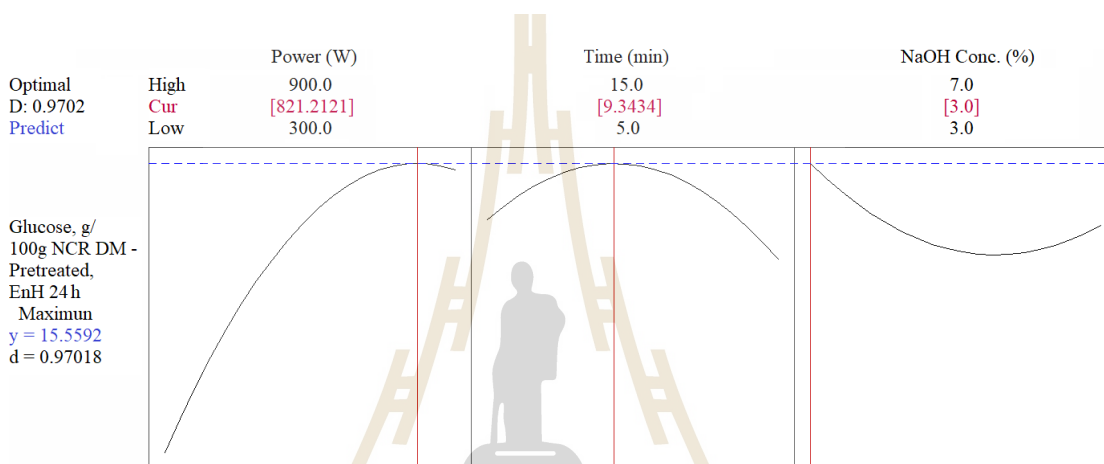
ตารางที่ 3.7 ผลผลิตกลูโคสที่ได้จาก EnH PCR (g/NCR 100 g DM.) ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพเมื่อผ่านการ Enz ที่เวลา 24 และ 48 h

Run	Microwave power (W)	Time (min)	NaOH conc. (%w/v)	24 h hydrolysis glucose yield ⁽¹⁾ (g/NCR 100 g DM.)	48 h hydrolysis glucose yield ⁽²⁾ (g/NCR 100 g DM.)
1	600	10	5	14.31±0.58	15.25±0.47
2	900	15	5	13.06±0.19	14.15±0.30
3	600	10	5	14.67±0.52	15.54±0.69
4	300	5	5	11.38±0.28	12.14±0.67
5	600	5	3	13.90±0.57	14.79±0.35
6	600	5	7	14.05±0.56	14.73±0.77
7	600	10	5	14.29±0.39	15.19±0.33
8	300	15	5	12.38±0.56	13.48±0.37
9	300	10	3	12.84±0.26	13.65±0.67
10	600	15	7	14.34±0.35	15.36±0.64
11	900	5	5	14.32±0.74	15.16±0.68
12	900	10	3	15.69±0.34	16.53±0.68
13	900	10	7	14.76±0.37	15.46±0.86
14	600	15	3	14.69±0.38	15.31±0.46
15	300	10	7	12.89±0.28	13.87±0.75

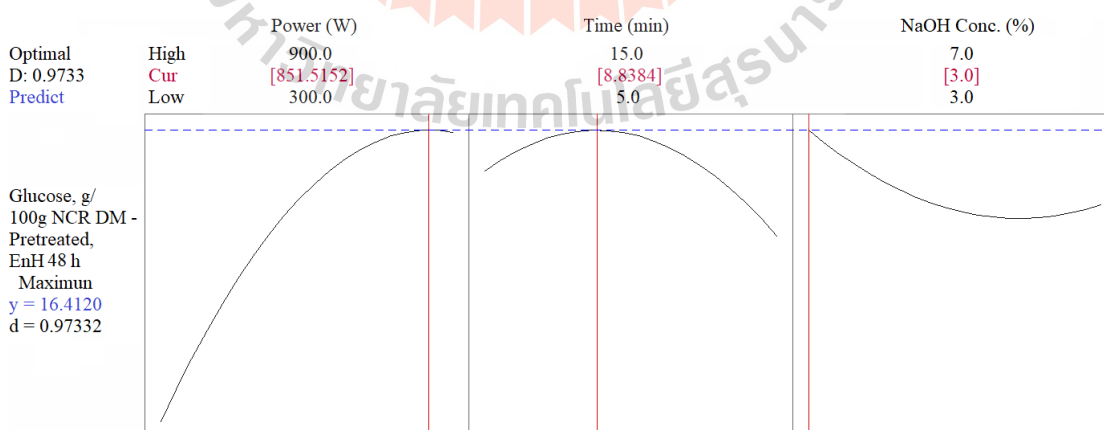
^{(1), (2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ทำการหาสถานะเหมาะสมที่สุดสำหรับการปรับสภาพฟางข้าว ได้รายงานหลักฐานสนับสนุนว่า ความสามารถในการขจัดลิกนินมีความสัมพันธ์ร่วมเชิงบวก (positively correlated) กับความสามารถในการย่อยได้ของเอนไซม์ ($R^2 = 0.8773$) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มุ่งเน้นถึงสถานะเหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพแห้งมันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างเพื่อยกระดับผลผลิตกลูโคส โดยเทียบกับปริมาณ NCR เริ่มต้น หาได้ต้องการเพียงสภาพการย่อยกลูแคนให้ได้มากที่สุด

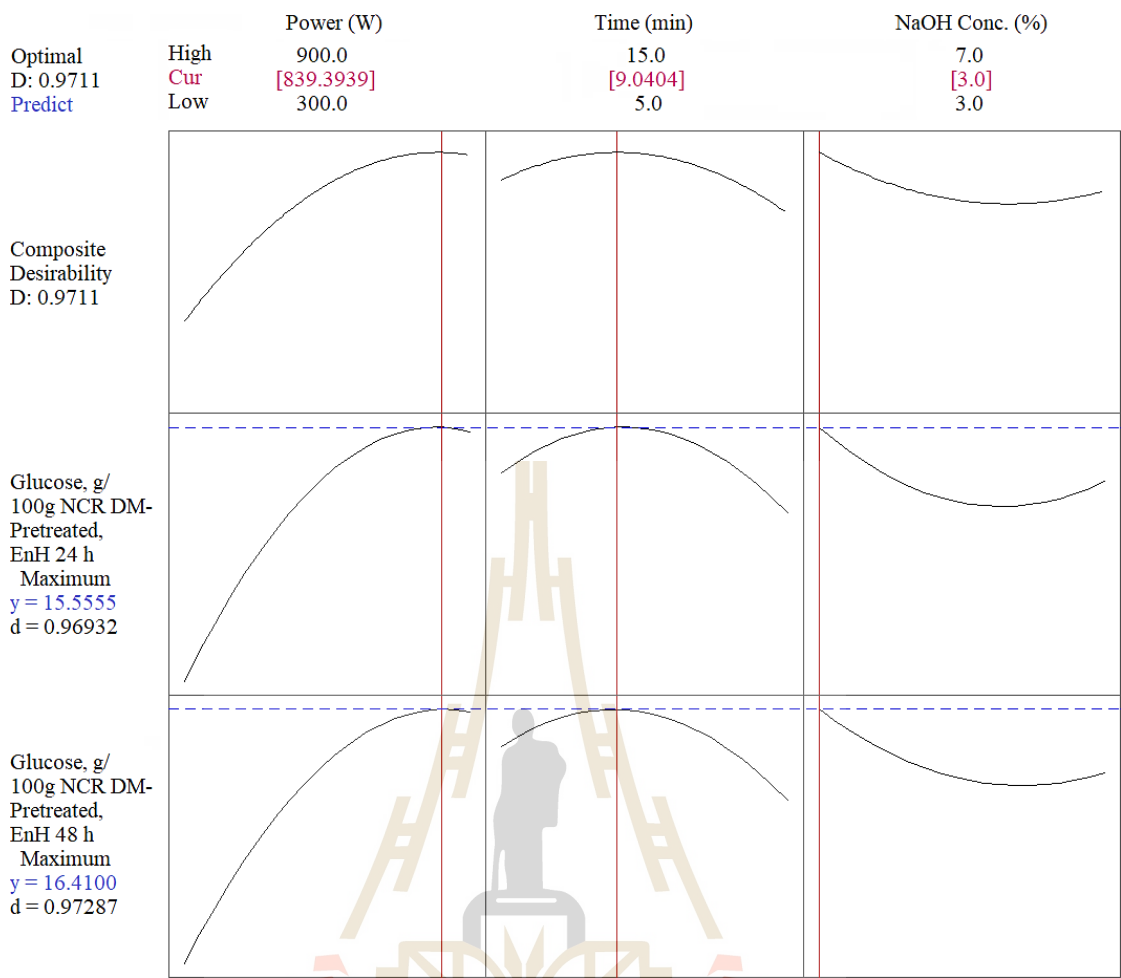
3.5.3 ค่าเหมาะสมที่สุดของสถานะการปรับสภาพแห้งมันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างและการตรวจสอบแบบจำลอง



รูปที่ 3.2 ภาพจากซอฟต์แวร์ Minitab แสดงค่าสภาวะการ MAP แล้วทำการ EnH PCR เป็นเวลา 24 h ที่จะให้ได้ผลผลิตกลูโคส (g/NCR 100 g DM.) สูงสุด จากสมการพยากรณ์เต็มรูปแบบ



รูปที่ 3.3 ภาพจากซอฟต์แวร์ Minitab แสดงค่าสภาวะการ MAP แล้วทำการ EnH PCR เป็นเวลา 48 h ที่จะให้ผลผลิตกลูโคส (g/NCR 100 g DM.) สูงสุด จากสมการพยากรณ์เต็มรูปแบบ



รูปที่ 3.4 ภาพจากซอฟต์แวร์ Minitab แสดงค่าสถานะการ MAP แล้วทำการ EnH PCR ให้ผลผลิตกลูโคส (g/ NCR 100 g DM.) เหมาะสมที่สุดเมื่อพิจารณาทั้ง 24 และ 48 h จากสมการพยากรณ์เต็มรูปแบบ

เมื่อนำข้อมูลลงในโปรแกรม Design Expert ซอฟต์แวร์ได้ทำการประมวลผล สร้างสมการพยากรณ์ปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ได้จาก NCR DM. ตั้งต้น 100 g ผ่านกระบวนการปรับสภาพเป็น PCR แล้วทำการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h โดยใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวน และค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนเมื่อเทียบกับค่าที่ทำการทดลอง ดังตารางที่ 3.8-3.11

ตารางที่ 3.8 แบบจำลองพหุนามกำลังสองเต็มรูปแบบ (ใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์) และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

Quadratic model equation ⁽¹⁾	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²	CV ⁽²⁾ (%)	Adequate precision
$Y_1 = 5.2008 + 0.0215X_1 + 0.8830X_2 - 1.0522X_3 - 0.00038X_1X_2 - 0.0004X_1X_3 - 0.0125X_2X_3 - 0.00001X_1^2 - 0.0287X_2^2 + 0.1353X_3^2$	0.9693	0.9141	0.5819	2.3573	16.48
$Y_2 = 5.7017 + 0.0217X_1 + 0.8266X_2 - 0.8431X_3 - 0.00039X_1X_2 - 0.00054X_1X_3 + 0.0027X_2X_3 - 0.00001X_1^2 - 0.0284X_2^2 + 0.1085X_3^2$	0.9808	0.9463	0.7514	1.70	21.47

⁽¹⁾ Y₁ และ Y₂ แสดงปริมาณผลผลิตกัญโคสจากการ EnH OPCR เป็นระยะเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ; X₁, X₂ และ X₃ แสดงกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

⁽²⁾ CV แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation)

ตารางที่ 3.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ได้จากการ EnH เป็นเวลา 24 h (แบบจำลองที่ 1) และ 48 h (แบบจำลองที่ 2) โดยใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Glucose yield (g)	Model	16.815	9	1.868	17.558	0.0028 significant
/100 g NCR DM.,	X_1	8.716	1	8.716	81.910	0.0003
Original model 1	X_2	0.083	1	0.083	0.778	0.4182
	X_3	0.145	1	0.145	1.362	0.2959
	X_1X_2	1.274	1	1.274	11.975	0.0180
	X_1X_3	0.235	1	0.235	2.213	0.1970
	X_2X_3	0.063	1	0.063	0.589	0.4776
	X_1^2	3.127	1	3.127	29.384	0.0029
	X_2^2	1.903	1	1.903	17.887	0.0083
	X_3^2	1.081	1	1.081	10.159	0.0243
	Residual	0.532	5	0.106		
	Lack of fit	0.440	3	0.147	3.204	0.2469 not significant
Glucose yield (g)	Model	16.016	9	1.780	28.407	0.0009 significant
/100 g NCR DM.,	X_1	8.335	1	8.335	133.052	< 0.0001
Original model 2	X_2	0.276	1	0.276	4.412	0.0897
	X_3	0.091	1	0.091	1.448	0.2827
	X_1X_2	1.384	1	1.384	22.095	0.0053
	X_1X_3	0.416	1	0.416	6.642	0.0496
	X_2X_3	0.003	1	0.003	0.048	0.8358
	X_1^2	2.860	1	2.860	45.657	0.0011
	X_2^2	1.860	1	1.860	29.691	0.0028
	X_3^2	0.696	1	0.696	11.104	0.0207
	Residual	0.313	5	0.063		
	Lack of Fit	0.244	3	0.081	2.349	0.3125 not significant

ตารางที่ 3.10 ค่าที่ได้จากการทดลอง-พยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อนเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์

Run	Factors ⁽¹⁾			24 h hydrolysis glucose yield			48 h hydrolysis glucose yield		
	X ₁	X ₂	X ₃	(g/100 g biomass)		Error	(g/100 g biomass)		Error
				Experimental ⁽²⁾	Predicted	(%)	Experimental ⁽³⁾	Predicted	(%)
1	600	10	5	14.31±0.58	14.42	0.82	15.25±0.47	15.32	0.51
2	900	15	5	13.06±0.19	13.37	2.30	14.15±0.30	14.35	1.39
3	600	10	5	14.67±0.52	14.42	1.71	15.54±0.69	15.32	1.39
4	300	5	5	11.38±0.28	11.07	2.78	12.14±0.67	11.94	1.67
5	600	5	3	13.90±0.57	14.15	1.80	14.79±0.35	15.00	1.37
6	600	5	7	14.05±0.56	14.13	0.60	14.73±0.77	14.73	0.01
7	600	10	5	14.29±0.39	14.42	0.90	15.19±0.33	15.32	0.88
8	300	15	5	12.38±0.56	12.41	0.26	13.48±0.37	13.49	0.03
9	300	10	3	12.84±0.26	12.89	0.41	13.65±0.67	13.64	0.04
10	600	15	7	14.34±0.35	14.09	1.81	15.36±0.64	15.16	1.35
11	900	5	5	14.32±0.74	14.29	0.22	15.16±0.68	15.16	0.03
12	900	10	3	15.69±0.34	15.46	1.44	16.53±0.68	16.33	1.23
13	900	10	7	14.76±0.37	14.71	0.36	15.46±0.86	15.47	0.04
14	600	15	3	14.69±0.38	14.61	0.58	15.31±0.46	15.31	0.01
15	300	10	7	12.89±0.28	13.11	1.70	13.87±0.75	14.07	1.43

⁽¹⁾ X₁, X₂ และ X₃ แสดงกำลังของคลื่น ไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

^{(2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.11 ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการที่ได้จากการไฮโดรไลซิส OPCR ด้วยเอนไซม์ จากการทดลอง-พยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน เมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ใช้ปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยทุกพจน์

Factors ⁽¹⁾			Original model ⁽²⁾	Glucose yield (g/100 g biomass)		Error (%)
X ₁	X ₂	X ₃		Experimental ⁽³⁾	Predicted	
839.39	9.04	3	1	15.82±0.22	15.56	1.72
			2	16.95±0.31	16.41	3.29

⁽¹⁾ X₁, X₂ และ X₃ แสดงกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

⁽²⁾ Models 1 และ 2 แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคสสูงสุดที่ได้จากการไฮโดรไลซิส OPCR ด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ

⁽³⁾ ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

แม้ค่าที่ได้จากตารางที่ 3.11 เป็นค่าที่พยากรณ์ได้ดี เพราะมีร้อยละของความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ แต่จากตารางที่ 3.8 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเชิงพยากรณ์ (predicted R²) ในแบบจำลองที่แสดงผลผลิตกลูโคสที่จะได้จาก NCR 100 g DM. ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพที่เวลา 24 และ 48 h มีค่า 0.5819 และ 0.7514 ตามลำดับ ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ สมควรทำการปรับปรุงโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออก (ดูตารางที่ 3.9) เมื่อนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัย X₁X₃ และ X₂X₃ ในสมการแบบจำลอง 24 h, และ X₂X₃ ในสมการแบบจำลอง 48 h ออก ค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยและอันตรกิริยาของปัจจัยในสมการที่ปรับปรุงใหม่ก็จะถูกสร้างขึ้นใหม่ด้วยตารางที่ 3.8-3.11 จะแปรค่าเป็นตารางที่ 3.12-3.15 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.12 แบบจำลองพหุนามกำลังสองที่ทำการปรับปรุงแล้วโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออก และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้

Quadratic model equation ⁽¹⁾	R ²	Adjusted R ²	Predicted R ²	CV ⁽²⁾ (%)	Adequate precision
$Y_1 = 7.040 + 0.020X_1 + 0.820X_2 - 1.420X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.00001X_1^2 - 0.029X_2^2 + 0.135X_3^2$	0.9521	0.9043	0.6856	2.49	16.49
$Y_2 = 5.565 + 0.022X_1 + 0.840X_2 - 0.816X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.0005X_1X_3 - 0.00001X_1^2 - 0.028X_2^2 + 0.109X_3^2$	0.9806	0.9548	0.8123	1.56	24.68

⁽¹⁾ Y₁ และ Y₂ แสดงปริมาณผลผลิตกัญโคสจากการ EnH OPCR เป็นระยะเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ; X₁, X₂ และ X₃ แสดงกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

⁽²⁾ CV แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation)

เมื่อปรับปรุงแบบจำลองโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออกพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเชิงพยากรณ์ (predicted R²) ในแบบจำลองที่แสดงผลผลิตกัญโคสที่จะได้จาก NCR 100 g DM. ที่ผ่านแต่ละสภาวะการปรับสภาพที่เวลา 24 และ 48 h ดังตารางที่ 3.8 และ 3.12 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.5819 เป็น 0.6856 และจาก 0.7514 เป็น 0.8123 ตามลำดับ เพราะฉะนั้นนับแต่นี้เป็นต้นไป แบบจำลองผลิตภัณฑ์จากการ EnH ที่จะให้ผลผลิตกัญโคส (g) เหมาะสมที่สุด (optimum) ทั้ง 24 และ 48 h จาก NCR 100 g DM. จะกล่าวถึงเฉพาะสมการพยากรณ์ที่ปรับปรุงแล้ว

ตารางที่ 3.13 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของแบบจำลอง Y₁ และ Y₂ ซึ่งพจน์อันตรกิริยา (interaction terms) ใดที่ไม่มีนัยสำคัญ (p>0.05) จะถูกนำออกจากสมการการพยากรณ์ อย่างไรก็ตาม พจน์เชิงเส้น (linear terms) X₂ และ X₃ แม้วามีได้มีนัยสำคัญ (p>0.05) แต่ก็ไม่ได้นำออกไปเพื่อให้พจน์ดังกล่าวยังคงสภาพลำดับชั้นของรูปแบบ (model hierarchy). ค่า F-values ของแบบจำลองที่ 1 และ 2 มีค่า 19.9 และ 37.98 p<0.05 ซึ่งให้เห็นว่าแบบจำลองทั้งสองมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ พจน์เชิงเส้น พจน์อันตรกิริยา และพจน์พหุนามกำลังสอง ได้แก่ X₁, X₁X₂, X₁², X₂² และ X₃² ในแบบจำลองที่ 1, และ X₁, X₁X₂, X₁X₃, X₁², X₂² และ X₃² ในแบบจำลองที่ 2 มีผลต่อปริมาณผลผลิตกัญโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p<0.05

ตารางที่ 3.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ได้จากการ EnH เป็นเวลา 24 h (แบบจำลองที่ 1) และ 48 h (แบบจำลองที่ 2) ที่ปรับปรุงโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออก

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	p-value
Glucose yield (g) / Model	16.52	7	2.36	19.90	0.0004 (significant)
100 g NCR DM., X_1	8.72	1	8.72	73.49	< 0.0001
Improved model 1 X_2	0.083	1	0.083	0.7	0.4311
X_3	0.14	1	0.14	1.22	0.3056
X_1X_2	1.27	1	1.27	10.74	0.0135
X_1^2	3.13	1	3.13	26.36	0.0013
X_2^2	1.90	1	1.90	16.05	0.0051
X_3^2	1.08	1	1.08	9.11	0.0194
Residual	0.83	7	0.12		
Lack of Fit	0.74	5	0.15	3.22	0.2535 (not significant)
Glucose yield (g) / Model	16.01	8	2.00	37.98	0.0001 (significant)
100 g NCR DM., X_1	8.34	1	8.34	158.15	< 0.0001
Improved model 2 X_2	0.28	1	0.28	5.24	0.0619
X_3	0.091	1	0.091	1.72	0.2375
X_1X_2	1.38	1	1.38	26.26	0.0022
X_1X_3	0.42	1	0.42	7.90	0.0308
X_1^2	2.86	1	2.86	54.27	0.0003
X_2^2	1.86	1	1.86	35.29	0.0010
X_3^2	0.70	1	0.70	13.20	0.0109
Residual	0.32	6	0.053		
Lack of Fit	0.25	4	0.062	1.78	0.3900 (not significant)

เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1) มีนัยสำคัญมากที่สุดในการยกระดับปริมาณผลผลิตกลูโคสจากเหง้ามันสำปะหลัง โดยให้ค่า F-values ที่สูง (73.49 และ 158.15 สำหรับแบบจำลองที่ 1 และ 2) และค่า p-value ที่ต่ำมาก (<0.0001 and <0.0001) สอดคล้องกับ Kamalini et al. (2018) ที่รายงานว่าค่า p-values สำหรับการทดสอบ lack of fit (LOF) มีค่ามากกว่า 0.05 (0.2535 ในแบบจำลองที่ 1) และ (0.3900 ในแบบจำลองที่ 2) บ่งชี้ว่าแบบจำลองทั้งสองมีความเหมาะสมกับค่าที่ได้จากการทดลองอย่างน่าพอใจ นอกจากนี้ Ruangmee and Sangwichien (2013) รายงานว่าการทดสอบ LOF ต้องไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เพื่อให้แบบจำลองมีความเหมาะสมกับค่าที่ได้จากการทดลองเพียงพอ

ตารางที่ 3.14 แสดงการเปรียบเทียบผลผลิตกลูโคส/NCR 100 g ในแต่ละสภาวะการปรับสภาพที่เวลา 24 และ 48 h จากการทดลอง และค่าจากแบบจำลองที่ออกแบบสภาวะการทดลองด้วย BBD ผลผลิตกลูโคสต่ำที่สุดและสูงที่สุดที่เวลาการ EnH 24 และ 48 h มีค่า 11.38 และ 15.69 g/100 g NCR DM., และ 12.14 และ 16.53 g/100 g NCR DM. ตามลำดับ (run#4 และ #12) หรือกล่าวคือ ปริมาณกลูโคสต่ำสุดที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับกำลังไมโครเวฟต่ำสุดที่ใช้ (300 W), ระยะเวลาการฉายคลื่นที่สั้น (5 min), และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ในระดับกลาง (5% w/v), ขณะที่ปริมาณผลผลิตกลูโคสเทียบกับ NCR เริ่มต้น ที่มากที่สุดได้มาจากการใช้สภาวะปรับสภาพที่คลื่นไมโครเวฟระดับสูง (900 W), ระยะเวลาปานกลางในการฉายคลื่น (10 min), และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ระดับต่ำ (3% w/v) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มกำลังของคลื่น ไมโครเวฟ (ตัวแปรอิสระหรือตัวแปรต้น X_1) เป็นอิทธิพลหลักต่อการได้มาซึ่งผลผลิตกลูโคสอันเป็นตัวแปรตาม (Y_1, Y_2) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ระดับกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1) ที่สูงและระดับความเข้มข้นของสารละลายต่าง (X_3) ที่ต่ำ มีผลต่อการขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส อันสนับสนุนการเข้า EnH สอดคล้องกับ Singh et al. (2014) และ Kamalini et al. (2018).

ตารางที่ 3.12 แสดงแบบจำลองพหุนามที่เหมาะสมกับการอธิบายความสัมพันธ์ร่วม ระหว่างตัวแปรอิสระ (X_1, X_2, X_3) และตัวแปรตามคือปริมาณผลผลิตกลูโคส (Y_1) ในแบบจำลอง Y_1 เมื่อทำการ EnH เป็นเวลา 24 h ค่า R^2 (0.9521) และ adjusted R^2 (0.9043) มีนัยสำคัญทางสถิติ ทว่าความแตกต่างระหว่าง adjusted (0.9043) และ predicted R^2 (0.6856) ก่อนข้างต่างกันเกินกว่า 0.20 (0.2187), ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้ควรจะต่ำกว่า 0.20 (Vázquez et al., 2009), หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าแบบจำลองนี้มีสมรรถภาพการพยากรณ์ของแบบจำลองปานกลาง ขณะที่แบบจำลอง Y_2 มีค่า R^2 (0.9806), adjusted R^2 (0.9548) และ predicted R^2 (0.8123) สูง บ่งชี้ว่าแบบจำลองนี้มีสมรรถภาพการพยากรณ์สูง โดยค่า Y_1 และ Y_2 เป็นปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h

ตารางที่ 3.14 ค่าที่ได้จากการทดลอง การพยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อนเมื่อคำนวณด้วยแบบจำลองที่ปรับปรุงโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออก

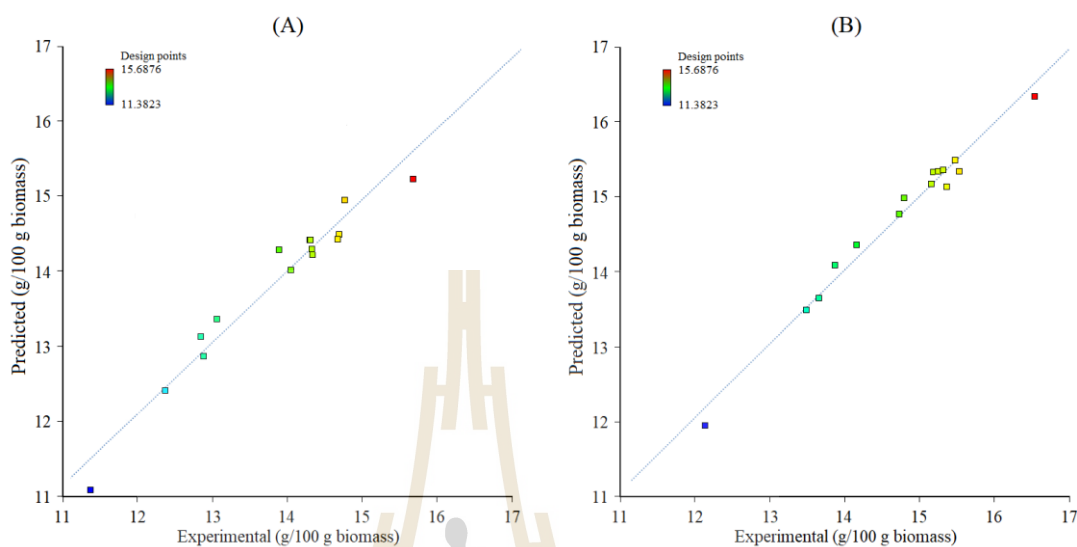
Run	Factors ⁽¹⁾			24 h hydrolysis glucose yield (g/100 g biomass)			48 h hydrolysis glucose yield (g/100 g biomass)		
	X ₁	X ₂	X ₃	Experimental ⁽²⁾	Predicted	Error (%)	Experimental ⁽³⁾	Predicted	Error (%)
1	600	10	5	14.31±0.58	14.42	0.82	15.25±0.47	15.32	0.51
2	900	15	5	13.06±0.19	13.37	2.30	14.15±0.30	14.35	1.39
3	600	10	5	14.67±0.52	14.42	1.71	15.54±0.69	15.32	1.39
4	300	5	5	11.38±0.28	11.07	2.78	12.14±0.67	11.94	1.67
5	600	5	3	13.90±0.57	14.28	2.66	14.79±0.35	14.97	1.19
6	600	5	7	14.05±0.56	14.01	0.29	14.73±0.77	14.76	0.17
7	600	10	5	14.29±0.39	14.42	0.90	15.19±0.33	15.32	0.88
8	300	15	5	12.38±0.56	12.41	0.26	13.48±0.37	13.49	0.03
9	300	10	3	12.84±0.26	13.13	2.25	13.65±0.67	13.64	0.04
10	600	15	7	14.34±0.35	14.21	0.91	15.36±0.64	15.13	1.53
11	900	5	5	14.32±0.74	14.29	0.22	15.16±0.68	15.16	0.03
12	900	10	3	15.69±0.34	15.22	3.06	16.53±0.68	16.33	1.23
13	900	10	7	14.76±0.37	14.95	1.27	15.46±0.86	15.47	0.04
14	600	15	3	14.69±0.38	14.48	1.45	15.31±0.46	15.34	0.19
15	300	10	7	12.89±0.28	12.87	0.15	13.87±0.75	14.07	1.43

⁽¹⁾ X₁, X₂ และ X₃ แสดงกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

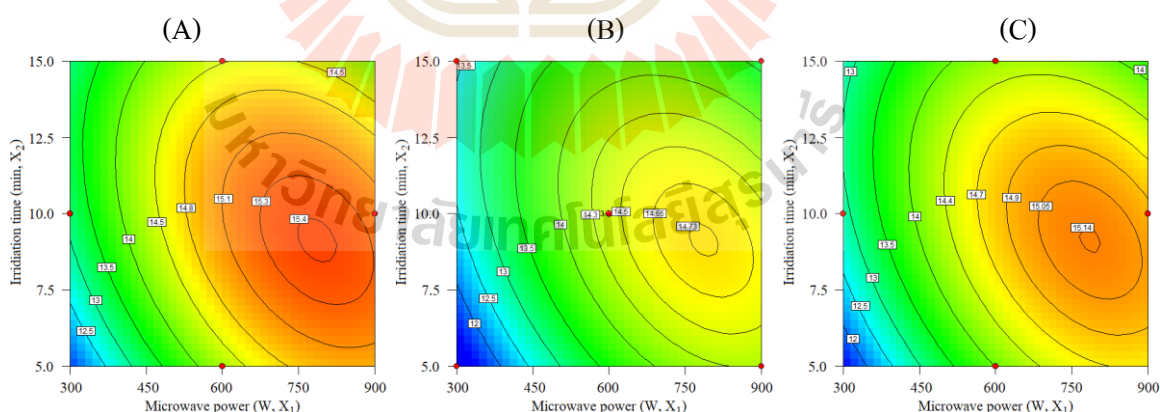
^{(2), (3)} ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ที่ต่ำ และค่าความเพียงพอต่อความแม่นยำ (adequate precision) ของปริมาณผลผลิตกลูโคสในแบบจำลองทั้ง Y₁ และ Y₂ ซึ่งให้เห็นว่าแบบจำลองพหุนามกำลังสองดังกล่าว มีความสามารถใช้งาน (reproducibility) และสมรรถภาพการพยากรณ์ (predictive capacity) ที่ดี ตามรายงานของ Bazargan et al. (2015) อธิบายว่า ค่า CV ที่ต่ำ แสดงว่าแบบจำลองมี reproducibility ที่ดี และ adequate precision ที่มากกว่า 4 เป็นที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ค่าพยากรณ์ปริมาณผลผลิตกลูโคสและค่าที่ได้จากการทดลองเมื่อ EnH เป็นเวลา 24

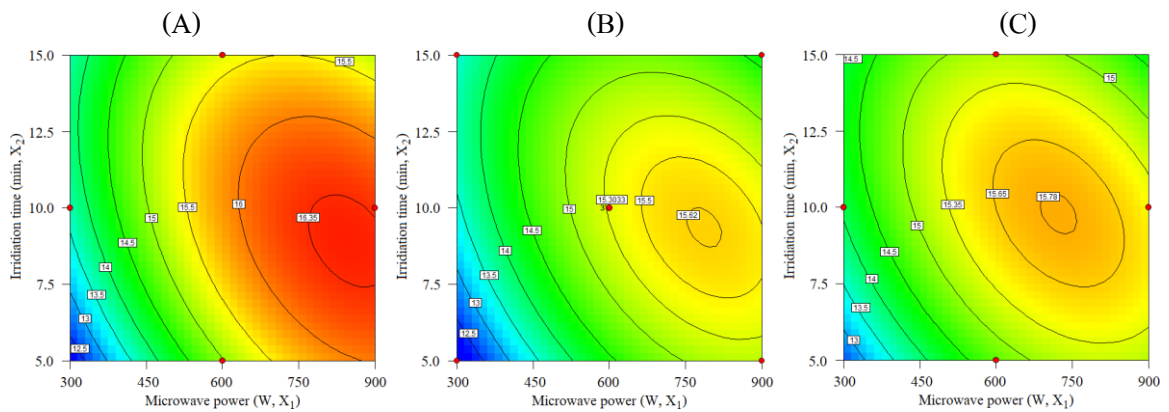
และ 48 h ดังรูปที่ 3.5 (A) และ 3.5 (B) ตามลำดับ มีความเข้ากันได้ดี ยืนยันว่าแบบจำลองมีความเพียงพอสำหรับการพยากรณ์



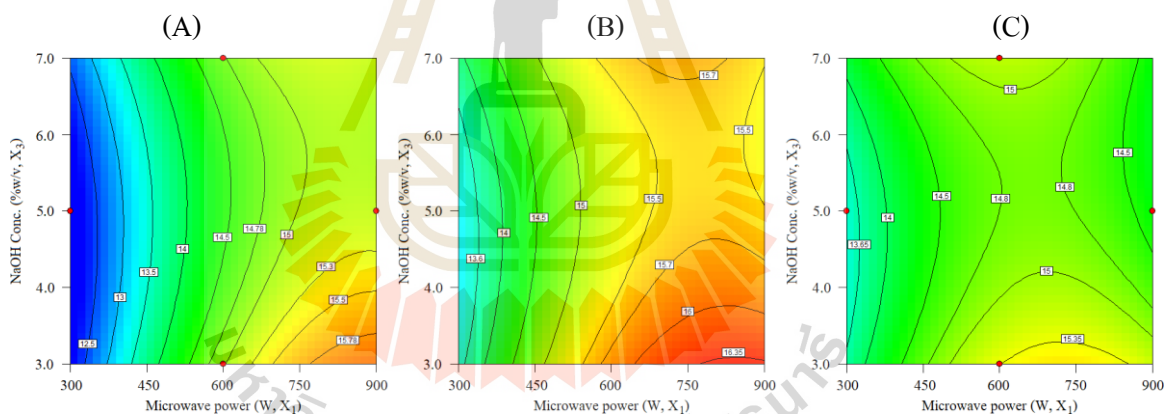
รูปที่ 3.5 กราฟเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตกลูโคส หน่วยเป็น g/100 g NCR DM., ที่ได้จากการทดลองและค่าพยากรณ์จากแบบจำลอง เมื่อทำการ EnH OPCR เป็นเวลา 24 และ 48 h ดังแสดงในรูป (A) และ (B) ตามลำดับ



รูปที่ 3.6 ภาพเส้นระดับเท่า (contour) จากซอฟต์แวร์ Design Expert แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคส g/100 g NCR DM. เมื่อ EnH 24 h แกน x แสดงระดับพลังงานคลื่นไมโครเวฟ แกน y แสดงระยะเวลาฉายคลื่น โดยภาพย่อย (A)-(C) แสดงผลผลิตที่เปลี่ยนไปเมื่อใช้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายต่างที่ 3, 5 และ 7 %w/v ตามลำดับ

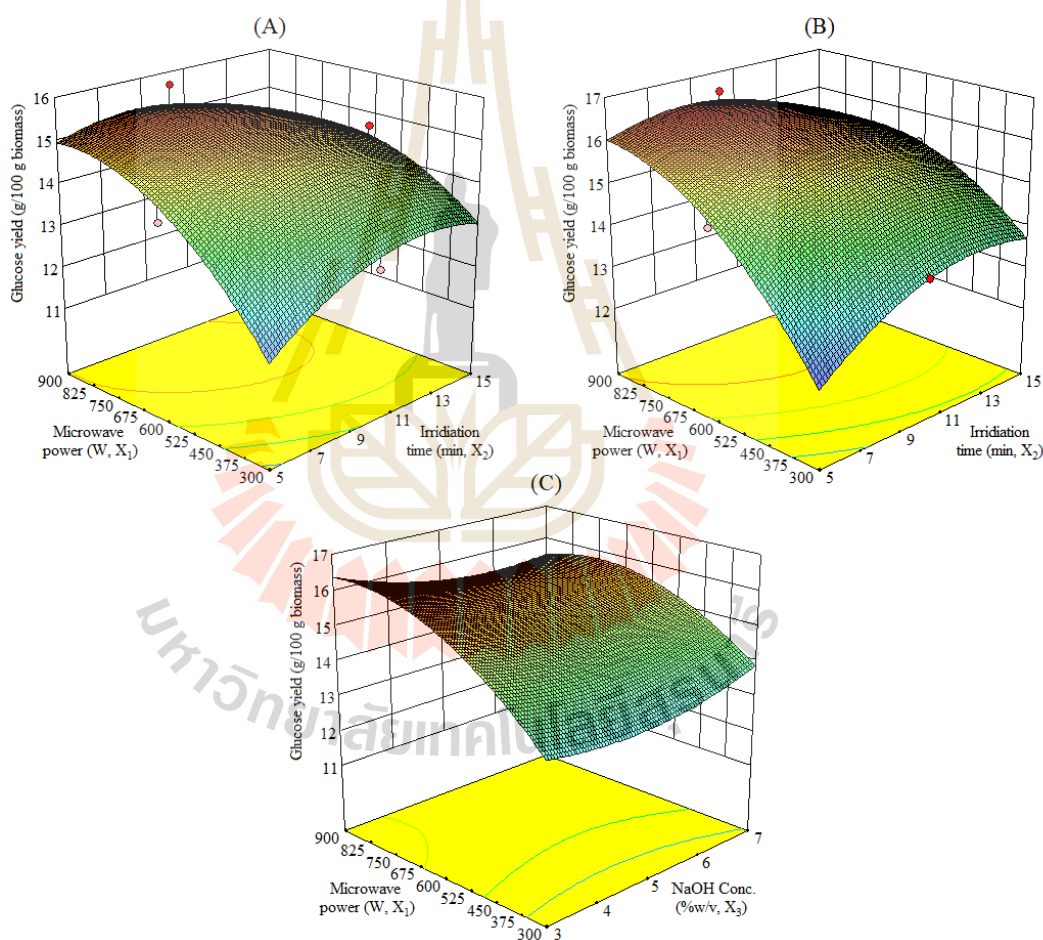


รูปที่ 3.7 ภาพเส้นระดับเท่า (contour) จากซอฟต์แวร์ Design Expert แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคส g/100 g NCR DM. เมื่อ EnH 48 h แกน x แสดงระดับพลังงานคลื่นไมโครเวฟ แกน y แสดงระยะเวลาฉายคลื่น โดยภาพย่อย (A)-(C) แสดงผลผลิตที่เปลี่ยนไปเมื่อใช้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายต่างที่ 3, 5 และ 7 %w/v ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 ภาพเส้นระดับเท่า (contour) จากซอฟต์แวร์ Design Expert แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคส /100 g NCR DM. เมื่อ EnH 48 h แกน x แสดงระดับพลังงานคลื่นไมโครเวฟ แกน y แสดงสภาวะการใช้สารละลายต่าง โดยภาพย่อย (A)-(C) จะแสดงผลผลิตที่เปลี่ยนไปเมื่อใช้เวลาการฉายคลื่น 5 (-1 BBD), 9.02 (optimum) และ 15 (+1 BBD) min ตามลำดับ

พื้นผิวตอบสนองในรูปที่ 3.6 และ 3.9 (A); และ 3.7, 3.8 และ 3.9 (B-C) แสดงพื้นผิวตอบสนองของพจน์อันตรกิริยาที่มีนัยสำคัญต่อปริมาณผลผลิตกลูโคส $\text{g}/100 \text{ g}$ NCR DM. ที่ทำการ EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ บ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ร่วมระหว่างสองตัวแปร เมื่อตัวแปรหนึ่งคงที่ที่ระดับเหมาะสมที่สุด ปริมาณผลผลิตกลูโคสสูงสุดได้จากช่วงกำลังคลื่นไมโครเวฟ 800-900 W ที่เวลาการฉายคลื่น 9 min กำลังไมโครเวฟในระดับสูงจะเพิ่มปริมาณผลผลิตกลูโคส ขณะที่ระยะเวลาการฉายคลื่นที่ยาวนานขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กำลังของคลื่นไมโครเวฟระดับสูง มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดปริมาณผลผลิตกลูโคส แม้ว่าจะทำให้ความสามารถในการถูกย่อยของมวล PCR เพิ่มมากขึ้น แต่ความรุนแรงของสภาวะการปรับสภาพดังกล่าวก็จะส่งผลโดยลดปริมาณ



รูปที่ 3.9 พื้นผิวตอบสนอง 3 มิติ จากซอฟต์แวร์ Design Expert แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคสจากอันตรกิริยาระหว่างปัจจัย ดังนี้ (A) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1) และระยะเวลาการฉายคลื่น (X_2) เมื่อ EnH เป็นเวลา 24 h, (B) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1) และระยะเวลาการฉายคลื่น (X_2) เมื่อ EnH เป็นเวลา 48 h, และ (C) กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1) และความเข้มข้นของสารละลายด่าง (X_3) เมื่อ EnH เป็นเวลา 48 h

กลูแคนเหลือ เนื่องจากไปทำลายมวล PCR จากรูปที่ 3.9 (C) ความเข้มข้นของ NaOH ที่ระดับต่ำและกำลังไมโครเวฟระดับสูง ได้ยกระดับปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ EnH เป็นเวลา 48 h ขณะที่ความเข้มข้นของ NaOH ระดับสูงได้ทำลายมวล PCR เช่นกัน แต่ไม่สามารถยกระดับปริมาณผลผลิตกลูโคส ซึ่งความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ในระดับปานกลาง-สูง (5-7%) ดังกล่าวนี้นี้ ได้เร่งให้เกิดการสลายกลูแคนใน PCR สอดคล้องกับรายงานของ Kamalini et al. (2018)

การหาค่าเหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้มาซึ่งปริมาณผลผลิตกลูโคสที่สูงที่สุดหลังจาก EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h, พบว่ากำลังของคลื่นไมโครเวฟที่ใช้ในการปรับสภาพ (X_1) มีค่า 839.39 W ระยะเวลาการฉายคลื่น (X_2) 9.02 min และความเข้มข้นของสารละลายต่าง NaOH (X_3) 3% w/v ในตารางที่ 3.15 ค่าพยากรณ์เมื่อนำพจน์ที่ไม่มีนัยสำคัญออกแล้ว แสดงค่าปริมาณผลผลิตกลูโคสที่สูงที่สุด เท่ากับ 15.39 และ 16.40 g/100 g NCR DM. หลังจาก EnH เป็นเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง คือ 15.82 ± 0.22 และ 16.95 ± 0.31 g/100 NCR DM ค่าจากการพยากรณ์และค่าที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกันดี ร้อยละของความคลาดเคลื่อน (%error) น้อยกว่า 10, บ่งชี้ว่าแบบจำลองทั้งสอง (Y_1 และ Y_2) มีความเหมาะสมต่อการให้ค่าเหมาะสมที่สุดสำหรับปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างในสภาพการทดลองระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 3.15 ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการที่ได้จากการ EnH OPCR จากการทดลองและการพยากรณ์ และร้อยละของความคลาดเคลื่อน เมื่อกำหนดด้วยแบบจำลองที่ปรับปรุงโดยนำพจน์อันตรกิริยาของปัจจัยการ MAP ที่ไม่มีนัยสำคัญออก

Factors ⁽¹⁾			Improved model ⁽²⁾	Glucose yield (g/100 g NCR DM.)		Error (%)
X_1	X_2	X_3		Experimental ⁽³⁾	Predicted	
839.39	9.04	3	1	15.82 ± 0.22	15.39	2.84
			2	16.95 ± 0.31	16.40	3.32

⁽¹⁾ X_1 , X_2 และ X_3 แสดงกำลังของคลื่นไมโครเวฟ (W) ระยะเวลาการฉายคลื่น (min) และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (% w/v) ตามลำดับ

⁽²⁾ Models 1 และ 2 แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคสสูงสุดที่ได้จาก EnH OPCR เป็นเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ

⁽³⁾ ปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

แม้ว่าแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้วทำการพยากรณ์ปริมาณกลูโคสที่ได้จากการที่ได้จาก EnH OPCR ได้ร้อยละความคลาดเคลื่อนสูงกว่าแบบจำลองที่ยังไม่ได้ปรับปรุง (%error ในตารางที่ 3.15 มีค่าสูงกว่าตารางที่ 3.11) แต่ค่าที่ได้จากแบบจำลองที่ยังไม่ได้ปรับปรุงและค่าที่ได้จากแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้ว (ตารางที่ 3.8 และ 3.12) ก็ยังให้ค่าใกล้เคียงกับค่าจากการทดลอง, และแบบจำลองที่ปรับปรุงแล้วสามารถลดร้อยละของความคลาดเคลื่อนในแต่ละสภาวะการปรับสภาพได้ดีกว่าแบบจำลองที่ยังไม่ได้ปรับปรุง (%error ในตารางที่ 3.14 มีค่าต่ำกว่าตารางที่ 3.10)

ตารางที่ 3.16 ค่าคุณสมบัติแห้งมันสำปะหลัง OPCR และสภาวะความดัน-อุณหภูมิในหลอดปฏิกรณ์ไมโครเวฟ

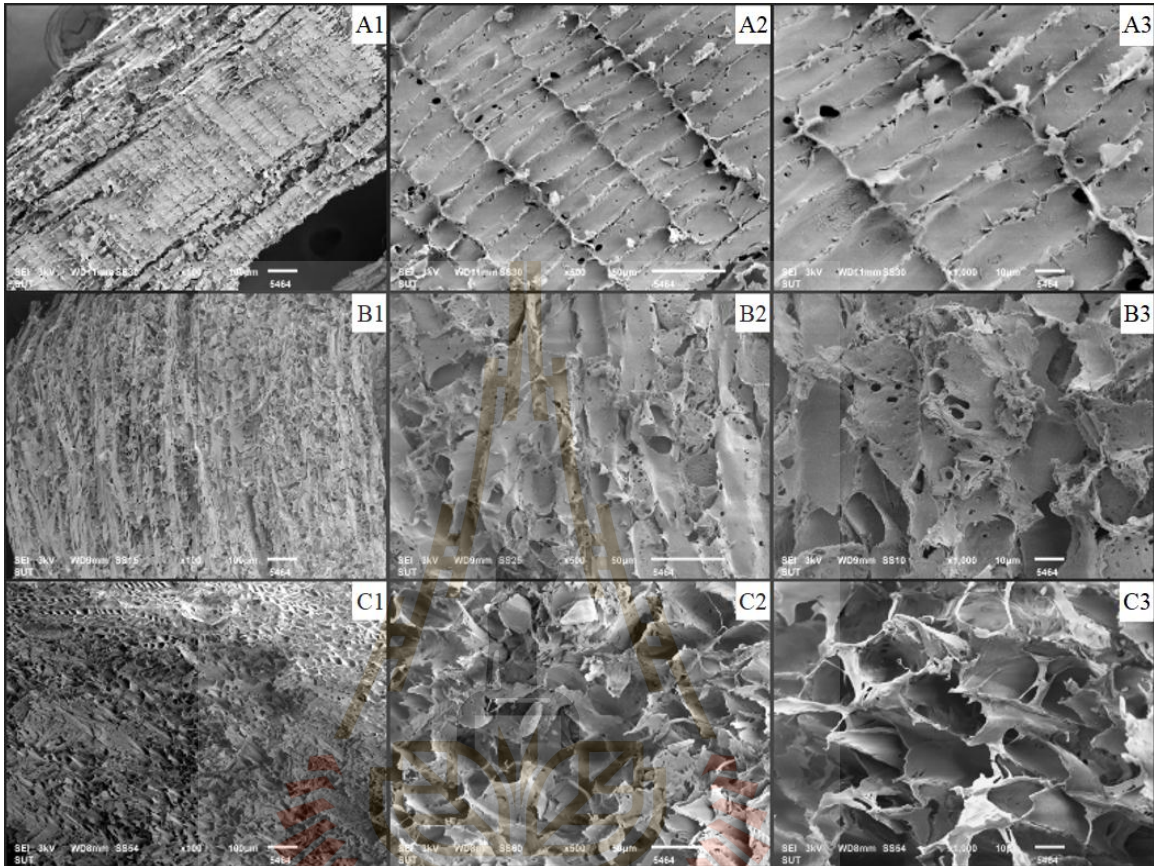
Practices	Values
Solid residue	45.9261±1.07 %
Glucan remaining (base on DM NCR)	68.1914±2.26 %
Lignin removal	56.326±0.78 %
Glucan remaining (base on PCR)	50.8492±1.68 %
DM. of PCR used for Enz. hyd.	0.1967±0.0066 g
Enzymatic digestibility at 24 h	61.6092±0.87 %
Enzymatic digestibility at 48 h	65.9974±1.2 %
24 h hydrolysis glucose yield	15.8232±0.22 g/ 100 g NCR DM.
48 h hydrolysis glucose yield	16.9502±0.31 g/ 100 g NCR DM.
Pressure in reactor vessels	20.8±0.2 bar
Temperature in reactor vessels	133.17±1.33 °C

3.5.4 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ-เคมี

3.5.4.1 การวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การวิเคราะห์ภาพถ่ายโครงสร้างจุลภาคของ NCR, เหง้ามันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (840 W 9 min 3%NaOH–optimum pretreated cassava rhizome, OPCR), และเหง้ามันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะรุนแรง (900 W 15 min 5% NaOH-extreme pretreated cassava rhizome, EPCR) ได้มาจากการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รูปที่ 3.10 (A1)-(A3) เป็นภาพถ่ายที่กำลังขยาย 100x, 500x, and 1000x ตามลำดับ ภาพถ่ายโครงสร้างจุลภาคของ NCR ได้แสดงลักษณะอย่างสมบูรณ์ของพื้นผิวโครงสร้างโดยธรรมชาติ รูปที่ 3.10 (B1)-

(B3) ของ OPCR และรูปที่ 3.10 (C1)-(C3) ของ EPCR แสดงโครงสร้างที่มีความหนาแน่นลดลงด้วยว่ามีความพรุนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม EPCR มีสภาพพรุนยิ่งกว่า OPCR เป็นอย่างมาก



รูปที่ 3.10 ภาพถ่ายส่องกราดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน: A, B, และ C เป็นภาพของ NCR, OPCR, EPCR ตามลำดับ ตัวเลข 1, 2, และ 3 หลังอักษรภาษาอังกฤษแสดงกำลังขยาย 100x, 500x, และ 1000x เท่า ตามลำดับ

ระดับกำลังไมโครเวฟที่สูง (เช่นในสภาวะการปรับสภาพ EPCR) เหนียวทำให้เกิดการทำลายโครงสร้าง ด้วยก่อให้เกิดโพรงและรอยแตกบนผิว ในขณะที่ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสถูกขจัดออกจากมวลแห้งมันสำปะหลัง OPCR และ EPCR สามารถจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสได้ 56.33 และ 51.23% และ 95.20 และ 94.65%, ตามลำดับ ปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่ลดลง ได้ยกระดับการเข้าทำการของเอนไซม์และปริมาณผลผลิตกลูโคส สอดคล้องกับ Ji et al. (2014), ได้รายงานผลการลดลงของลิกนินต่อการพัฒนารอยแตกจากการปรับสภาพด้วยสารละลายต่างซึ่งส่งผลต่อการย่อยเส้นใยเซลลูโลส ด้วยว่ารอยแตกหรือรูพรุนที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้ทำให้เพิ่มบริเวณจับสับสเตรท (binding sites)

ของเอนไซม์ นอกจากนี้ Zhu et al. (2016) ได้รายงานว่าการปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่างได้ขจัดลิกนินระหว่างช่วงพักของเส้นใยเซลลูโลส ผลคือ ทำให้เกิดช่องว่างและรูพรุนบนพื้นผิว สนับสนุนและยกระดับการเข้าทำงานของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงรูปสัณฐานและการขจัดลิกนินเหมือนที่ได้รายงานการปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง (McIntosh and Vancov, 2011; Ji et al., 2014), คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่าง (Agu et al., 2017), และคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายกรดและสารลดแรงตึงผิว (Akhtar et al., 2017)

3.5.4.2 ผลการวิเคราะห์พื้นที่ผิวและรูพรุน

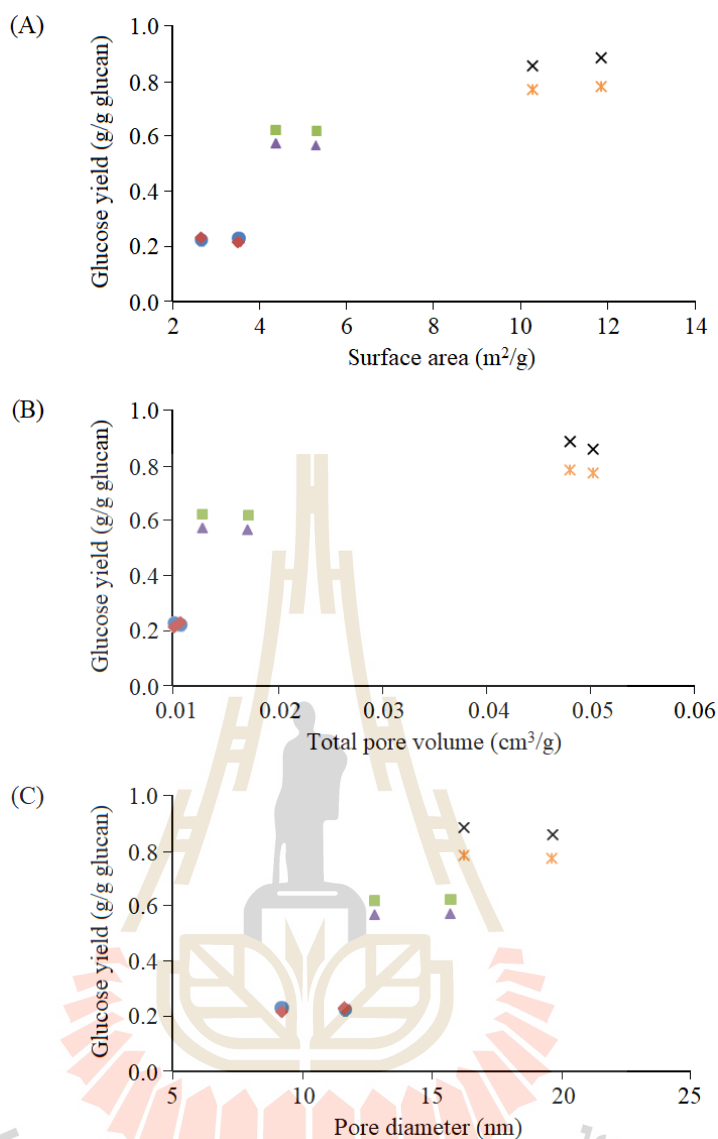
รูปที่ 3.11 (A)-(C) ตามลำดับ ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิว, ปริมาตรรูพรุนรวม, และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของ NCR, OPCR, และ EPCR กับปริมาณผลผลิตกลูโคส เป็นฟังก์ชันของการปรับสภาพแห้งน้ำมันสำปะหลังด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายด่าง และระยะเวลา EnH พบว่าพื้นที่ผิว, ปริมาตรรูพรุนรวม และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของ NCR, OPCR, และ EPCR มีค่าตั้งแต่ 3.716-11.065 m²/g, 0.0108-0.0142 cm³/g, และ 12.391-17.929 nm, ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ ปริมาตรรูพรุนรวม และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน

Treatments	Specific surface (m ² /g)	Total pore volume (cc/g)	Ave pore diameter (nm)
NCR	3.716±1.168 ^a	0.0108±0.001 ^a	12.391±3.634 ^a
OPCR	4.301±1.047 ^a	0.0142±0.002 ^a	13.439±2.040 ^a
EPCR	11.065±1.124 ^b	0.0493±0.002 ^b	17.929±2.411 ^a

ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างระหว่างสภาวะการปรับสภาพ ($p < 0.05$) และค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อสภาวะการปรับสภาพทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น (เช่นกำลังของคลื่นไมโครเวฟที่สูงขึ้น ระยะเวลาฉายคลื่นที่ยาวนาน และความเข้มข้นของ NaOH ที่สูงขึ้น) ได้เพิ่มพื้นที่ผิว, ปริมาตรรูพรุนรวม, และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน ด้วยว่าลิกนินและเฮมิเซลลูโลสถูกชะละลายและขจัดออกไป (Zhu et al., 2006; Chen et al., 2011; Boonsombuti et al., 2013) การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุนรวม และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนได้ร่วมยกระดับการเข้าทำงานของเอนไซม์ นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของปริมาณผลผลิตกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 3.8 (A)-(C) สอดคล้องกับงานของ Chen et al. (2011) และ Boonsombuti et al. (2013)

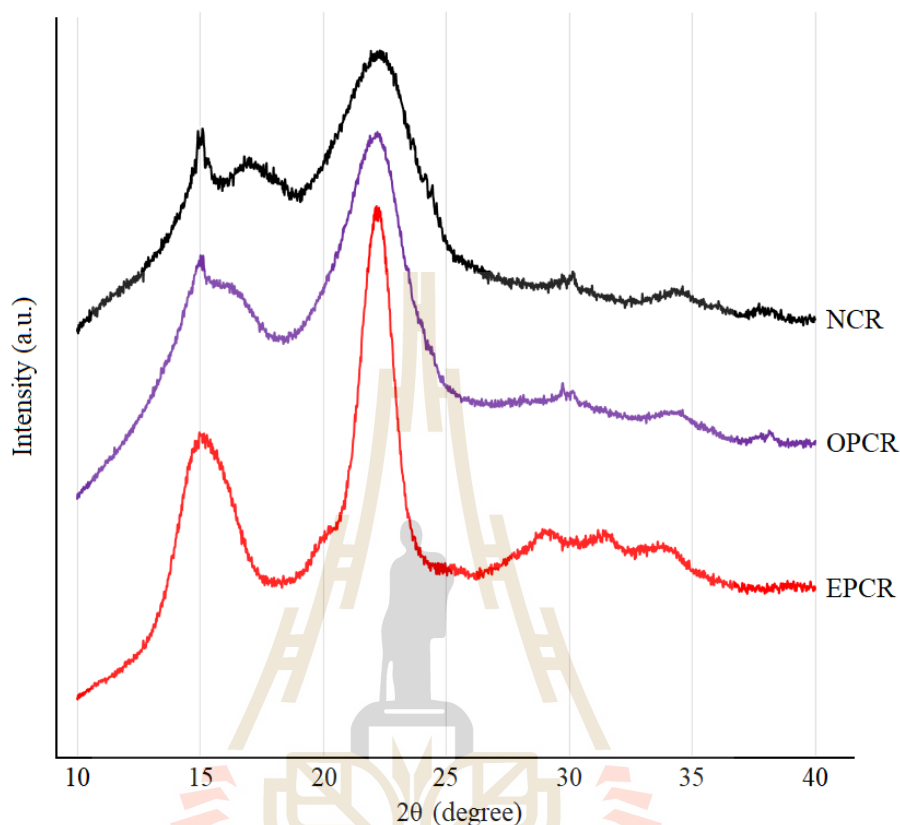


รูปที่ 3.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (A) พื้นที่ผิว (B) ปริมาตรรูพรุนทั้งหมด (C) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน; กับปริมาณผลผลิตกลูโคสที่ได้จาก EnH: NCR (◆,●); OPCR (▲,■) และ EPCR (×,×) เป็นเวลา 24 และ 48 h

3.5.4.3 ผลการวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

ความเป็นผลึกของเซลลูโลสได้แสดงบทบาทสำคัญต่อการ EnH เซลลูโลส (Boonsombuti et al., 2013) ในงานวิจัยนี้ ความเป็นผลึกของเซลลูโลสของเหง้ามันสำปะหลัง ถูกตรวจสอบด้วยการวัดการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ในมุมกระโทบผลึก รูปที่ 3.12 และตารางที่ 3.18 แสดงแบบแผนของ XRD และดัชนีความเป็นผลึก (CrI) ของ NCR, OPCR, และ EPCR ค่าดัชนีความเป็นผลึกของ OPCR (42.72%) และ EPCR (68.10%) มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ CrI

ของ NCR (30.39%) หรืออาจกล่าวได้ว่า ความเป็นผลึกของเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นตามสภาวะการปรับสภาพที่ทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น



รูปที่ 3.12 X-ray diffractograms ของเห้้ำมันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ; ตำแหน่งอัสฐานและผลึกอยู่ที่ $2\theta = 18^\circ$ และ 22° ตามลำดับ

คลื่นไมโครเวฟส่งผลต่อการสลายพันธะของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทั้งยังเพิ่มการแตกออกของช่วงความเป็นผลึกของเส้นใยเซลลูโลส สารละลายต่าง NaOH ได้ร่วมเพิ่มแนวแตกของพันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลที่เชื่อมระหว่างลิกนินกับองค์ประกอบอื่นเช่นเฮมิเซลลูโลส (Maryana et al., 2014) เช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของ CrI ของต้นมันสำปะหลังที่ถูก MAP ก็ได้ถูกรายงานด้วย (ตารางที่ 3.18) นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ CrI ในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสอื่นๆ ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว (Velmurugan and Muthukumar, 2011; Wanitwattanarumlug et al., 2012; Boonsombuti et al., 2013; Singh et al., 2014, Maaloul et al., 2016) หรือแม้กระทั่งการผุสลายตัวตามธรรมชาติของไม้สน (outdoor weathering tests) (Lionetto et al., 2012) การที่ CrI มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการสลายตัวหรือผ่านกรรมวิธีแล้ว เกิดจากส่วนอัสฐานของลิกโนเซลลูโลสถูกละลายออกไปจากเนื้อมวล PCR ดังนั้นปริมาณผลึกสัมพัทธ์หรือปริมาณผลึกที่ถูกเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ จึงมีค่า

เพิ่มขึ้น สามารถอนุมานได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ CrI ได้เพิ่มความสามารถในการเข้าไฮโดรไลซิสของ เอนไซม์

ตารางที่ 3.18 ค่าดัชนีความเป็นผลึก (CrI) ในรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องและงานวิจัยนี้

Biomass	CrI (%)		References
	Native	Pretreated	
Cassava stem	35.4	56.8 ⁽¹⁾	Martín et al. (2017)
Cassava stem	39.56	47.15 ⁽²⁾	Kamalini et al. (2018)
Cassava rhizome	30.39±1.46 ^a	42.72±0.84 ^{b(3)}	Present study
		68.10±0.59 ^{c(4)}	

⁽¹⁾ แสดงค่า CrI ของต้นมันสำปะหลังเมื่อผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน

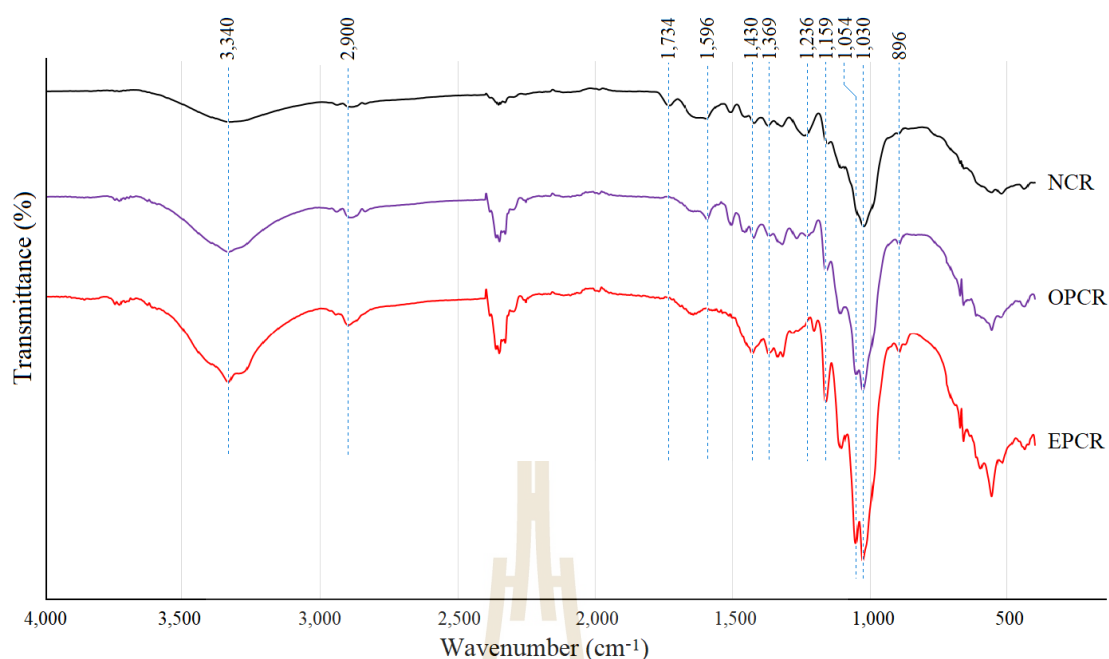
⁽²⁾ แสดงค่า CrI ของต้นมันสำปะหลังเมื่อผ่านการ MAP

^{(3),(4)} แสดงค่า CrI ของเหง้ามันสำปะหลัง OPCR และ EPCR ตามลำดับ

ตัวอักษรยก a, b, c ที่ปรากฏบนค่าในแถว Cassava rhizome แสดงถึงความแตกต่างระหว่างสภาวะการปรับสภาพ ($p < 0.05$) และปริมาณดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.4.4 ผลการวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

รูปที่ 3.13 ได้บรรยายสเปกตรัม FTIR ของ NCR, OPCR และ EPCR, และ ตารางที่ 3.19 แสดงการระบุถึงแถบการดูดซับ ความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดได้ถูกสังเกตที่พีคการดูดซับ (absorption peaks) 1734 cm^{-1} และ 1236 cm^{-1} , ซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนของโมเลกุลแบบยืดหดตามแนวแกนของพันธะ (stretching vibration) ของ C=O และ C-O, ตามลำดับ พบในลิกนินและไซแลน (Chen et al., 2011; Nomanbhay et al., 2013; Xu et al., 2014) พีคการดูดซับที่ 1734 cm^{-1} และ 1236 cm^{-1} ปรากฏใน NCR ค่อย ๆ ลดลงและหายไปเกือบสมบูรณ์เมื่อเหง้ามันสำปะหลังถูกปรับสภาพอย่างรุนแรง การลดลงของความเข้มของสัญญาณตามขนาดของการ MAP เนื่องจาก MAP ได้จัดบางส่วนของลิกนินและเฮมิเซลลูโลส สอดคล้องกับ Chen et al. (2011) และ Xu et al. (2014)



รูปที่ 3.13 สเปกตรัม FTIR ที่ความยาวคลื่น 4,000-400 cm^{-1} ของเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ; NCR, OPCR, และ EPCR หมายถึงเหง้ามันสำปะหลังดั้งเดิมก่อนการปรับสภาพ, เหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะเหมาะสมที่สุด (840 W, 9 min, 3% NaOH), และเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะรุนแรง (900 W, 15 min, 5% NaOH) ตามลำดับ

โดยกลับกัน, พิกัดการดูดซับที่ 1430 cm^{-1} และ 1369 cm^{-1} , อธิบายถึงการสั่นของโมเลกุลแบบงอ (bending vibration หรือ deformation vibration) ของ C-H_2 และ C-H ในเซลลูโลส จะมีความเข้มของสัญญาณที่มากขึ้นใน PCR มากกว่า NCR ก็โดยความถี่ขึ้นของระดับการ MAP นอกจากนี้ พิกัดการดูดซับที่ 1159 cm^{-1} และ 1030 cm^{-1} สัมพันธ์กับคุณสมบัติทางโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส มีสัญญาณการดูดซับที่แรงขึ้น และพิกัดการดูดซับที่แหลมคมตามระดับการ MAP เทียบกับ NCR นอกจากนี้ใน PCR ที่มีขนาดการ MAP มากขึ้น จะยกระดับสัญญาณพิกัดที่ตำแหน่ง 896 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับการสั่นสะเทือนของโมเลกุลแบบยึดหดตามแนวแกนของพันธะ C-O-C ที่พันธะเบตา-ไกลโคซิดิก (β -glycosidic) และการสั่นของโมเลกุลแบบงอ C-H ในเซลลูโลส บ่งชี้ว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลลูโลสใน PCR (Chen et al., 2011; Guilherme et al., 2015; Momayez et al., 2017) โดยที่แท้, MAP ได้เพิ่มสัดส่วนของเซลลูโลสในมวล PCR เนื่องจากบางส่วนของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสถูกขจัดออกไป และยังกล่าวได้ว่า, ผลของ FTIR มีความสัมพันธ์ร่วมเชิงบวกกับการขจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส

ตารางที่ 3.19 ตำแหน่งการสั่นสะเทือน FTIR ระหว่างพันธะภายในโมเลกุล

Wavenumber (cm ⁻¹)	Compound	References ⁽¹⁾
3700-3100	hydrophilic tendency, which was related to the –OH groups	[1]
3490-3175	O-H stretching in intramolecular hydrogen bonds	[2]
~3340	H-bonded OH stretching	[3], [4], [5]
~2900	C-H stretching in methyl and methylene groups	[6], [7], [8]
~1734	C=O stretching vibration in acetyl groups of lignin and hemicelluloses	[1], [3], [4], [5], [6], [9], [10]
~1596	C=C stretching vibration in aromatic ring of lignin	[2], [4], [5], [6], [7], [10]
~1430	C-H ₂ bending in cellulose	[2], [9], [11], [12]
~1369	Symmetric C-H bending in cellulose	[6]
~1236	C-O stretching vibration in lignin, xylan and ester groups	[5], [6], [10]
~1159	C-O-C vibration at β -glycosidic linkages in cellulose and hemicelluloses	[4], [12], [13]
~1054	C–O–C pyranose ring stretching vibration	[2]
~1030	C-O stretching vibration in cellulose and hemicelluloses	[4], [6], [8]
~896	C-O-C stretching at β -glycosidic linkage, C-H deformation vibration in cellulose	[1], [6], [9], [11], [12], [14]

⁽¹⁾ [1] Cui et al. (2012); [2] Kumar et al. (2014); [3] Chen et al. (2011); [4] Nomanbhay et al. (2013); [5] Poddar et al. (2016); [6] Xu et al. (2014); [7] Guilherme et al. (2015); [8] Onyianta et al. (2018); [9] Dong et al. (2015); [10] Maaloul et al. (2016); [11] Chieng et al. (2017); [12] Momayez et al. (2017); [13] Zhu et al. (2015); [14] Soni et al. (2015)

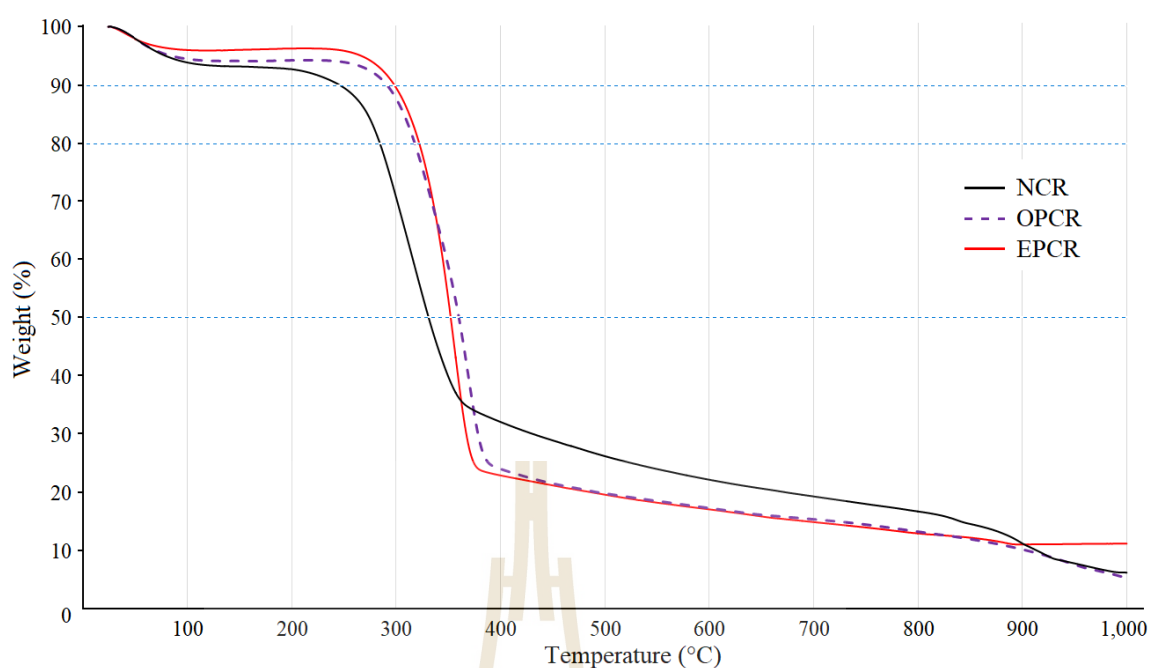
3.5.4.5 ผลการวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA)

วิธีการ TGA ถูกใช้ในการศึกษาพฤติกรรมการสลายมวลของ NCR และ PCR เมื่อได้รับความร้อน รูปที่ 3.14 แสดงกราฟความสัมพันธ์ทางความร้อน (TGA thermograms) ของ NCR OPCR และ EPCR ซึ่งอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสลายมวลจะเพิ่มมากขึ้นหลังจากการปรับสภาพแล้ว มวล PCR ที่ได้รับขนาดความรุนแรงของ MAP มากขึ้นจะต้องใช้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสลายตัวสูงขึ้นคล้ายกับงานของ Chen et al. (2011) และ Boonsombuti et al. (2013)

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วงแรกของการลดลงของมวล (105°C) เป็นลักษณะของการกำจัดน้ำอิสระ (unbound, free water) และน้ำที่เกาะด้วยพันธะเคมี (bound water) ออกจากมวล (Yang et al., 2006) ตามมาด้วยการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส $200-320^{\circ}\text{C}$ และเริ่มต้นการสลายตัวของลิกนินซึ่งมีช่วงอุณหภูมิการสลายตัวที่กว้าง $200-550^{\circ}\text{C}$ ขณะที่อุณหภูมิการสลายตัวของเซลลูโลสมีช่วงแคบ ๆ ราว $300-400^{\circ}\text{C}$ (Song et al., 2004; Yi-min et al., 2009) ทว่า Saldarriaga et al. (2012) ให้ความเห็นต่างออกไปว่าการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส และลิกนินเกิดในช่วง $225-325^{\circ}\text{C}$, $305-375^{\circ}\text{C}$ และ $250-500^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามก็ดี ตามรายงานของ Yi-min et al. (2009), องค์ประกอบทั้งสามของชีวมวลสลายตัวโดยลำดับ กล่าวคือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มจากต่ำไปสูง จะเกิดการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเซลลูโลส

พิจารณารูปที่ 3.14 ระยะของเวลาที่ให้ความร้อนทำให้ได้มาซึ่งการลดลงของน้ำหนัก 10% แรกของตัวอย่าง NCR, OPCR และ EPCR ขณะที่ระยะเวลาที่ให้ได้มาซึ่งการลดลงของน้ำหนัก 10% ต่อมา (น้ำหนักลดลง 20%) สั้นลง และเวลาการลดลงของน้ำหนัก 10% ต่อๆ มา เมื่อลดลงถึง 50% ก็ใช้เวลาสั้นลงอีก ดังปรากฏใน TGA thermograms ในการลดลงของน้ำหนักปรากฏเส้นชันอย่างมากในช่วงอุณหภูมิ $300-380^{\circ}\text{C}$ อันเป็นการสลายตัวขององค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสอย่างมาก เพราะเป็นอุณหภูมิที่ทำให้องค์ประกอบส่วนใหญ่ใน PCR

ในตารางที่ 3.20 การลดลงของน้ำหนัก 10, 20 และ 50% ของ NCR ปรากฏในช่วงอุณหภูมิระหว่าง $247.86-330.74^{\circ}\text{C}$, นำพิจารณาว่า เป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าการสลายตัวของ OPCR ($291.88-360.36^{\circ}\text{C}$) และ EPCR ($298.37-352.35^{\circ}\text{C}$), แสดงให้เห็นถึงความเสถียรทางความร้อนที่สูงกว่าของ OPCR และ EPCR เมื่อเทียบกับ NCR ความร้อนที่ใช้สำหรับอุณหภูมิการสลายตัวที่สูงกว่าของ OPCR และ EPCR แสดงให้เห็นว่าบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินถูกขจัดออกไปแล้วภายหลังจากการ MAP โดยปรากฏลักษณะการสลายตัวทางความร้อนของเซลลูโลสที่ชัดเจนยิ่งขึ้นเพราะมีส่วนในเนื้อมวลสูงกว่า NCR ผลดังกล่าวนี้คล้ายกับรายงานที่พบในการทำ TGA วัสดุลิกโนเซลลูโลสทางการเกษตรอื่นๆ (Wanitwattanarumlug et al., 2012; Boonsombuti et al., 2013).



รูปที่ 3.14 TGA thermograms ของเหง้ามันสำปะหลังก่อนและหลังการปรับสภาพ; NCR, OPCR, และ EPCR หมายถึงเหง้ามันสำปะหลังดั้งเดิมก่อนการปรับสภาพ, เหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่เหมาะสมที่สุด (840 W, 9 min, 3% NaOH), และเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสภาวะรุนแรง (900 W, 15 min, 5% NaOH) ตามลำดับ

ตารางที่ 3.20 ค่าอุณหภูมิเมื่อ NCR และ PCR สลายตัว 10, 20 and 50% โดยน้ำหนัก

Treatments	T10% (°C)	T20% (°C)	T50% (°C)
NCR	247.86±2.64 ^a	284.51±1.44 ^a	330.74±1.75 ^a
OPCR	291.88±4.05 ^b	318.24±0.57 ^b	360.36±2.85 ^c
EPCR	298.37±1.53 ^b	322.26±0.38 ^c	352.35±0.15 ^b

T10, T20, T50% แสดงอุณหภูมิขณะที่มวลเหง้ามันสำปะหลังสลายตัวไป 10, 20, และ 50% โดยน้ำหนักตามลำดับ ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างระหว่างการปรับสภาพ ($p < 0.05$) และค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6 สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจสอบค่าที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสแห้งมันสำปะหลังด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (MAP) เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตกลูโคสสูงที่สุดหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH) ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) จากการใช้แบบจำลองบ็อก-เบห์นเคน (BBD) อันมีพารามิเตอร์ที่ใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1), ระยะเวลาการฉายคลื่น (X_2), และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (X_3), ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 300, 600 และ 900 W; 5, 10 และ 15 min; และ 3, 5, และ 7% (w/v), ตามลำดับ; และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลผลิตกลูโคส เป็นเวลา 24 และ 48 h แบบจำลองพหุนามพื้นผิวตอบสนอง (quadratic RSM models) ถูกสร้างขึ้น และได้ดำเนินการวิเคราะห์ทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ได้ตรวจสอบกำลังการพยากรณ์ (predictive power) ของแบบจำลอง โดยให้ความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการ MAP ตั้งอยู่บนฐานทางคณิตศาสตร์โดยการใช้ RSM มีค่า 840 W 9 min 3%w/v สำหรับ X_1 , X_2 , และ X_3 ตามลำดับ แบบจำลองพหุนามกำลังสองที่เหมาะสมคือ $Y_1 = 7.040 + 0.020X_1 + 0.820X_2 - 1.420X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.00001X_1^2 - 0.029X_2^2 + 0.135X_3^2$ และ $Y_2 = 5.565 + 0.022X_1 + 0.840X_2 - 0.816X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.0005X_1X_3 - 0.00001X_1^2 - 0.028X_2^2 + 0.109X_3^2$ เมื่อ Y_1 และ Y_2 แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคสจากการ EnH OPCR เป็นระยะเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ แบบจำลองได้พยากรณ์ปริมาณผลผลิตกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 24 และ 48 h เท่ากับ 15.39 และ 16.40 g/100 g NCR DM., ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง 15.82 ± 0.22 และ 16.95 ± 0.31 g/100 NCR DM., บ่งชี้ถึงการป้องกันด้วยดีระหว่างค่าพยากรณ์ที่ได้จากแบบจำลองและค่าที่ได้จากการทดลอง และเมื่อเทียบกันแล้ว กำลังของคลื่นไมโครเวฟ เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่มีนัยสำคัญต่อการยกระดับปริมาณผลผลิตกลูโคส งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบผลกระทบของการ MAP ต่อสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของ NCR และ PCR โดยใช้เทคนิคภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (XRD), การวิเคราะห์พื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุน (BET & porosity), การวิเคราะห์ค่า Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA) บ่งชี้ว่าผลของการ MAP ได้เปลี่ยนแปลงสมบัติของ PCR อย่างมีนัยสำคัญอันส่งผลต่อการยกระดับการเข้าทำการของเอนไซม์และให้ปริมาณผลผลิตกลูโคสอย่างมีประสิทธิภาพ

3.7 ข้อเสนอแนะ

จากรูปที่ 3.2-3.4 แสดงข้อสังเกตว่า ค่าสูงสุดของผลิตภัณฑ์ฟิงได้ อาจอยู่ที่ตำแหน่ง $X_3 < 3\%$ w/v NaOH เพราะแนวโน้มของเส้นผลิตภัณฑ์ฟิงได้ อาจสูงขึ้นไปนอกกรอบเขต BBD เมื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ลงไปต่ำกว่า 3% w/v, แม้กระนั้นก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเมื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ลงแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ฟิงได้สูงขึ้น เพราะผลผลิตฟิงได้เกิดจากอิทธิพลของปัจจัยจำนวนมากที่มีอิทธิพลต่อกันและกัน (ความสัมพันธ์ของ X_1, X_2, X_3 ตามสมการพหุนามกำลังสองที่ 3.9 เมื่อแตกพจน์แล้วบางอันตรกิริยาอาจมีอิทธิพลทำให้เส้นแนวโน้มเปลี่ยนแปลงได้ โดยเฉพาะเมื่ออยู่นอกกรอบเขตการทดลอง) อย่างไรก็ตาม หากมีผู้สนใจขยายระดับการผลิต ฟิงศึกษาในช่วงความเข้มข้นของสารละลาย NaOH $< 3\%$ w/v ลงไปด้วย

3.8 ส่วนขยาย

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์กลูโคสจากกระบวนการ EnH แล้ว สามารถนำไปหมักไบโอแอลกอฮอล์ ซึ่งมีความหมายมิใช่เพียงไบโอเอทานอลเท่านั้น แต่ยังรวมถึงไบโอบิวทานอลด้วย ปัจจุบันไบโอบิวทานอลก็เป็นที่ได้รับความสนใจ วรวิติ จุฬาลักษณ์านุกูล (2558) ได้เรียบเรียงข้อได้เปรียบของบิวทานอลเมื่อเทียบกับเอทานอลสำหรับการเป็นพลังงานทดแทนไว้ว่า บิวทานอลมีค่าการระเหย (reid vapor pressure, RVP) ต่ำกว่าเอทานอล 7.5 เท่า, ค่า hygroscopicity ต่ำกว่าเอทานอล ดูดซับความชื้นน้อยกว่า, ปลอดภัยกว่าเพราะอุณหภูมิไวไฟ (flash point) (35°C) สูงกว่าเอทานอล (14°C), ความหนาแน่นพลังงาน (energy density) และปริมาณพลังงาน (energy content) สูงกว่า โดยบิวทานอลและเอทานอลมีค่าดังกล่าว 29.2, 19.6 MJ/L และ 110k, 84k BTU/gal ตามลำดับ และสภาพขั้ว (polarity) ต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีน (น้ำมันเบนซิน) ในอัตราส่วนใดก็ได้และไม่ต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์

นอกจากการ EnH ด้วยเซลล์ูเลสที่ทำใน OPCR, PCR หรือชีวมวลลิกโนเซลลูโลสอื่นใดให้ได้ผลผลิตกลูโคสแล้ว หากทำการ EnH เฮมิเซลลูโลส อันมีอยู่ทั้งในลิกโนเซลลูโลส PCR และขั้นตอนการตกตะกอนของ black liquor ด้วยเฮมิเซลลูเลส ก็สามารถไฮโดรไลซิสได้น้ำตาลไซโลสออกมา จุลินทรีย์ที่นิยมใช้หมักน้ำตาลกลูโคสและไซโลสให้เป็นเอทานอล ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia stipitis* ตามลำดับ

หากต้องการหมักบิวทานอล (อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล, ABE) นิยมใช้จุลินทรีย์สกุล *Clostridium* spp. เพราะสามารถเจริญในอาหารที่หลากหลาย ทั้งโมโนแซคคาไรด์ เช่น น้ำตาลเฮกโซส เพนโตส หรือพอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน ทว่า *Clostridium* spp. เช่น *C. thermocellum* ที่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรงนั้นมักเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ ขณะที่ *C. acetobutylicum* ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ก็ไม่สามารถย่อยพอลิแซคคาไรด์

ประเภทเซลล์ได้ หากต้องการหมักบิวทานอล อาจนำเชื้อมาเลี้ยงร่วมกันได้โดยให้ *C. thermocellum* หมักเซลลูโลสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสก่อน แล้ว *C. acetobutylicum* จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นบิวทานอล หรืออาจทำได้โดยให้น้ำตาลที่ได้จาก EnH แก่ *C. acetobutylicum* โดยตรง (วรวุฒิจุพาลักษณ์านุกูล, 2558)

กระบวนการหมักเอทานอล/บิวทานอล อาจใช้วิธีการหมักทีละส่วน (separate hydrolysis and fermentation, SHF) คือ 1) EnH ลิกโนเซลลูโลสให้ได้น้ำตาล จากนั้น 2) หมักน้ำตาลเป็นเอทานอล/บิวทานอล หรือ ใช้กระบวนการย่อยสลายและหมักแบบต่อเนื่อง (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ที่รวมขั้นตอนที่ 1) และ 2) เอาไว้ด้วยกัน วิธี SSF จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า SHF เพราะการทำ SHF จะมีการสะสมของปริมาณผลิตภัณฑ์น้ำตาลในกระบวนการที่ 1 ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการ EnH ของตนเอง หากใช้ SSF จุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นเอทานอล/บิวทานอลช่วยลดการสะสมของปริมาณผลิตภัณฑ์น้ำตาล

ปริมาณสารสัมพันธ์โดยทางทฤษฎีแล้ว จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนทั้งกลูโคสและไซโลสเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ 51.1 และ 48.9% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณเอทานอลที่ได้จริงจะอยู่ในช่วงไม่เกิน 90-95% ของค่าทางทฤษฎี เนื่องจากจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลบางส่วนเพื่อเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น กลีเซอรอลและกรดอินทรีย์ (วรวุฒิจุพาลักษณ์านุกูล, 2558) นอกจากนี้ยังขึ้นกับประสิทธิภาพของกระบวนการสกัดแยกไบโอแอลกอฮอล์เหล่านั้นออกจากของผสมในถังหมักด้วย

กระบวนการสกัดแยกไบโอแอลกอฮอล์สามารถสกัดออกมาได้หลายวิธีทั้งเคมีและฟิสิกส์ (Zentou et al., 2019) และแต่ละวิธีอาจถูกนำมาประยุกต์ร่วมกันเพื่อให้ได้ปริมาณ recovery และความบริสุทธิ์สูงสุด ได้แก่ Vacuum fermentation เพื่อลดการสะสมของเอทานอลเนื่องจากเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปขัดขวางกระบวนการหมักของตนเอง (Nguyen et al., 2011; Huang et al., 2015), วิธีกลั่นลำดับส่วนสุญญากาศ (Phakping et al., 2014; Samnuknit and Boontawan, 2014; Kongkaew et al., 2018), วิธี Pervaporation ผ่าน membrane (Liu et al., 2011; Xue et al., 2015; พิรนิติสมบัติไพรวาน, 2552), ใช้ Adsorbent (Saha et al., 2007; Oudshoorn et al., 2009; Saha et al., 2015) หรือสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction) (Offeman et al., 2005)

3.9 รายการอ้างอิง

พิรนิติ สมบัติไพรวาน. 2552. การแยกบิวทานอลออกจากน้ำหมักจำลองในกระบวนการเพอร์วaporation โดยใช้เยื่อแผ่น PDMS แบบหลายท่อ. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 95 หน้า.

- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลียวเรืองรัตน์, อุมพร สุขม่วง และ วันเพ็ญ ช้อนแก้ว. (2555). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, Principles and techniques of instrumental analysis part II Chromatography and others. **ชวนพิมพ์ 50**. กรุงเทพฯ. 623 หน้า.
- วรวิจิ จุฬาลักษณ์านุกูล. 2558. เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ. บทที่ 2 ไบโอดีแกออสอล. **สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**. 124 หน้า.
- Agu, O.S., Tabil, L.G., and Dumonceaux, T. (2017). Microwave-assisted alkali pre-treatment, densification and enzymatic saccharification of canola straw and oat hull. **Bioengineering**. 4(25): 1-32.
- Akhtar, N., Goyal, D., and Goyal, A. (2017). Characterization of microwave-alkali-acid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Energy Conversion and Management**. 141: 133-144.
- Alain, K.P., Nono, Y.J., and Kapseu, C. (2016). Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. **Renewable Energy**. 97: 252-265.
- Bazargan, A., Bazargan, M., and Mckay, G. (2015). Optimization of rice husk pretreatment for energy production. **Renewable Energy**. 77: 512-520.
- Binod P., Satyanagalakshmi K., Sindhu R., Janu K.U., Sukumaran R.K., Pandey A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renew Energ**. 37: 109-116.
- Boonsombuti, A., Luengnaruemitchai, A., and Wongkasemjit, S. (2013). Enhancement of enzymatic hydrolysis of corncob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology. **Cellulose**. 20(4): 1957-1966.
- Chen, W.-H., Pen, B.-L., Yu, C.-T., and Hwang, W.-S. (2011). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**. 102: 2916–2924.
- Chieng, B. W., Lee, S. H., Ibrahim, N.A., Then, Y.Y., and Loo, Y.Y. (2017). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from oil palm mesocarp fiber. **Polymers**. 9 (355): 1-11.

- Conesa, C., Seguí, L., Laguarda-Miró, N., and Fito, P. (2016). Microwave-assisted alkali pretreatment for enhancing pineapple waste saccharification. **BioResources**. 11(3): 6518-6531.
- Cui, L., Liu, Z., Si, C., Hui, L., Kang, N., and Zhao, T. (2012). Influence of steam explosion pretreatment on the composition and structure of wheat straw. **BioResources**. 7(3): 4202-4213.
- Danielson, M.E., Dauth, R., Elmasry, N.A., Langeslay, R.R., Magee, A.S., and Will, P.M. (2010). Enzymatic method to measure β -1,3- β -1,6-glucan content in extracts and formulated products (GEM Assay). **J. Agric. Food Chem.** 58(19): 10305-10308.
- Dong, S.J., Zhang, B.X., Gao, Y.F., and Hu, X.M. (2015). An efficient process for pretreatment of lignocelluloses in functional ionic liquids. Hindawi Publishing Corporation, **International Journal of Polymer Science**. Article ID 978983: 6 pages.
- Guilherme, A.A., Dantas, P.V.F., Santos, E.S., Fernandes, F.A.N., and Macedo, G.R. (2015). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 32(1): 23–33.
- Hsu, T.-C., Guo, G.-L., Chen, W.-H., and Hwang, W.-S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresour Technol.** 101: 4907-4913.
- Hu, Z.H. and Wen, Z.Y. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**. 38(3): 369-378.
- Huang, H., Qureshi, N., Chen, M.H., Liu, W., and Singh, V. (2015). Ethanol production from food waste at high solids content with vacuum recovery technology. **J. Agric. Food Chem.** 63 (10): 2760-2766.
- Huang, J., Liu, Y., Sun, B., and Shang, Z. (2017). Microwave-assisted alkali extraction of bagasse hemicellulose enhanced by an enzymatic pretreatment process. **Journal of Bioresources and Bioproducts**. 2(3): 105-109.
- Ji, Z., Ling, Z., Zhang, X., Yang, G.-H., and Xu, F. (2014). Impact of alkali pretreatment on the chemical component distribution and ultrastructure of poplar cell walls: Cell wall component distribution. **BioResources**. 9(3): 4159-4172.
- Kamalini, A., Muthusamy, S., Ramapriya, R., Muthusamy, B., and Pugazhendhi, A. (2018). Optimization of sugar recovery efficiency using microwave assisted alkaline pretreatment

- of cassava stem using response surface methodology and its structural characterization. **Journal of Molecular Liquids**. 254: 55-63.
- Kim, I., and Han, J.I. (2012). Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**. 46: 210-217.
- Kongkaew, A., Tonjes, J., Siemer, M., Boontawan, P., Rarey, J., Boontawan, A. (2018). Extractive fermentation of ethanol from sweet sorghum using vacuum fractionation technique: Optimization and techno-economic assessment. **International Journal of Chemical Reactor Engineering, De Gruyter**. 16 pages.
- Kumar, A., Negi, Y.S., Choudhary, V., and Bhardwaj, N.K. (2014). Characterization of cellulose nanocrystals produced by acid-hydrolysis from sugarcane bagasse as agro-waste. **Journal of Materials Physics and Chemistry**. 2(1): 1-8.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., and Wyman, C.E. (2009). Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**. 100(17): 3948-3962.
- Lionetto, F., Sole, R.D., Cannoletta, D., Vasapollo, G., and Maffezzoli, A. (2012.) Monitoring wood degradation during weathering by cellulose crystallinity. **Materials**. 5(10): 1910-1922.
- Liu, G., Wei, W., Wu, H., Dong, X., Jiang, M., and Jin, W. (2011). Pervaporation performance of PDMS/ceramic composite membrane in acetone butanol ethanol (ABE) fermentation–PV coupled process. **Journal of Membrane Science**. 373(1–2): 121-129.
- Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y.-J., and Yu, Z.-L. (2008). Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource technology**. 100 (3): 1279-1284.
- Maaloul, N., Arfi, R.B., La Vega, M.R., Ghorbal, A., and Mario, D. (2016). Dialysis-free extraction and characterization of cellulose crystals from almond (*Prunus dulcis*) shells. **Journal of Materials and Environmental Science**. 8(11): 4171-4181.
- Mahmoud, D.A.R. (2016). Utilization of palm wastes for production of invert sugar. **Procedia Environmental Sciences**. 34: 104-118.

- Martín, C., Wei, M., Xiong, S., and Jönsson, L.J. (2017). Enhancing saccharification of cassava stems by starch hydrolysis prior to pretreatment. **Industrial Crops and Products**. 97: 21-31.
- Maryana, R., Ma'rifatun, D., Wheni, A.I., Satriyo K.W., Rizal, W.A. (2014). Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. *Energy Procedia*. 47: 250-254.
- McCleary, B.V., and Codd, R. (1991). Measurement of (1-3), (1-4) β -D-glucan in barley and oats: A streamlined enzymic procedure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 55(2): 303-312.
- McIntosh, S., and Vancov, T. (2011). Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**. 35(7): 3094-3103.
- Meesukanun, K., and Satirapipathkul, C. (2014). Production of acetone-butanol-ethanol from cassava rhizome hydrolysate by *Clostridium saccharobutylicum* BAA 117. **Chemical Engineering Transactions**. 37: 421-426.
- Mohamad, N.L., Kamal, S., Mustapa, M., and Taip, F.S. (2012). Microwave pretreatment for enzymatic hydrolysis of sago trunk cortex. in **Chemeca 2012: Quality of life through chemical engineering (conference paper)** 23-26 September 2012, Wellington, New Zealand. Published at Barton, A.C.T., Engineers Australia. 1723-1730.
- Momayez, F., Karimi, K., Karimi, S., and Horváth, I.S. (2017). Efficient hydrolysis and ethanol production from rice straw by pretreatment with organic acids and effluent of biogas plant. **The Royal Society of Chemistry**. 7: 50537-50545.
- Mosier, N.S., Hendrickson, R., Brewer, M., Ho, N., Sedlak, M., Dreshel, R., Welch, G., Dien, B.S., Aden, A., and Ladisch, M.R. (2005). Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**. 125(2): 77-97.
- Nguyen V.D.; Auresenia J., Kosuge, H., Tan, R.R., Brondial, Y. (2011). Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**. 55(3): 208-214.
- Nomanbhay, S.M., Hussain, R., and Palanisamy, K. (2013). Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**. 3(1): 7-17.

- Offeman, R.D., Stephenson, S.K., Robertson, G.H., and Orts, W.J. (2005) Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions. I. Screening methodology for solvents. **Ind. Eng. Chem. Res.** 44(17): 6789-6796.
- Onyianta, A., Dorris, M., and Williams, R.L. (2018). Aqueous morpholine pre-treatment in cellulose nanofibril (CNF) production: comparison with carboxymethylation and TEMPO oxidation pre-treatment methods. **Cellulose.** 25(2): 1047-1064.
- Oudshoorn, A., Wielen, L.A.M., and Straathof, A.J.J. (2009). Adsorption equilibria of bio-based butanol solutions using zeolite. **Biochem. Eng. J.** 48(1): 99–103.
- Panthapulakkal, S., Kirk, D., and Sain, M. (2015). Alkaline Extraction of Xylan from Wood Using Microwave and Conventional Heating. **Journal of Applied Polymer Science.** 132(4).
- Peng, H., Luo, H., Jin, S., Hongqiang, L., and Xu, J. (2014). Improved bioethanol production from corn stover by alkali pretreatment with a novel pilot-scale continuous microwave irradiation reactor. **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** 19(3): 493-502.
- Phakping, S., Ketudat-Cairns, M., and Boontawan, A. (2014). Extractive fermentation of ethanol from fresh cassava roots using vacuum fractionation technique. **Advanced Materials Research.** 931-932: 1096-1100.
- Podder, P.K., Gupta, K., Jamari, S.S.B., Rashid, S.S., Sharma, S., Subramaniam, M., and Thraisingam, J. (2016). Isolation of nano cellulose from rubber wood fibre and fibrillation effects on nano cellulose reinforced poly (Ethylene oxide). The National Conference for Postgraduate Research. September 24-25, 2016. **Universiti Malaysia Pahang.** pp. 704-711.
- Ruangmee, A., and Sangwichien, C. (2013). Statistical optimization for alkali pretreatment conditions of narrow-leaf cattail by response surface methodology. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 35(4): 443-450.
- Safari, A., Karimi, K., and Shafiei, M. (2017). Dilute alkali pretreatment of softwood pine: A biorefinery approach. **Bioresource Technology.** 234: 67-76.
- Saha, B.B., El-Sharkawy, I.I., Chakraborty, A., Koyama, S. (2007). Study on an activated carbon fiber–ethanol adsorption chiller: Part I–system description and modelling. **Int. J. Refrig.** 30(1): 86-95.

- Saha, B.B., El-Sharkawy, I.I., Miyazaki, T., Koyama, S., Henninger, S.K., Herbst, A., and Janiak, C. (2015). Ethanol adsorption onto metal organic framework: Theory and experiments. **Energy**. 79(1): 363–370.
- Saifuddin, N.M., Hussein, R., and Palanisamy, K. (2013). Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave-assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**. 3: 7-17.
- Saldarriaga, J.F., Pablos, A., Aguado, R., Amutio, M., and Olazar, M. (2012). Characterization of lignocellulosic biofuels by TGA. *International Review of Chemical Engineering*. **Praise Worthy Prize S.r.l.** 4(6): 585-588.
- Samnuknit, W., and Boontawan, A. (2014) Extractive fermentation of ethanol using vacuum fractionation technique. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**. 8(9): 925-930.
- Selig, M., Weiss, N., and Ji, Y. (2008). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass *in* Laboratory Analytical Procedure: Issue date 3/21/2008 Technical report NREL/TP-510-42629. **NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis**.
- Singh, A., and Bishnoi, N.R. (2012). Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. **Bioresource Technology**. 108: 94-101.
- Singh, A., Tuteja, S., Singh, N., and Bishnoi, N.R. (2011). Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave-alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production. **Bioresource Technology**. 102(2): 1773-1782.
- Singh, R., Tiwari, S., Srivastava, M., and Shukla, A. (2014). Microwave assisted alkali pretreatment of rice straw for enhancing enzymatic digestibility. Hindawi Publishing Corporation, **Journal of Energy**. 1-7.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., and Templeton, D. (2008). Determination of extractives in biomass. *in* Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 7/17/2005 Technical Report NREL/TP-510-42619 January 2008. **NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis**.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *in* Laboratory Analytical

Procedure (LAP) Version 08-03-2012. **NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis.**

- Sombatpraiwan, S., Junyusen, T., Trearnak, T., and Junyusen, P. (2019). Optimization of microwave-assisted alkali pretreatment of cassava rhizome for enhanced enzymatic hydrolysis glucose yield. *in* Wiley online library, **Food Energy Secur.** 00e00174: 15 pages.
- Song, C., Hu, H., Zhu, S., Wang, G., and Chen, G. (2004). Nonisothermal catalytic liquefaction of corn stalk in subcritical and supercritical water. **Energy Fuels.** 18(1): 90-96.
- Soni, B., Hassan, E.B., and Mahmoud, B. (2015). Chemical isolation and characterization of different cellulose nanofibers from cotton stalks. **Carbohydrate Polymers.** 134: 581-589.
- Terinte, N., Ibbetta, R., and Schuster, K.C. (2011). Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques. **Lenzinger Berichte.** 89: 118-131.
- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry.** 6: 24-27.
- Vázquez, M., Delgado, R., and Castro, A.J. (2009). Modelling of the enzymatic hydrolysis of potato (*Solanum tuberosum*) using response surface methodology. **Starch/Stärke.** 61: 601-609.
- Velmurugan, R., and Muthukumar, K. (2011). Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology.** 102(14): 7119-7123.
- Wanitwattananurmlug, B., Luengnaruemitchai, A., and Wongkasemjit, S. (2012). Characterization of corn cobs from microwave and potassium hydroxide pretreatment. **International J. Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering.** 6(4): 327-331.
- Xu, J., Chen, H., Kádár, Z., Bjerre, A.B., Schmidt, J., and Peng, H. (2011). Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. **Biomass and Bioenergy.** 35(9): 3859-3864.
- Xu, J. K., Sun, Y.C., and Sun, R.C. (2014). Structural and hydrolysis characteristics of cypress pretreated by ionic liquids in a microwave irradiation environment. **BioEnergy Research.** 7: 1305-1316.

- Xue, C., Liu, F., Xu, M., Zhao, J., Chen, L., Ren, J., Bai, F., Yang, S.T. (2015). A novel in situ gas stripping-pervaporation process integrated with acetone-butanol-ethanol fermentation for hyper n-butanol production. **Biotechnology and Bioengineering**. 113(1) doi.org/ 10.1002/bit.25666
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Zheng, C., Lee, D.H., and Liang, D.T. (2006). In-depth investigation of biomass pyrolysis based on three major components: hemicellulose, cellulose and lignin. **Energy & Fuels**. 20: 388-393.
- Yi-min, W., Zeng-li, Z., Hai-bin, L. and Fang, H. (2009). Low temperature pyrolysis characteristic of major components of biomass. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**. 37: 427-432.
- Yuan, T.-Q., Xu, F., He, J., and Sun, R.-C. (2010). Structural and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasound-assisted extractions of partially delignified fast-growing poplar wood through organic solvent and alkaline solutions. **Biotechnology Advances**. 28(5): 583-593.
- Yuen, V. G., and McNeil, J. H. (2000). Comparison of the glucose oxidase method for glucose determination by manual assay and the automated analyzer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 44(3): 543-546.
- Zentou, H., Abidin, Z.Z., Yunus, R., Biak, D.R.A., and Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. **Processes**. 7(7): 458, doi.org/10.3390/pr7070458
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Liao, J., and Zhang, Y. (2005). Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**. 40(9): 3082-3086.
- Zhu, S.D., Wu, Y.X., Yu, Z.N., Chen, Q.M., Wu, G.Y., Yu, F.Q., Wang, C.W., and Jin, S.W. (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Eng**. 94(3): 437-442.
- Zhu, Z., Simister, R., Bird, S., McQueen-Mason, S.J., Gomez, L.D., and Macquarrie, D.J. (2015). Microwave assisted acid and alkali pretreatment of Miscanthus biomass for biorefineries. **AIMS Bioengineering**. 2(4): 449-468.
- Zhu, Z., Rezende, C.A., Simister, R., McQueen-Mason, S.J., Macquarrie, D.J., Polikarpov, I., and Gomez, L.D. (2016). Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. **Biomass and Bioenergy**. 93: 269-278.

บทที่ 4

สมบัติทางกายภาพ-เคมีของลิกนินจากเหง้ามันสำปะหลังจากการปรับสภาพ ด้วยด่างร่วมกับไมโครเวฟและวิธีการดั้งเดิม

4.1 บทคัดย่อ

การปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วย MAP (840 W, 9 min, 3%w/v NaOH, 3% solid loading) แล้วตกตะกอน black liquor ด้วย 6 M HCl กระทั่ง pH 1.5 เพื่อให้ได้ MAPL โดยเทียบกับ ลิกนิน CPL ที่ได้จากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยวิธีการดั้งเดิม (40°C, 1 h, 10% w/v NaOH, 3% solid loading แล้วตกตะกอนลิกนินด้วยวิธีเดียวกัน) พบว่าน้ำหนักแห้งของ MAPL และ CPL มีค่า $1.60\pm 0.25\%$ และ $0.67\pm 0.01\%$ เมื่อเทียบกับ NCR DM. ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วย FTIR พบว่า MAPL และ CPL มีหมู่ฟังก์ชันเทียบได้กับลิกนินมาตรฐาน (STDL) แต่ยังไม่สามารถสรุปองค์ประกอบได้อย่างชัดเจนนัก การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อนพบว่า STDL, MAPL และ CPL มีร้อยละของมวลคงเหลือที่อุณหภูมิ 800°C เท่ากับ 42.69 ± 0.81 , 41.48 ± 1.94 , 28.76 ± 0.57 ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของ MAPL และ CPL มีค่า 171.87 ± 11.35 และ 65.47 ± 2.29 mg GAE/g lignin คิดเป็น 98.64 และ 37.86% ของ TPC ของลิกนินมาตรฐาน (STDL) ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 267.32 ± 1.68 และ 146.23 ± 16.09 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 86.00 และ 47.05% ของ DPPH_{AA} ของ STDL ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 545.56 ± 2.76 และ 173.29 ± 5.53 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 80.67 และ 25.63% ของ ABTS_{AA} ของ STDL ตามลำดับ สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ MAPL สอดคล้องกับสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ CPL คือพบโมโนลิกนอลของทั้ง H G และ S unit ขณะที่ STDL ไม่พบสัญญาณ S unit หรือมีสัญญาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม ผลสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ (NMR) ของ MAPL แสดงปริมาณสัญญาณในช่วงของหมู่โรรมาติกมาก สมเหตุสมผลกับ STDL และแตกต่างจาก CPL ซึ่งมีปริมาณสัญญาณน้อยกว่า สอดคล้องกับค่า TPC DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส ส่งผลดีต่อปริมาณและคุณภาพลิกนินในการสร้างผลิตภัณฑ์ด้านอนุมูลอิสระ สามารถพัฒนา MAPL ต่อในการเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม

คำสำคัญ: เหง้ามันสำปะหลัง, การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส, กลิ่นไมโครเวฟ, สารละลายต่าง, ลิกนิน, สารต้านอนุมูลอิสระ, สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์

4.2 บทนำ

ส่วนใหญ่ผลพลอยได้ลิกนินจากกระบวนการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส ทั้งในอุตสาหกรรมกระดาษหรืองานแปรสภาพเพื่อผลิตไบโอเอทานอล-บิวทานอลนั้น ส่วนใหญ่จะถูกนำกลับมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงด้วยการเผาไหม้โดยตรงเพราะมีค่าความร้อนสูง (Gordobil et al., 2016; Oluwadare et al., 2016) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีนักวิจัยศึกษาการนำลิกนินเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี (Calvo-Flores and Dobado, 2010; Doherty, et al., 2011) เช่น สลายลิกนินให้ได้สารวานิลลิน (vanillin) สารดูดซับคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon materials) สารเชื่อมติด (binding) และสารช่วยกระจาย (dispersing agent) ในอุตสาหกรรมเคมีและกระดาษ สารช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของพลาสติกย่อยสลายได้ในด้านความคงตัวเมื่อได้รับผลจากความร้อน นอกจากนี้ยังมีการวิจัยศึกษาคุณสมบัติของลิกนินและอนุพันธ์ของลิกนินเพื่อนำไปใช้ทางการแพทย์ (Vinardell and Mitjans, 2017) เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านไวรัส (antiviral) ลดการดูดซึมกลูโคสในภาวะเบาหวาน (antidiabetic) อนุภาคนาโนนำส่งยา (lignin-based nanoparticles for drug delivery) สารช่วยลดสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ต้านการแข็งตัวของเลือดหรือละลายลิ่มเลือด (anticoagulant)

ด้วยเหตุว่าลิกนินจากพืชแต่ละชนิด มีองค์ประกอบไม่เหมือนกัน แม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกัน เมื่อผ่านวิธีการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส การตกตะกอนลิกนิน และ/หรือผ่านกระบวนการสกัดแยกลำดับส่วน (fractionate) ในลักษณะที่ต่างกันก็จะทำให้ได้สัดส่วนองค์ประกอบลิกนินที่แตกต่างกัน อาจทำการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมีของลิกนินที่ได้ เพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน เช่น พิจารณาขนาดหรือสัณฐานอนุภาคจาก SEM/FESEM (Afrin et al., 2012; Myint et al., 2015; Zhu et al., 2015) น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) (Tolbert et al., 2014; Gordobil et al., 2016; Marathe et al., 2019), Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bayerbach et al., 2006; Richel et al., 2012; Wang et al., 2017), หมู่ฟังก์ชันและองค์ประกอบ เช่น Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (Ying et al., 2018; Menezes Nogueira et al., 2019; Ramakoti et al., 2019), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) (Nadji et al., 2009; Garcia et al., 2010; Khaldi-Hansen et al., 2016), Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) (Takada et al., 2004; Kaiser and Benner, 2012; Gao et al., 2018), Pyrolysis gas chromatography mass spectrometry (Py-GC/MS) (Scholze and Meier, 2001; Brebu et al., 2013; Haz et al., 2013), TGA (Thermogravimetric analysis)

/ DSC (Differential scanning calorimetry) (Watkins et al., 2015; Haz et al., 2019; Nunes and Pardini, 2019) เป็นต้น

ในบทที่แล้วได้ทำการวิจัยถึงการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่างไปแล้ว และลิกนินเป็นผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการปรับสภาพชีวมวลลิกโนเซลลูโลสเหง้ามันสำปะหลัง ในบทนี้จะทำการตกตะกอน และศึกษาคุณลักษณะโดยเปรียบเทียบกับลิกนินอีก 2 ชนิด ดังจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

4.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติทางกายภาพ-เคมีของลิกนินมาตรฐาน (alkali lignin, Sigma-Aldrich) (STDL) เทียบกับลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (MAPL) และลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมร่วมกับสารละลายต่าง (CPL) เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบสัณฐาน องค์ประกอบทางเคมี และความเป็นไปได้ในการพัฒนา MAPL เป็นผลิตภัณฑ์ด้านอนุมูลอิสระ

4.4 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ก) Alkali lignin จากบริษัท Sigma-Aldrich Co. Ltd. หมายเลขผลิตภัณฑ์: 370959, CAS Number: 8068-05-1, Specification: PRD.1.ZQ5.1000058413 ที่อยู่บริษัท 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA. รูปที่ ก.1 ในภาคผนวกหน้า 182

ข) ลิกนินจากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง ในช่วงกำลังคลื่นไมโครเวฟ, ระยะเวลาการฉายคลื่น และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH = 300-900 W, 5-15 min 3-7%w/v 3% solid loading พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพคือ 840 W 9 min 2 s 3%w/v NaOH

ค) การปรับสภาพด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมร่วมกับสารละลายต่างในช่วงอุณหภูมิ, ระยะเวลา และความเข้มข้นของสารละลาย NaOH = 40, 60, 80°C เวลา 1, 3, 5 h และ 1, 5, 10% w/v ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของแข็ง 3% solid loading โดยฉัษฐพร ชัชวาลชาติ และธีราพร จุลยุเสน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพคือ 40°C 1 h 10% w/v NaOH

4.4.1 วิธีการสกัดลิกนิน

วิธีการสกัด MAPL

จากค่าเหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยคลื่นไมโครเวฟ ร่วมกับสารละลายต่าง 3% (w/v) NaOH 9 นาที 2 วินาที กำลังคลื่น 840 W solid loading 3% (มวล เหง้ามันสำปะหลังแห้ง 1.500 g สารละลายต่าง 3% (w/v) NaOH 50 mL) เก็บสารละลายต่าง (black liquor) สะเทินด้วยกรด 6 M HCl กระทั่ง pH7 เติม 95% EtOH ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายต่าง สะเทินกรด (2 Vol) เพื่อตกตะกอนเฮมิเซลลูโลส ปั่นเหวี่ยง 8,000 rpm 10 min เพื่อนำเฮมิเซลลูโลส ออก ลดระดับ pH ด้วยกรด 6 M HCl กระทั่ง pH 1.5 บ่มไว้ที่ 4°C 24 h เพื่อให้ลิกนินตกตะกอน ปั่น เหวี่ยง 8,000 rpm 10 min เพื่อนำลิกนินออก, ล้างเกลือ NaCl ออกจากลิกนินดังกล่าวด้วยสารละลาย กรด 6 M HCl pH 1.5 อีก 3-4 รอบ นำลิกนินที่ได้ทำเยือกแข็งแล้วทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งสุญญากาศ เก็บมวล ชั่งน้ำหนักลิกนินทั้งหมดที่ได้เทียบกับเหง้ามันสำปะหลังแห้งเริ่มต้นทั้งหมดที่นำมาใช้

วิธีการสกัด CPL

หาค่าความชื้นในเหง้ามันสำปะหลังตัวอย่างก่อน (เหง้ามันสำปะหลังขนาด 1-2 mm ชุดตัวอย่างการเก็บ-บด-เตรียม เดียวกันกับตัวอย่างที่นำมาใช้ในบทที่ 3 และใช้ทำ MAPL) จากนั้น คำนวณกลับเอาเฉพาะมวลแห้ง 100 g เตรียม 10% (w/v) NaOH ปริมาตร 3.333 L วางไว้ใน shaking incubator ที่ตั้งอุณหภูมิ 40°C รออุณหภูมิสารละลายขึ้นถึง 40°C จึงเติมเหง้ามันสำปะหลัง 100 g ดังกล่าวลงไป ตั้งเขย่าสาร 60 rpm เมื่อครบกำหนด 1 h กรองสารผสมดังกล่าวเอาของแข็งออกด้วย Whatman No.1 ผ่าน Büchner funnel ได้สารน้ำ (black liquor) สะเทินด้วยกรด 6 M HCl กระทั่ง pH7 เติม 95% EtOH ปริมาตร 2 Vol เพื่อตกตะกอนเฮมิเซลลูโลส ปั่นเหวี่ยง 8,000 rpm 10 min เพื่อนำเฮมิ เซลลูโลสออก ลดระดับ pH ด้วยกรด 6 M HCl กระทั่ง pH 1.5 บ่มไว้ที่ 4°C 24 h เพื่อให้ลิกนินตก ตะกอน ปั่นเหวี่ยง 8,000 rpm 10 min เพื่อนำลิกนินออก, ล้างเกลือ NaCl ออกจากลิกนินดังกล่าวด้วย สารละลายกรด 6 M HCl pH 1.5 อีก 3-4 รอบ นำลิกนินที่ได้ทำเยือกแข็งแล้วทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง สุญญากาศ เก็บมวล ชั่งน้ำหนักลิกนินทั้งหมดที่ได้เทียบกับเหง้ามันสำปะหลังแห้งเริ่มต้นทั้งหมดที่ นำมาใช้

4.4.2 การวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะ สูงชนิดฟิลด์อีมิสชัน (FESEM)

เบื้องต้นได้ใช้ SEM ประเภททั่วไป (SEM, Jeol: JSM-6010LV, Japan) ในการศึกษา ขนาดลิกนิน พบว่าสามารถมองเห็นอนุภาคของ STDL ได้ในช่วง <math><100-1000\text{ nm}</math> แต่ไม่สามารถ มองเห็นอนุภาคของ MAPL และ CPL ได้ แม้จะทำกำลังขยายให้สูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้ FESEM (Carl Zeiss: Auriga, Germany) พงลิกนินถูกทำให้กระจายตัวบน Aluminum stubs แล้วเคลือบ (sputter coating) ด้วย Platinum ความต่างศักย์ของ FESEM 3.0 kV

4.4.3 การวิเคราะห์ค่า Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

สเปกตรากการดูดซับรังสีได้แดงของ STDL, MAPL และ CPL ได้จากเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Tensor 27, Bruker, USA) ใช้ซอฟต์แวร์ OPUS 7.0 สเปกตรากการดูดซับรังสีได้แดงในทุกตัวอย่างถูกบันทึกในตั้งแต่ 4000-400 cm^{-1} ที่ 64 scans, ความละเอียด 4 cm^{-1} (Menezes Nogueira et al., 2019)

4.4.4 การวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA)

วิเคราะห์มวลของสารซึ่งเป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิในขณะที่สารได้รับความร้อนตามอุณหภูมิที่โปรแกรมไว้ โดยเครื่อง TGA จะประกอบด้วยส่วนประกอบหลักคือเครื่องซึ่งที่มีความไว (sensitivity) สูง ห้องเผา (furnace) และ instrument ที่ควบคุมระบบ (แมน อมรลิตี และคณะ, 2555)

การสลายตัวของ STDL, MAPL และ CPL ถูกเปรียบเทียบกันโดยใช้เครื่อง TGA/DSC 1 Star System, Mettler Toledo, Switzerland ตามขั้นตอนของนักวิจัยหลายท่าน ในที่นี้ได้ดัดแปลงตาม Song et al. (2004) ตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 5 mg ถูกวางในถ้วยอลูมินา และให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 25°C ขึ้นไปถึง 1,000°C (งานวิจัยอื่นๆ เช่น Whatkins et al. 2015 ใช้ถึง 800°C) อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10°C/min (Xue et al., 2012; Whatkins et al., 2015; Duan et al., 2018) ในบรรยากาศไนโตรเจน 35 cm^3/min น้ำหนักที่ลดลงแสดงตัวเป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.4.5.1 Total phenolic compound (TPC)

ทำการทดลองโดยใช้วิธีการของ อิศระวัฒน์ ฤทธนพงศธร และเฉลิม เรืองวิริยะชัย (2556) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chan et al. (2009) ; และเนตรนภา เมฆกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย (2557) ใช้ Folin-Ciocalteu's RS reagent (Carlo Erba co. Ltd., 463562 UN 3264 Batch Number T112107A) เข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 1.5 mL เติมกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้น 0-700 ppm ปริมาตร 0.3 mL เพื่อสร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน (standard calibration curve) หรือสารละลายลิควินินในเมทานอล (เจือจางให้เหมาะสม คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาอยู่ในพิสัยของกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน) ปริมาตร 0.3 mL ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เติม Na_2CO_3 เข้มข้น 7.5% (w/v water) ปริมาตร 3.0 mL ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 mL เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 min วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดังกล่าวที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณเทียบกับกราฟเปรียบเทียบมาตรฐานและคูณกลับด้วยปริมาณลิควินินเจือจางในเมทานอล ได้ค่าในหน่วยปริมาณ mg กรดแกลลิกสมมูลต่อน้ำหนักลิควินินแห้ง 1 g (mgGAE/g dry sample)

4.4.5.2 DPPH and ABTS free radical scavenging activity assay

DPPH assay

ดัดแปลงวิธีการของ Thaipong et al. (2006) กับ Van Le and Le (2012) โดยเตรียม 0.1 mM DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich, Germany) ในเมทานอล แล้วเจือจางให้ได้ค่า absorbance = 1.1 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 515 nm เตรียมสารละลาย DPPH เจือจาง 5 mL ทำปฏิกิริยากับ Trolox ในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (25-700 μ M) 265 μ L บ่มสารละลายให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 min อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm สร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน จากนั้นใช้สารละลาย DPPH เจือจาง ทำปฏิกิริยากับสารละลายลิกนินในเมทานอล 265 μ L (สารละลายลิกนินทำจะหน้าที่ในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับสารละลาย Trolox) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณลิกนินในเมทานอลกลับ จะได้ปริมาณ Trolox สมมูลในหน่วย mM TEAC (millimolar Trolox equivalent antioxidant capacity)/g lignin

ABTS assay

ดัดแปลงวิธีการของ Thaipong et al. (2006) กับ Van Le and Le (2012) โดยใช้ 2.6 mM potassium persulfate ทำปฏิกิริยากับ 7.4 mM ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA) ด้วยปริมาตรที่เท่ากันให้เป็นอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ โดยบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 h แล้วเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm = 0.7 ± 0.02 ใช้สารละลาย ABTS ดังกล่าว 5 mL ทำปฏิกิริยากับสารละลายลิกนิน 400 μ L (หรือ Trolox ในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (25-700 μ M ปริมาตร 400 μ L เพื่อสร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน) จากนั้น 1 min วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm แล้วคำนวณปริมาณลิกนินในเมทานอลกลับ จะได้ปริมาณ Trolox สมมูลในหน่วย mM TEAC/ g lignin

4.4.6 การวิเคราะห์ NMR

ละลายลิกนินใน DMSO (Capanema et al., 2004; Nadji et al., 2009; Ralph, and Landucci, 2010; Xue et al., 2012, Zhou et al., 2016) โดยใช้ลิกนิน 50 mg 500 μ L DMSO- d_6 (Menezes Nogueira et al., 2019 มีค่าอ้างอิงของ DMSO 39.5/2.50) ตัวอย่างลิกนินถูกวิเคราะห์ด้วย 500 MHz NMR spectrometer (Bruker AVANE III HD) โพรบ CPP BBO 500 Cryoprobe ที่ 25°C สำหรับ 1H และ ^{13}C NMR spectra เก็บค่าที่ความถี่ 500.366 และ 125.816 MHz ตามลำดับ การทำ HSQC ใช้ phase-sensitive 2D pulse sequence (Bruker hsqcedetgpcsp.3) ซอฟต์แวร์รวบรวมข้อมูลและประมวลผลชื่อ Bruker NMR software Topspin 3.5pl6

4.5 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.5.1 ลิกนินที่สกัดได้

น้ำหนักแห้งของ MAPL และ CPL (%lignin recovery) มีค่า $1.6032 \pm 0.2469\%$ และ $0.6748 \pm 0.0145\%$ เทียบกับ NCR DM. ซึ่ง MAPL ได้ปริมาณมากกว่า CPL ประมาณ 2.4 เท่า ลิกนินจากมันสำปะหลังทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาล มีกลิ่นเหมือนไม้แห้ง ความเข้มข้นของกลี้นระดับอ่อนมาก-ไม่ได้กลี้น (ผู้เขียน) ขณะที่ STDL มีลักษณะเป็นผงละเอียดเช่นกัน แต่สีน้ำตาลแดงเข้มกว่า มีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์คล้ายโกโก้ ความเข้มข้นของกลี้นพอประมาณ สามารถได้กลี้นเมื่อเปิดภาชนะ (ผู้เขียน)

เมื่อวัดสีด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab Color Quest XE, STDL มีค่าสีในระบบ (L, a, b) และ (L*, a*, b*) เท่ากับ (28.71 ± 0.23 , 8.20 ± 0.13 , 10.94 ± 0.05) และ (34.48 ± 0.27 , 11.43 ± 0.20 , 21.40 ± 0.25); MAPL มีค่าสีในระบบ (L, a, b) และ (L*, a*, b*) เท่ากับ (38.04 ± 0.09 , 7.01 ± 0.03 , 10.24 ± 0.02) และ (45.46 ± 0.25 , 9.23 ± 0.02 , 16.92 ± 0.16) ตามลำดับ; CPL มีค่าสีในระบบ (L, a, b) และ (L*, a*, b*) เท่ากับ (43.68 ± 0.011 , 4.39 ± 0.002 , 9.86 ± 0.01) และ (50.78 ± 0.01 , 5.50 ± 0.02 , 14.82 ± 0.01) ตามลำดับ พบว่าลิกนิน CPL จากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยมีค่าความสว่างสูงกว่า ความเป็นสีแดงและเหลืองต่ำกว่า MAPL และ STDL ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 ลิกนิน STDL (370959, Alkali lignin, Sigma Aldrich); MAPL และ CPL จากเหง้ามันสำปะหลัง

4.5.2 ผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มี สมรรถนะสูงชนิดฟิลด์อิมิตชัน (FESEM)

STDL สามารถเห็นรูปทรงกลมได้ตั้งแต่ที่กำลงขยาย 100 เท่า โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทรงกลม 30-100 μm บางทรงกลมร้าวแตก มีลักษณะคล้ายกับรายงานของ Meng et al. (2019) ซึ่งตรวจสอบลิกนินจากฟางข้าวสาธิตประเภท alkali lignin ที่ได้จากบริษัท Geyi Energy Company ใน Hefei, Anhui สาธารณรัฐประชาชนจีน ด้วย SEM พบว่าลิกนินมีลักษณะเป็นทรงกลม ผิวหยาบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 μm นอกจากนี้ Köhnke et al. (2019) ได้ kraft lignin ไม้สนจากบริษัท MeadWestvaco (Richmond, USA) เมื่อตรวจสอบด้วย SEM พบว่าเป็นทรงกลม หยาบร้าวเช่นเดียวกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางทรงกลมประมาณ 150-180 μm

Abbati de Assis et al. (2018) กล่าวว่าการผลิตลิกนินขนาดอนุภาคไมโครหรือนาโน ในปัจจุบันขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการสู่ระดับอุตสาหกรรม โดยใช้ aerosol flow reactor ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก 4 ขั้นตอนคือ dissolution, atomization, drying, และ vapor–solid separation ลิกนินผงแห้งทรงกลมที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $\leq 3 \mu\text{m}$ หรือเล็กได้ยิ่งกว่า 200 nm

ตามรายงานของ Köhnke et al. (2018) ได้กล่าวถึงการทำให้ลิกนินให้เป็นทรงกลมระดับ sub-micron ว่าเตรียมสารละลายลิกนินใน dimethylformamide แล้วพ่นเป็นละอองผ่าน jet atomizer ใช้ไนโตรเจนเป็นตัวพา จากนั้นทำให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 153°C ในเครื่องปฏิกรณ์ลมร้อน (heated laminar flow reactor) แล้วคัดแยกขนาดด้วย low-pressure impactor ทว่าบริษัท Sigma-Aldrich / Merck Co., Ltd. ทำอย่างไรให้ได้ alkali lignin ทรงกลม (ตัวอย่าง STDL) นี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด

รูปสัณฐานของ MAPL และ CPL คล้ายกับ organosolv lignin ในงานของ Köhnke et al. (2019) ที่ได้มาจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ Fraunhofer (Leuna, Germany) แต่ MAPL และ CPL มีขนาดเล็กกว่ามากต้องใช้กำลงขยาย 10,000-70,000 เท่า; นอกจากนี้ MAPL ที่กำลงขยาย 10,000 เท่ามีสัณฐานเหมือนกับ kraft lignin จากทะเลสาบปาล์มเปลาโดยให้ความร้อนทะเลสาบปาล์มด้วยด่างและซัลเฟต 19 และ 25% ตามลำดับ ใช้อุณหภูมิตั้งแต่อุณหภูมิห้องถึง 170°C เป็นเวลา 1 h จากนั้นคงอุณหภูมิ 170°C อีก 3 h, การตกตะกอนลิกนิน ทำการลด pH ไปที่ 2.0 ด้วยกรดซัลฟิวริกในงานของ Ibrahim et al. (2019)

ผู้เขียนสันนิษฐานว่าผงลิกนินทั้งสี่นี้ไม่มีรูปร่างแน่นอน โดยที่แม้ รูปที่ปรากฏใน FESEM เป็นเพียงรูปแห้ง (หรือรูปเปียกน้ำ-สารละลาย, หรือตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนถูกทำให้แห้ง) การเป็นทรงกลมโตอย่าง STDL น่าจะเกิดระหว่างการเตรียมตัวอย่างให้ได้ลิกนินผงแห้งออกมาดังที่ Köhnke et al. (2018) รายงานไว้ ส่วนการร้าวแตกป่นน่าจะเกิดจากการกระทบขัดสีกันเองระหว่างอยู่ในภาชนะ เปรียบเหมือนน้ำแข็ง หรือน้ำคัมข้าว เมื่อแห้งแล้ว แล้วแต่จะปรากฏสัณฐาน การสำคัญว่าลิกนินชนิดใดเล็กละเอียดกลมกว่ากันนั้น ผู้เขียนเสนอว่าข้อนี้จะเป็นการ

สำคัญผิดทั้งสิ้น-หลักฐานสนับสนุนแนวคิดนี้มีดังนี้: ด้วยเหตุว่าลิกนินเหล่านี้แต่เดิมเป็นสารละลาย ลิกนินในตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากการปรับสภาพเพื่อต้องการใช้เซลล์โลส เมื่อทำให้เกิดสภาพ ตกตะกอน เช่น ลด pH จะทำให้สารละลายลิกนินในด่างมีค่าศักย์ซีตา (zeta potential) เพิ่มขึ้น เกิด ตะกอนเบา (floc) เกาะตัวกันมากขึ้น (fluctuation) ค่าศักย์ซีตาจะเพิ่มจากประมาณ -40 mV เข้าใกล้ หรือเข้าสู่ 0 mV ลิกนินจะอยู่ในสภาพแขวนลอย และถูกตกตะกอนทำแห้ง และลิกนินเหล่านี้เอง พร้อมแปรรูปกลับคืนเมื่อให้สภาพต่าง จากรูปที่พึงสังเกตได้จาก FESEM จะกระจายตัวออกจากกัน จากผงที่จับต้องได้เป็นสารแขวนลอย เป็นตะกอนเบาที่เกาะกลุ่มกัน เป็นกลุ่มที่เล็กลงเรื่อยๆ และเป็น สารละลายในระดับโมเลกุลเช่นกัน ในกรณีที่ไม่ได้เริ่มจากการเป็น black liquor จากสารละลายต่าง แต่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น organosolv lignin จากกระบวนการ organosolv pulping process เช่น งานของ Rao et al. (2017) ใช้สารละลาย ethanol/water ได้อธิบายว่าลิกนินมีสภาพที่ชอบน้ำและชอบ ไขมัน (hydrophilic-lipophilic; amphiphilic) ในสารละลาย ethanol/water จะทำให้อนุภาคลิกนินเกิด จากเกาะตัว (agglomeration) เป็นแกรนูล (granulating) โดยหันส่วนที่ชอบน้ำอยู่ที่ผิวของทรง กลม เหมือน โครงสร้างไข่แดงที่หุ้มด้วยเปลือก (yolk-shell structure)

ดังนั้นการตัดสินฐานมวลแห้งของ STD L MAPL และ CPL เช่นนี้ไม่สามารถพิจารณา ใดๆ ได้ หัวข้อนี้จึงเป็นเพียงการรายงานภาพลิกนินที่แห้งจากสภาพต่างๆ ที่กำลังขยายต่างๆ เท่านั้น หากจะเปรียบเทียบกันทางเคมีว่าลิกนินเหล่านี้มีองค์ประกอบต่างกันอย่างไรจึงทำให้จับตัวเป็นรูป ต่างกัน พึงตรวจการตอบสนองด้วยเครื่องมือหรือวิธีการอื่นๆ

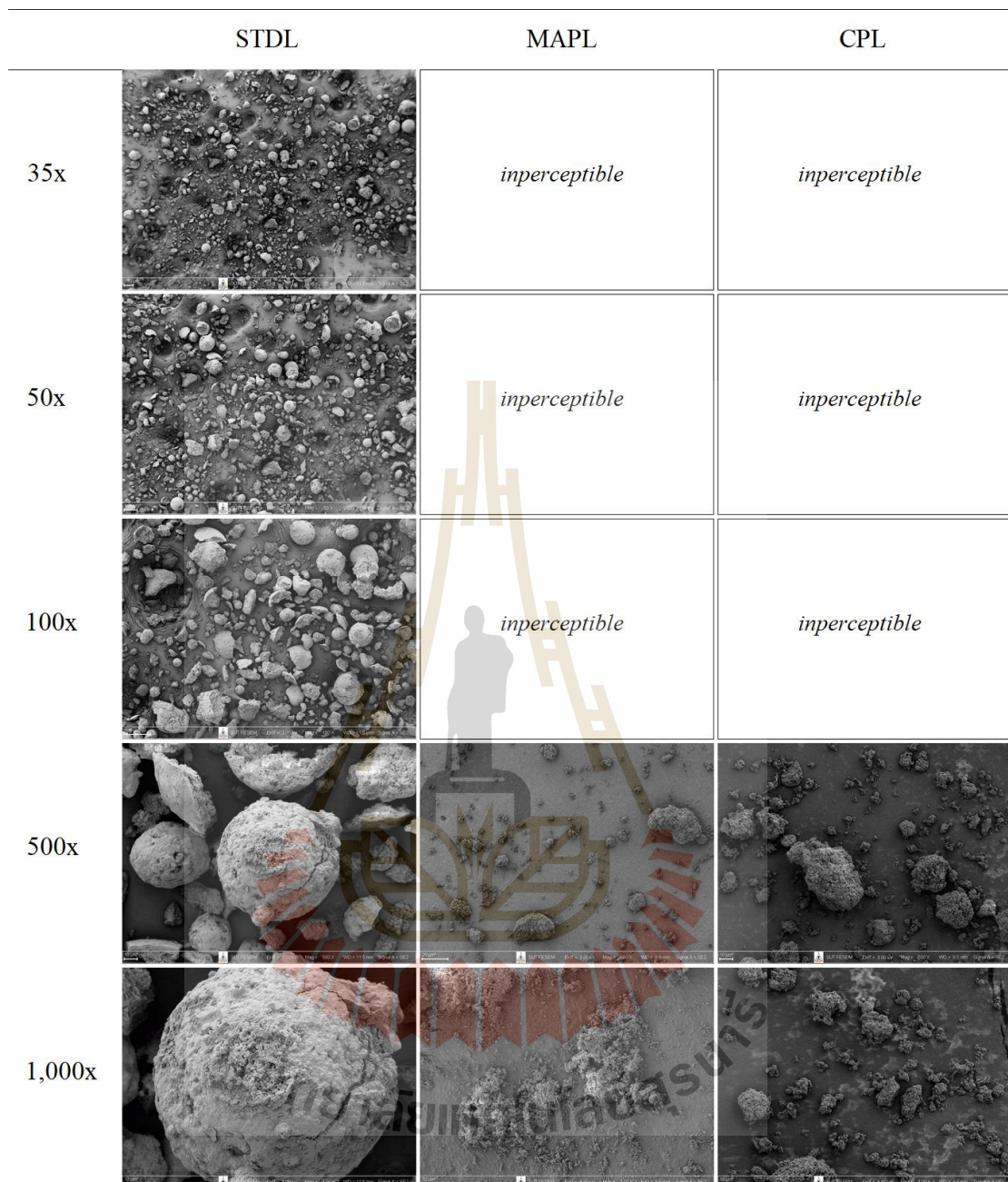
โดยทั่วไปแล้วการศึกษาผ่าน SEM ในลิกนิน ถูกตรวจสอบเพื่อศึกษารูปทรงที่ตั้งใจ สร้างขึ้น เช่นการขึ้นรูปคอลลอยด์ลิกนินขนาดนาโนให้เป็นทรงกลมที่เป็นระเบียบเพื่อเป็นอนุภาค นำส่งยาแบบค่อยๆ ปลดปล่อยตามเวลาหรือเป็นสารตัวพาในสารควบคุมศัตรูพืช มีหลักฐาน สนับสนุนจากรายงานของ Qian et al. (2013) ว่าทรงกลมเหล่านั้นถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการทำให้ คอลลอยด์อยู่ใน tetrahydrofuran (THF) เกิดสภาพชอบ-ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic modification) แล้ว จับตัวเข้าด้วยกัน (colloidization) จากนั้นระเหย THF ออกด้วยเครื่องหมุนระเหยสุญญากาศ

นอกจากนี้หากต้องการทราบว่าลิกนินเหล่านี้ชนิดใดสามารถกระจายตัวสร้างทรง กลมบนผิวฟิล์มกรอง UV ได้ดี ในงานของ Tien et al. (2017) ทำการละลายใน dimethylsulfoxide ให้เป็นอนุภาคไมเซลล์ (micellization, ค่าศักย์ซีตา -35.8 mV) ผ่านเยื่อ dialysis ฯลฯ แล้วตรึงสภาพ ดังกล่าวบนเนื้อฟิล์ม การตัดสินฐานลิกนินบนผิวฟิล์มเช่นนั้นจึงจะมีประโยชน์ เพราะขนาดและการ กระจายตัวอย่างเป็นระเบียบของอนุภาคลิกนินมีผลต่อคุณภาพการกรองแสงของเนื้อฟิล์ม ฯลฯ

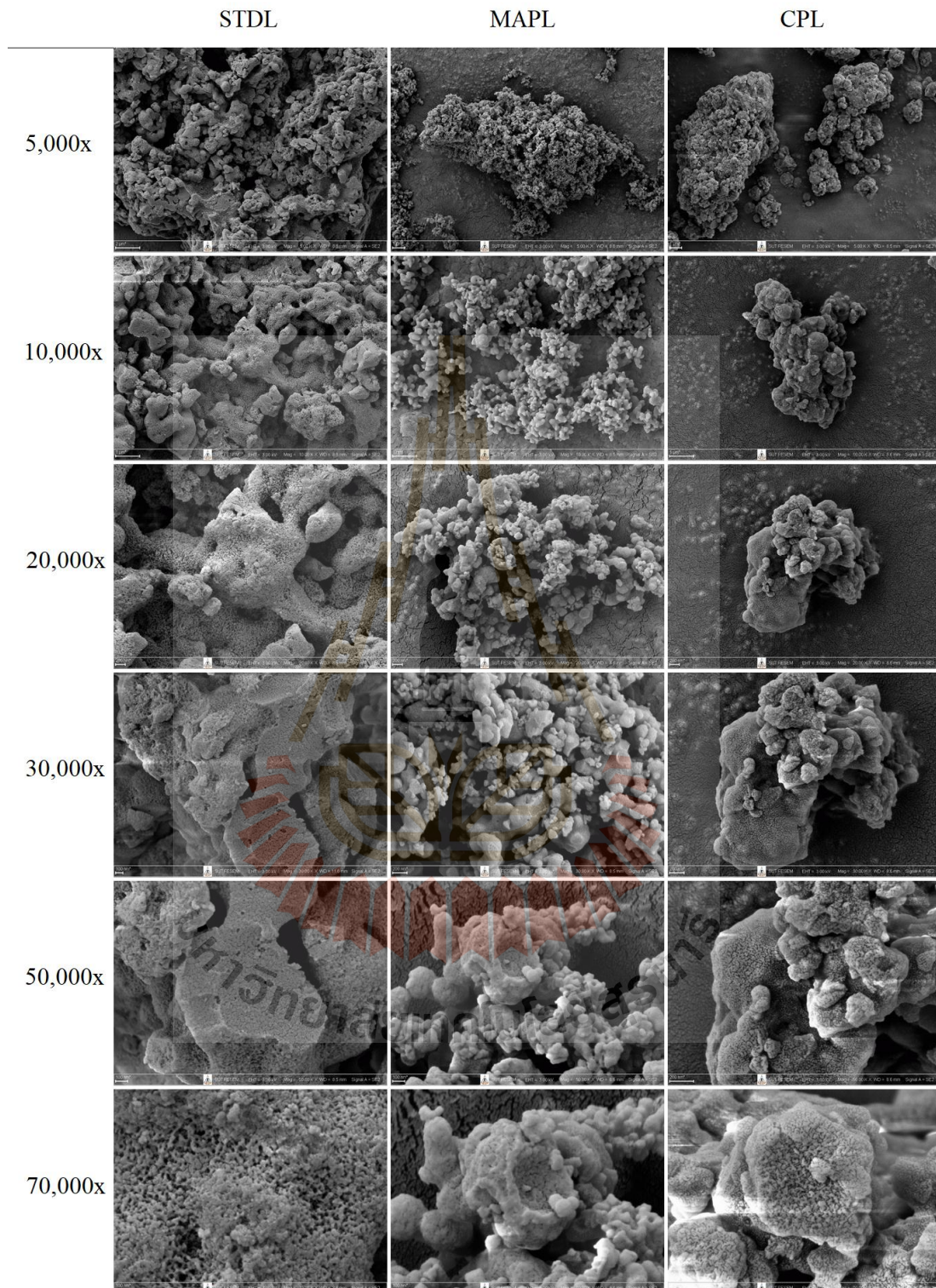
ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีมีความต้องการใช้ลิกนินเพื่อเป็นสารตัวพาแบบค่อยๆ ปลดปล่อยยา, ปุ๋ย, สารควบคุมศัตรูพืช การขึ้นรูปอนุภาคลิกนินในระดับนาโนได้รับความนิยม มากกว่าขนาดไมโคร Beisl et al. (2017) ได้รวบรวมวิธีการขึ้นรูปเพื่อให้ได้ลิกนินขนาดต่างๆ ทั้ง

ไมโครเมตรและนาโนเมตร เช่นใช้อิทธิพลของสภาพไอออนิก (ionic strength) ต่อขนาดอนุภาค ลิกนิน เนื่องจากสภาพไอออนิกมีความสัมพันธ์กับศักย์ซีตาในการแขวนลอยตะกอนเบา (Beisl et al., 2017 อ้าง Richter et al., 2016), กระบวนการแขวนลอยมวลลิกนินในตัวทำละลาย DMF จัดเป็น ละอองพร้อมกับลมไนโตรเจนร้อนแล้วทำแห้ง (aerosol processing) (Beisl et al., 2017 อ้าง Ago et al., 2016), การทำบรรจุภัณฑ์ขนาดนาโน (nanocontainers) โดยเติม ethanol/water ให้เกิด emulsification, เติม horseradish peroxidase เพื่อให้เป็นช่องภายในเปลือกทรงกลม, จากนั้นเติม H_2O_2 ทำให้ aromatic skeleton ของลิกนินเกิดการประสานตัวเป็นเปลือกทรงกลมที่แน่นและเสถียร (crosslinked aromatic skeleton) (Beisl et al., 2017 อ้าง Zhong et al., 2016), การทำให้อนุภาคลิกนิน เป็นแคปซูลขนาดนาโน (nanocapsules via interfacial miniemulsion crosslinking reaction) เพื่อบรรจุ สารที่ hydrophilic ไว้ภายใน (Beisl et al., 2017 อ้าง Chen et al. 2016) ท่านผู้สนใจสามารถเปิด references เพื่อสืบค้นย้อนกลับได้



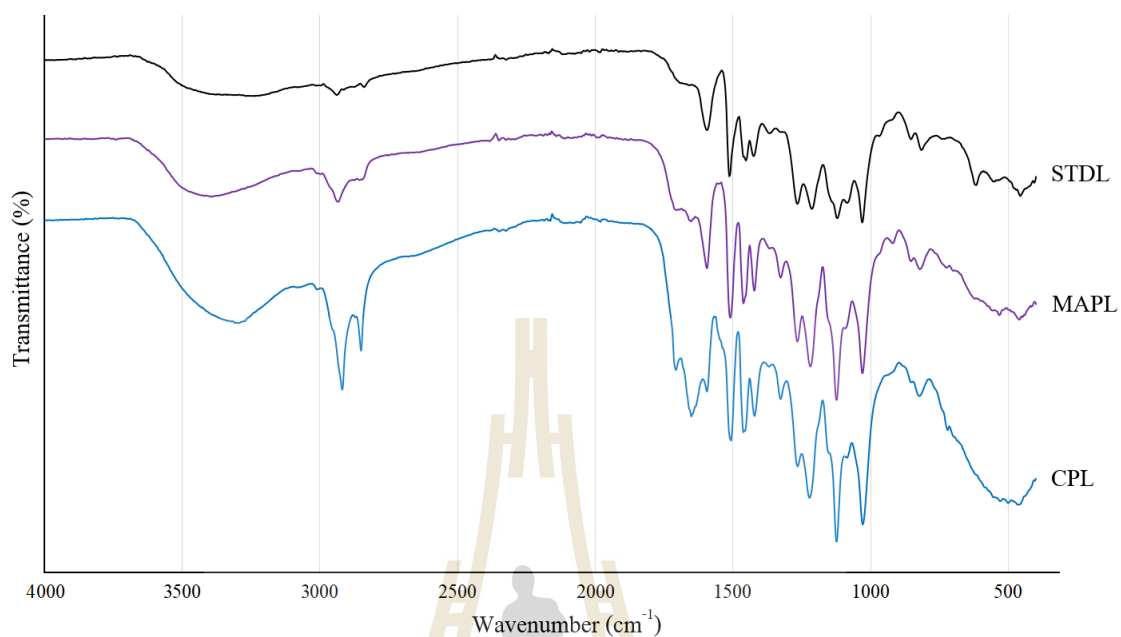


รูปที่ 4.2 STDL MAPL และ CPL ที่กำลังขยาย 35-1,000 เท่า



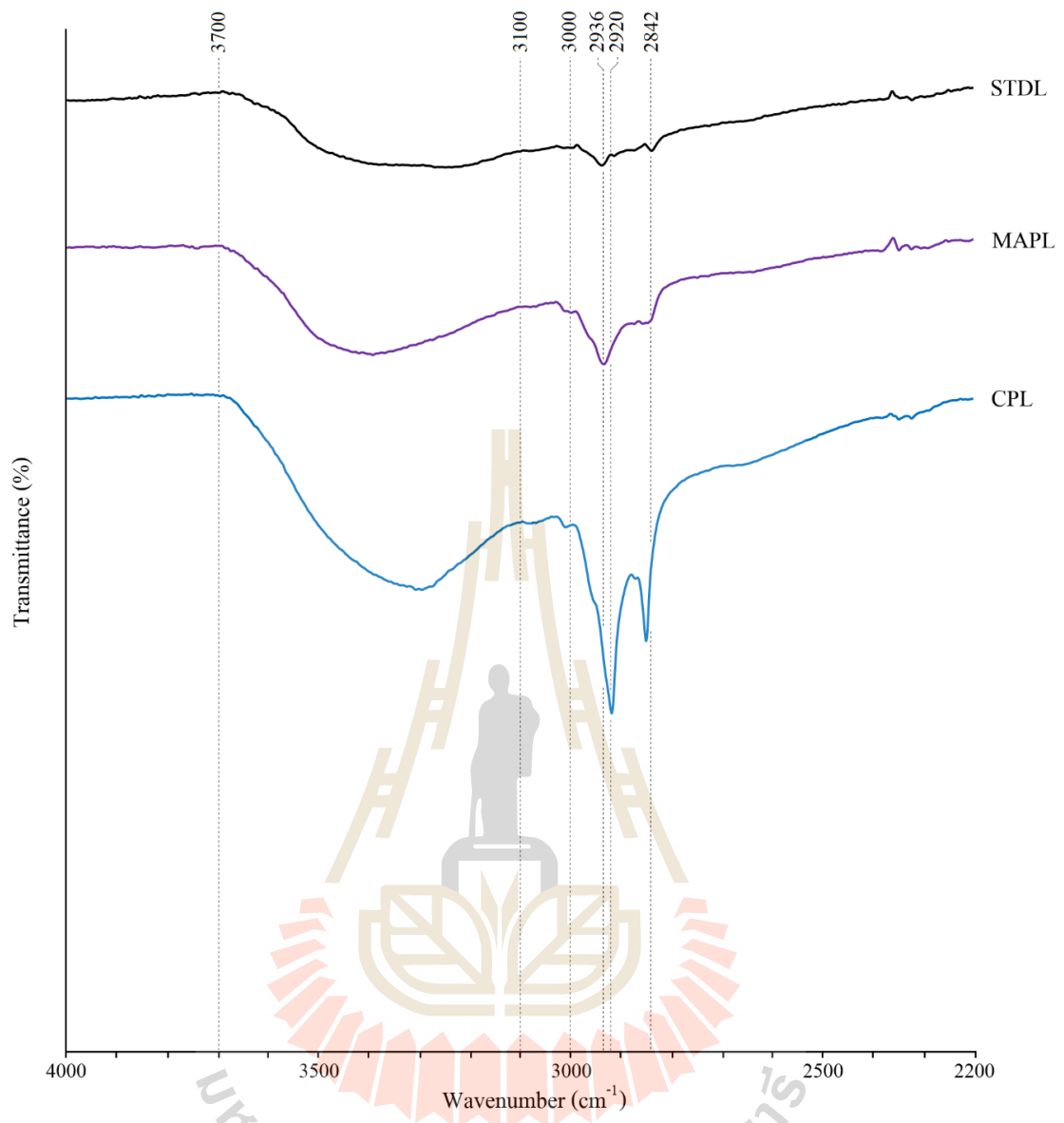
รูปที่ 4.3 STDL MAPL และ CPL ที่กำลังขยาย 5,000-70,000 เท่า

4.5.3 ผลการวิเคราะห์ค่า Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

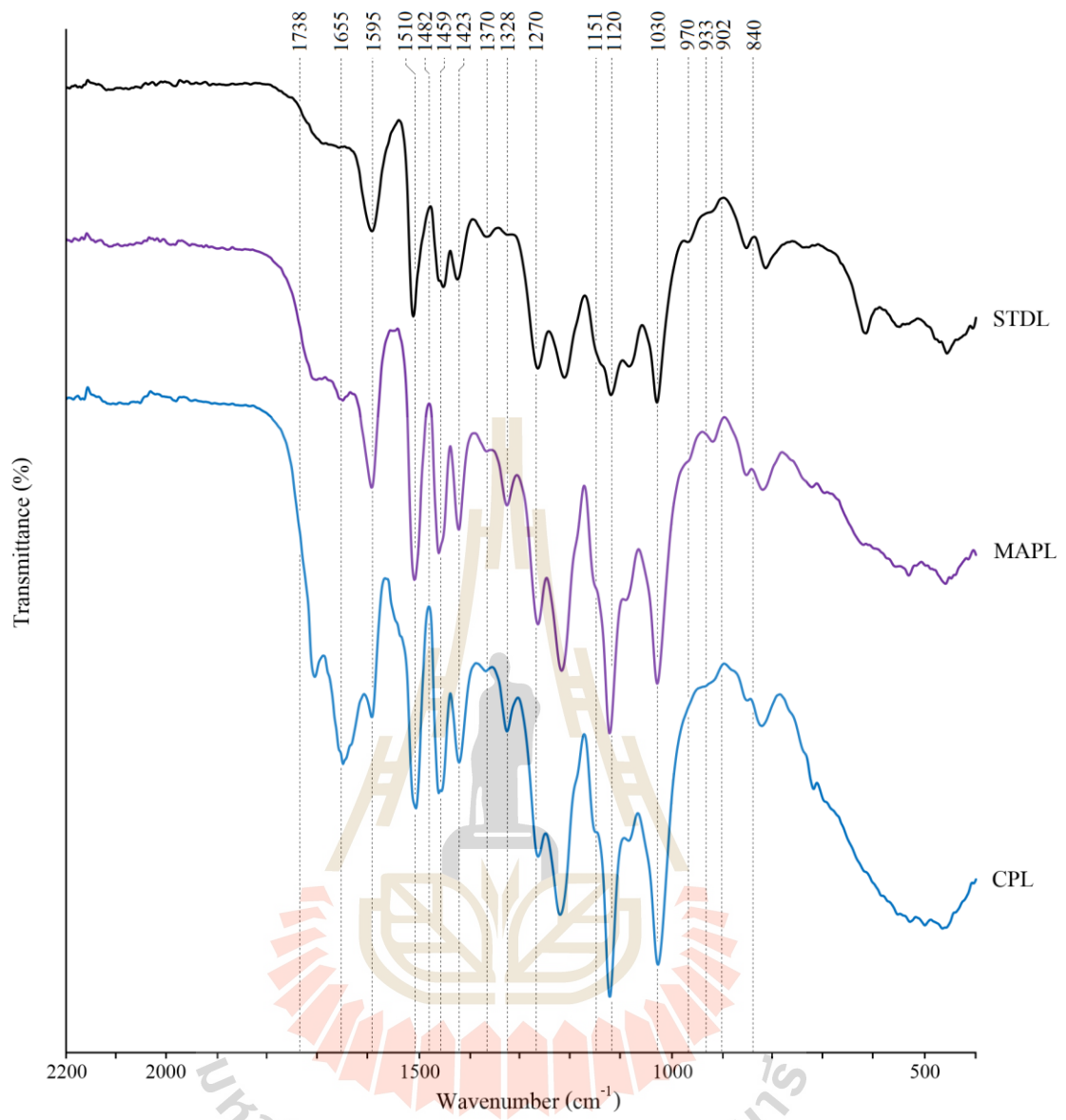


รูปที่ 4.4 ภาพรวมตลอดช่วงสเปกตรัม FTIR ของลิกนินที่ความยาวคลื่น 4000-400 cm⁻¹

เพื่อให้สามารถสังเกตรายละเอียดของเส้นสเปกตรัมได้ จะทำการตัดภาพเป็น 2 ช่วง ตั้งแต่ 4000-2200 cm⁻¹ และ 2200-400 cm⁻¹ ดังรูปที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 สเปกตรัม FTIR ของดิกนินช่วงความยาวคลื่น 4000-2200 cm⁻¹



รูปที่ 4.6 สเปกตร้า FTIR ของดิกนินช่วงความยาวคลื่น 2200-400 cm⁻¹

ตารางที่ 4.1 หมู่ฟังก์ชันหรือสารประกอบที่ FTIR สามารถตรวจวัดได้

Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional groups or compounds	References ⁽¹⁾
~3700-3100	Hydrophilic tendency -OH groups	[1]
~3000-2842	C-H stretch in methyl and methylene groups	[2], [3]
~2936	C-H bending vibration in methyl and methylene groups	[4], [5], [6], [7]
~2920	Carboxylic OH	[8]
~1738-1655, 1738-1708	Carbohydrates corresponding to C=O stretching	[2], [9]
~1595	C-C stretching in aromatic skeleton S>G	[3], [6], [10], [11]
~1514	Aromatic skeleton vibration	[4], [5], [6], [7], [9], [12], [13], [14]
~1510	a) Aromatic skeleton vibration; b) Aromatic skeletal vibrations (G>S)	[9], [10], [15]; [3], [11]
~1505	Aromatic skeleton vibration	[2], [4], [9], [16], [17]
~1482	S, G monolignols ring skeleton vibrations	[18]
~1459	Aromatic skeletal vibrations and the C-H (methyl or methylene groups) asymmetric deformation combined with aromatic ring vibration	[3], [4], [5], [6], [10], [13], [16], [17]
~1423	Aromatic skeleton vibration	[3], [4], [6], [7], [9], [10], [11], [13], [14], [17]
~1370	Bending vibration of -OH bonds, phenolic groups	[4], [6], [16]
~1328	a) C-O stretching with aromatic S units	[2], [4], [6], [7], [9], [10], [11], [12];
~1328	b) S or G rings	[3], [5], [17]
~1270	G ring breathing with C-O stretching	[5], [6], [7], [9] [11], [14], [16], [17]

ตารางที่ 4.1 หมู่ฟังก์ชันหรือสารประกอบที่ FTIR สามารถตรวจวัดได้ (ต่อ)

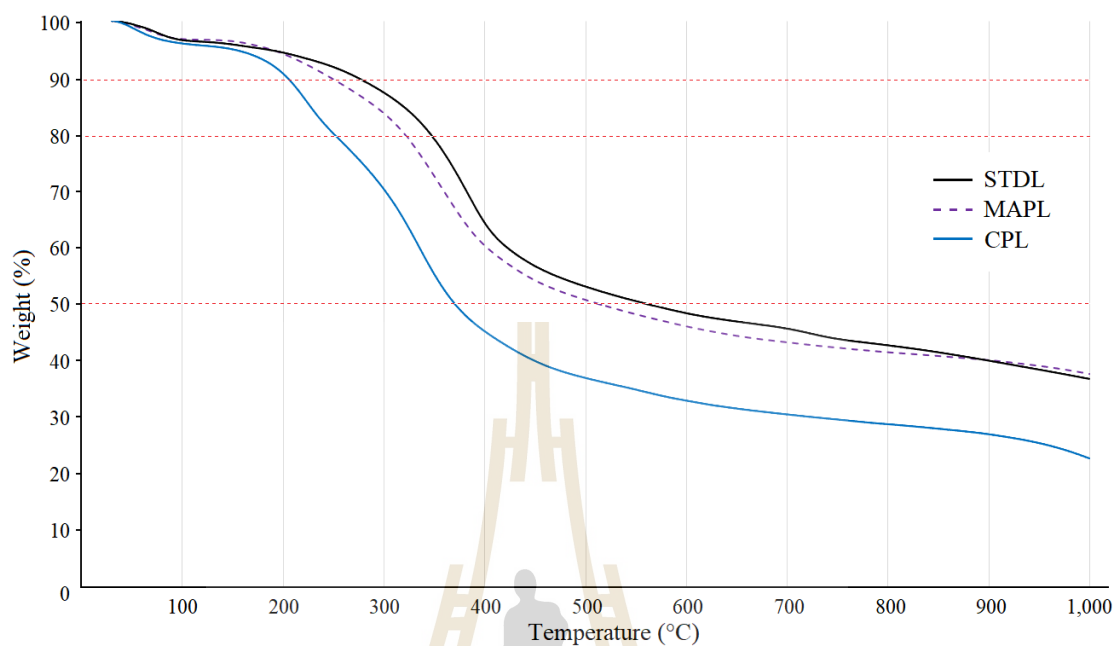
Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional groups or compounds	References ⁽¹⁾
~1151	a) C-H stretching vibration in guaiacol rings; b) C-O-C stretching aromatic ether	[5]; [6]
~1120	a) C-H in-plane deformation vibration: G unit; b) Unmistakable sign of a GS lignin; c) S units d) Carbon ring stretching of cellulose	[6]; [17]; [3], [7], [11], [15]; [9]
~1030	a) C-O (H) stretching in first order aliphatic OH, an indicative of hemicellulose impurities	[2], [6], [9], [10], [16]
~1030	b) Aromatic C-H in-plane deformation vibrations (G>S); c) G units	[3], [10]; [11]
~970	C-C out-of-plane deformation vibration, CH=CH	[6]
~933	C-H in-plane deformation	[18]
~902	C-H out-of-plane bending vibration	[18]
~840	C-H deformation and ring vibration	[16]

⁽¹⁾ [1] Priya et al. (2015); [2] Nadji et al. (2009); [3] Monteil-Rivera et al. (2013);
[4] García et al. (2010); [5] Hua et al. (2016); [6] Khaldi-Hansen et al. (2016);
[7] Menezes Nogueira et al. (2019); [8] Lu et al. (2017); [9] Zhang et al. (2015);
[10] Michelin et al. (2018); [11] Ramakoti et al. (2019); [12] Dos Santos et al. (2014);
[13] Kent et al. (2018); [14] Ying et al. (2018); [15] An et al. (2017);
[16] Jingjing (2011); [17] Wen et al. (2013)b; [18] Ajjan et al. (2012)

ความเด่นชัดของยอดกราฟที่ตำแหน่ง $3700-3100\text{ cm}^{-1}$ -OH groups อันแสดงถึงสภาวะชอบน้ำ (Priya et al., 2015) และการมีอยู่ของคาร์โบไฮเดรตคือเซลลูโลสหรือไซแลนที่ $1738-1655, 1738-1708\text{ cm}^{-1}$ (Nadji et al., 2009; Zhang et al. (2015) ในลิกนินทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลของ HSQC NMR ขณะที่ยอดกราฟ ณ ตำแหน่ง 1370 cm^{-1} แสดงการสั่นของหมู่ -OH bonds และสารประกอบ phenolic groups (García et al., 2010; Jingjing, 2011; Khaldi-Hansen et al., 2016) พบความเด่นชัดเฉพาะในลิกนิน STDL นอกจากนี้ ยอดกราฟที่ตำแหน่งแสดงหมู่ guaiacyl $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$ (Jingjing, 2011; Wen et al, 2013b; Zhang et al., 2015; Hua et al., 2016; Khaldi-Hansen et al., 2016; Ying et al., 2018; Menezes Nogueira et al., 2019; Ramakoti et al., 2019) ใน STDL และ MAPL มีความเด่นชัดของเส้นยอดกราฟใกล้เคียงกัน และมากกว่า CPL

จากสเปกตรัมพบว่าหมู่ฟังก์ชันของลิกนินแต่ละชนิดตอบสนองต่อคลื่น FTIR ในลักษณะที่แตกต่างกันไป มาก-น้อยบ้าง และจากการศึกษารายงานจำนวนมาก พบว่าบางตำแหน่งของรายงานที่ได้ทำการศึกษา ให้ระบุสารประกอบไว้แตกต่างกันเช่นที่ตำแหน่ง $1328, 1120\text{ cm}^{-1}$ บ้างให้ความเห็นว่าเป็นสเปกตรัมของหมู่ syringyl, บ้างว่าเป็นสเปกตรัมของหมู่ guaiacyl, บ้างว่าเป็นสเปกตรัมของทั้งสองอย่างไว้ก็ดี ลิกนินทั้ง 3 ชนิด สามารถพบทั้ง methyl, methylene, hydroxyl, aromatic syringyl, guaiacyl, และอาจพบ carbohydrate impurity ที่ยังเชื่อมติดกับโครงสร้างโมเลกุลของลิกนินบางตำแหน่ง จึงสรุปได้ว่าลิกนินจากเหง้ามันสำปะหลัง MAPL และ CPL ที่สกัดได้ มีสมบัติความเป็นลิกนินอย่างแท้จริง เพราะมีหมู่ฟังก์ชันและสารประกอบแสดงความเป็นลิกนินเทียบเคียงได้กับลิกนินมาตรฐาน STDL และรายงานวิจัยฉบับต่างๆ โดยหมู่ฟังก์ชันที่ตรวจได้จากลิกนินทั้ง 3 นี้เป็นองค์ประกอบของ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, และ sinapyl alcohol อันเป็นส่วนประกอบของมหโมเลกุลลิกนินในพืช (Cheng et al., 2014; Stark et al., 2015; Chaudhary and Dhepe, 2016, Guo et al., 2019)

4.5.4 ผลการวิเคราะห์การสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA)



รูปที่ 4.7 ร้อยละการลดลงของมวลของลิกนินเมื่อได้รับความร้อนในบรรยากาศไนโตรเจน

ตารางที่ 4.2 อุณหภูมิที่ลิกนินทั้ง 3 ชนิด สลายตัวไป 10, 20, และ 50% โดยน้ำหนัก

Treatments ⁽¹⁾	T10% (°C) ⁽²⁾	T20% (°C) ⁽³⁾	T50% (°C) ⁽⁴⁾
STDL	273.50±1.67 ^c	346.28±1.08 ^c	561.39±12.42 ^c
MAPL	246.94±7.29 ^b	320.44±3.38 ^b	513.28±37.07 ^b
CPL	204.11±1.80 ^a	250.50±1.89 ^a	371.50±7.99 ^a

⁽¹⁾ STDL, MAPL และ CPL แสดงถึงลิกนินมาตรฐาน, ลิกนินจากเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะเหมาะสมที่สุดด้วยไมโครเวฟ (840 W, 9 min, 3% NaOH), และเหง้ามันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะเหมาะสมที่สุดด้วยความร้อนโดยวิธีการดั้งเดิม (900 W, 15 min, 5% NaOH) ตามลำดับ

^{(2), (3), (4)} T_n% แสดงอุณหภูมิขณะที่มวลเหง้ามันสำปะหลังสลายตัวไป 10, 20, และ 50% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างระหว่างสภาวะการปรับสภาพ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละของมวลคงเหลือที่อุณหภูมิ 800 และ 1000°C

% Solid residue	800°C, (%)	1,000°C, (%)
STDL	42.69±0.81 ^b	36.75±0.89 ^b
MAPL	41.48±1.94 ^b	37.64±3.03 ^b
CPL	28.76±0.57 ^a	22.70±1.96 ^a

ค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างของมวลคงเหลือ ($p < 0.05$) ที่ 800°C และ 1000°C

STDL และ MAPL มีช่วงอุณหภูมิหลักในการสลายตัว 355-400°C และ 335-385°C ตามลำดับ ที่ 800°C มี % solid residue = 42.69±0.81 และ 41.48±1.94 ตามลำดับ และที่ 1,000°C มี % solid residue = 37.64±3.03 และ 36.75±0.89 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้อุณหภูมิหลักในการสลายตัวของลิกนิน STDL และ MAPL สอดคล้องกับรายงานของ Khaldi-Hansen et al. (2016) ที่กล่าวถึงอุณหภูมิสลายตัวของลิกนินที่ได้จากการปรับสภาพไม้ beechwood ด้วยวิธี organosolv ว่าปรากฏในช่วง 340-380°C ซึ่งอุณหภูมิหลักในการสลายตัวขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของลิกนิน

ขณะที่ CPL มีช่วงอุณหภูมิหลักในการสลายตัวกว้าง ตั้งแต่ 200-370°C เส้นกราฟการลดลงของน้ำหนักลิกนิน CPL เมื่อได้รับความร้อนมีลักษณะเหมือนเส้นกราฟการวิเคราะห์ TGA ของลิกนินที่ได้จาก wheat straw, pine straw, alfalfa, และ flax fiber ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งปรับสภาพด้วย formic acid/acetic acid mixture 70:30 v/v อัตราส่วนมวลชีวภาพแห้ง:สารละลาย = 1:8 เตือบน hotplate เป็นเวลา 2 h ตามด้วย peroxyformic acid/ peroxyacetic acid 80°C เป็นเวลาอีก 2 h ในงานของ Watkins et al. (2015) นอกจากสอดคล้องด้านลักษณะกราฟและช่วงอุณหภูมิหลักในการสลายตัวแล้ว ลิกนิน CPL ที่อุณหภูมิ 800°C มี % solid residue = 28.76±0.57 สอดคล้องกับลิกนินจาก pine straw ของ Watkins et al. (2015) ซึ่งมี % residue 800°C = 29.45±0.94; และที่ 1,000°C CPL มี % solid residue = 22.70±1.96

จากกราฟ TGA เมื่อพิจารณาลิกนิน MAPL และ CPL จะเห็นว่าวัตถุดิบชนิดเดียวกัน (เหง้ามันสำปะหลัง อายุ, พันธุ์, พื้นที่ปลูก, บุคคลผู้เตรียมวัตถุดิบ และวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบเดียวกัน) เมื่อผ่านการปรับสภาพโดยความเข้มข้นของด่าง NaOH, รูปแบบการให้ความร้อน, และระยะเวลาที่ใช้ปรับสภาพแตกต่างกัน จะส่งผลต่อสมบัติการสลายตัวทางความร้อนของลิกนินที่ได้เป็นอย่างมาก

4.5.5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.5.5.1 Total phenolic content (TPC)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ STDL MAPL CPL มีค่า 174.24±12.81, 171.87±11.35 และ 65.47±2.29 ตามลำดับ ในหน่วย mg GAE/g lignin หรืออาจแปลงค่าเพื่อสะดวกต่อการหาข้อมูลอ้างอิงในงานวิจัยอื่นได้ เท่ากับ 1.02±0.08, 1.01±0.07 และ 0.38±0.01 ตามลำดับ ในหน่วย mmol GAE/g lignin

ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของลิกนินทั้ง 3 ชนิดในหน่วย mg GAE/g lignin และ mmol GAE/g lignin

Lignin samples	Total phenolic content (mg GAE/g lignin)	Total phenolic content (mmol GAE/g lignin)
STDL	174.24±12.81 ^b	1.02±0.08 ^b
MAPL	171.87±11.35 ^b	1.01±0.07 ^b
CPL	65.47±2.29 ^a	0.38±0.01 ^a

ค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสมรภ์แสดงถึงความแตกต่าง (p<0.05)

Ramakoti et al. (2019) สกัดไม้ไผ่แห้งผง 50 meshscreen ในสักรดอินทรีย์ (70:30 v/v ratio of formic acid/acetic acid) ความเข้มข้น 84% 1:20 w/v ratio of solid: solvent ต้มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 h กรองแล้วนำสารน้ำดังกล่าวตกตะกอนโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 เท่า ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ pH 2 ปั่นเหวี่ยงเพื่อรวมตะกอนลิกนิน แล้วอบแห้งตะกอนดังกล่าว ลิกนินจากการปรับสภาพด้วยกรดอินทรีย์ชนิดนี้ Ramakoti et al. ให้ชื่อว่า UTL, จากนั้นแยกเกรด (fractionate) ด้วย EtOH ส่วนที่ละลายใน EtOH นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เรียกลิกนิน ETL, ส่วนที่ไม่ละลายใน EtOH นำไปละลายในอะซิโตน ส่วนที่ละลายในอะซิโตน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน เรียกลิกนิน ATL ส่วนที่ไม่ละลายในอะซิโตน เรียก UDL-วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของลิกนินแต่ละชนิดพบว่า ATL ให้ปริมาณ TPC สูงที่สุด 174.45±1.3 mg GAE/g lignin ซึ่งเป็นปริมาณใกล้เคียงอย่างยิ่ง กับ STDL Sigma-Aldrich ในงานวิจัยนี้ (174.24±12.81 mg GAE/g lignin) ตามด้วย ETL, UTL และ UDL: 158.8, 148.5, 94.3 mg GAE/g lignin ตามลำดับ นอกจากนี้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของลิกนิน STDL Sigma-Aldrich ในงานวิจัยนี้ยังได้ค่าใกล้เคียงกับลิกนินต่างประเทศซัลเฟตต่ำ (low sulfate content,

alkali lignin) Sigma-Aldrich เกรดการค้า จากรายงานของ Dong et al. (2011) มีค่า 165.50 ± 13.40 mg GAE/g lignin

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของลิกนินจากเหง้ามันสำปะหลัง CPL มีค่า 65.47 mg GAE/g lignin มากกว่างานของ Qazi et al. (2017) ที่ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากไฟโรไลติกลิกนินสูงสุด 50 mg GAE/g lignin เล็กน้อย

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเหง้ามันสำปะหลัง CPL ใกล้เคียงกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากเปลือกไม้สนสกัดด้วยกรรมวิธี Soxhlet ด้วยน้ำ, เอทานอล, และน้ำ/เอทานอล (50.09, 63.38 และ 73.48 mg GAE/g DM) ในงานของ Vieito et al. (2018)

แต่ทั้ง STDL และ MAPL (174.24 และ 171.88 mg GAE/g lignin) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใกล้เคียงกับลิกนินดิบ EHL (177.39 ± 0.39 mg GAE/g lignin) (คูตารางภาคผนวกที่ ก.1) จากการระเบิดไอน้ำต่อซังข้าวโพดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายในสภาพคลื่นเสียงความถี่สูงในงานของ An et al. (2017) และหากต้องการแปรรูป MAPL ให้ได้ลิกนินที่ปริมาณ TPC สูงขึ้น สามารถทำได้โดยนำ MAPL ไปสกัดลำดับส่วนในขั้นต่อไปด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาพคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อให้ได้ลิกนินที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสม- หากว่าตามงานของ An et al. (2017) คือการสกัดด้วย dichloromethane ตามด้วย acetic ether

ขณะที่ Faustino et al. (2010) ได้รายงานช่วงค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลิกนินจาก black liquor ที่กว้างมากสำหรับลิกนินสกัดรวม (crude extracts) และลิกนินที่แยกลำดับส่วนแล้ว (separated fraction) โดยมีค่าเท่ากับ 92.7-181.6 และ 91.6-1099.6 mg GAE/g ตามลำดับ นั้นหมายถึงทั้งลิกนิน STDL และ MAPL (174.24 และ 171.88 mg GAE/g lignin) ได้ช่วงค่าที่สอดคล้องกับลิกนินสกัดรวมตามที่นักวิจัยท่านอื่นได้รายงานไว้

Stankovic' et al. (2016) ได้ทำการสกัดสมุนไพรดอกหอม 8 ชนิด (80% methanol 40kHz Ultrasonic bath 25°C 30 min) พบว่าสารสกัดมีปริมาณโพลีฟีนอลในช่วง 70-170 mg GAE/g dry extract โดยสารสกัดจากดอก *A. crithmifolia* มีปริมาณโพลีฟีนอลสูงสุด ซึ่งใกล้เคียงกับ MAPL และ STDL อย่างยิ่ง

Sipponen et al. (2018) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในลิกนินอนุภาคนาโน โดยตัดแปลงวิธีการวัดค่าให้เหมาะสมกับงานของตน พบว่าลิกนินอนุภาคนาโนที่ได้จากการกระจายตัวในระบบเอทานอล-น้ำ ได้ค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดถึง 1.11 mmol GAE/g lignin เมื่อใช้กรดแกลลิกเป็นสารเทียบสมมูล, ซึ่งเป็นค่าที่สูงได้มากกว่า STDL (1.02 mmol GAE/g lignin ได้ตั้งสมมติฐานของตารางดังกล่าว)

Molina-Cortés et al. (2019) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ molasses และ vinasse ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอ้อย พบว่าค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ molasses มีค่าในช่วง

14-19 mg GAE/g DM ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกันกับปริมาณ TPC ของ cucumbers, parsley, bellpepper และ carrot (18.8-21.0 mg GAE/g DM) และ vinasses มีค่า TPC ประมาณ 52 mg GAE/g DM ซึ่งใกล้เคียงกับ basil, spinach และ apples (51.4-53.5 mg GAE/g DM) ในงานของ Chandra et al. (2014) และ Lutz et al. (2015) ซึ่งทั้งสิ้นนี้ต่ำกว่าค่า TPC ของลิกนินทั้ง 3 ประเภท; แต่หากเป็นผล blueberries และ blackberries จะมีค่า TPC อยู่ระหว่าง 67.1-126.3 mg GAE/g DM (Lutz et al 2015) ซึ่งสูงกว่าค่า TPC ของ CPL แต่ยังคงต่ำกว่า MAPL และ STDL

4.5.5.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนิน โดยรีดิวซ์ DPPH และ ABTS (DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ตามลำดับ) ในหน่วย mg TEAC/g lignin

Lignin samples	DPPH _{AA} (mg TEAC/g lignin)	ABTS _{AA} (mg TEAC/g lignin)
STDL	310.83±16.27 ^c	676.25±0.72 ^c
MAPL	267.32±1.68 ^b	545.56±2.76 ^b
CPL	146.23±16.09 ^a	173.29±5.53 ^a

ค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่าง (p<0.05)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนิน โดยรีดิวซ์ DPPH และ ABTS (DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ตามลำดับ) ในหน่วย µM TEAC/g lignin

Lignin samples	DPPH _{AA} (µM TEAC/g lignin)	ABTS _{AA} (µM TEAC/g lignin)
STDL	1241.84±65.01 ^c	2701.84±2.89 ^c
MAPL	1068.04±6.72 ^b	2179.66±11.03 ^b
CPL	584.24±64.30 ^a	692.36±22.11 ^a

ค่าดังกล่าวเป็นค่าเฉลี่ยจากข้อมูลจำนวน 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ตัวอักษรยกที่ปรากฏบนค่าในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่าง (p<0.05)

Qazi et al. (2017) วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไฟโรไลติกลิกนินด้วยการรีดิวซ์ ABTS เมื่อใช้โทรล็อกซ์เป็นสารเทียบสมมูลพบว่าไฟโรไลติกลิกนินบางชนิดมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงได้ถึง 280 mg TEAC/g lignin ซึ่งเป็นช่วงค่าระหว่าง MAPL และ CPL ของงานวิจัยนี้,

แต่สำหรับ DPPH assay Qazi et al., (2017) ใช้วิตามินซีเป็นสารเทียบสมมูล จึงไม่ได้นำมาเทียบปริมาณกับงานวิจัยนี้ได้

Guo et al. (2019) วิเคราะห์ DPPH_{AA} ในลิกนินโดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารเทียบสมมูล พบว่าลิกนินทั้ง 5 ประเภท ได้แก่ DES lignin (130°C 3 h ตั้งด้วย acetone:water 1:1 v/v), Hydrotrope lignin (30% sodium salicylate + 0.17 % formic acid), Kraft lignin (Sigma-Aldrich), Organosolve lignin (EtOH + water 50:50 w/w + 1% H₂SO₄) และ Soda/AQ lignin (14% sodium carbonate + 0.1% anthraquinone) (อันดับที่ 1, 2, 4, 5 สกัดจากไม้ poplar ผ่านการปรับสภาพเบื้องต้นด้วยไอน้ำฯ รายละเอียดการสกัดสามารถสืบค้นกลับใน Guo et al., 2019) มีค่า DPPH_{AA} เท่ากับ 683±20, 910±30, 1050±5, 1265±30, 1382±60 µM TEAC/g lignin ตามลำดับ (ค่าของลิกนินอันดับที่ 2-4 และระยะเวลาความคลาดเคลื่อน ได้จากการคำนวณเทียบระยะเวลาสเกลจากกราฟแท่ง) ซึ่งค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ MAPL จากเหง้ามันสำปะหลังและ STDL ในงานทดลองนี้ (1068, 1242 µM TEAC/g lignin) มีค่าใกล้เคียงกับ Kraft lignin และ Organosolve lignin (1050, 1265 µM TEAC/g lignin) ตามลำดับ

สำหรับค่าการต้านอนุมูลอิสระของ MAPL เทียบเคียงได้กับค่าการต้านอนุมูลอิสระจากดอกหมู่ต้นผี *P. suffruticosa* (ดอกพืชในสกุลโบตัน) ซึ่งต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดในกลุ่มดอกไม้จีนที่บริโภคได้ (common edible flowers) 10 ชนิดที่ Xiong et al. (2014) เลือกรวบรวม โดยให้ค่า DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} เท่ากับ 1,028 และ 2,065 µM TEAC/g dry weight ตามลำดับ

ในงานของ Lutz et al. (2015) ได้วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารเทียบสมมูลพบว่า spinach, eggplant, blueberry และ blackberry มีค่า DPPH_{AA} = 537.1, 543.3, 589.2, และ 1203.8 µM TEAC/g dry weight ตามลำดับ ในการนี้ ผล blueberry แห่งนี้มีค่า DPPH_{AA} ที่ใกล้เคียงกับลิกนิน CPL และ blackberry แห่งนี้มีค่า DPPH_{AA} สูงกว่า MAPL แต่ต่ำกว่า STDL เพียงเล็กน้อย

Teixeira et al. (2017) สกัดพืชสมุนไพรของบราซิล 10 ชนิดด้วยวิธีการหมักแช่หมัก (maceration) ใน 50% เอทานอล เป็นเวลา 7 วัน แล้วศึกษาศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารเทียบสมมูล พบว่าค่า ABTS_{AA} มีช่วงความแตกต่างกันกว้างมาก ตั้งแต่ 220 µM TEAC/g extract จากสารสกัดใบ *A.oleracea* และอาจมากถึง 7,020 µM TEAC/g จากเปลือกลำต้นของ *B. tomentosa*, โดยค่า ABTS assay ของสารสกัดจากใบ *L. sidoides* (thymol) และ *L. sidoides* (carvacrol) (2404, 3370 µM TEAC/g extract) มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดลิกนิน MAPL และ STDL (2180, 2702 µM TEAC/g lignin)

ด้วยวิธีการวัด DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} มีวิธีการวัดที่หลากหลาย ยังไม่มีการยอมรับมาตรฐานร่วมกันในการวิจัย ดังนั้นการรายงานสารต้านอนุมูลอิสระของผู้วิจัยท่านอื่นๆ จึงมีวิธีการวัดหลาย

ประเภท แต่ละประเภทอ้างตามวิธีการ และ/หรือ คัดแปลงสถานะตามที่ผู้วิจัยท่านนั้น ๆ เชื้อถื้อ และ แต่ละแบบถูกศึกษาในส่วนของพืชต่างชนิดและผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการที่ต่างกัน (พบรายงาน จำนวนมากที่ศึกษาสารสำคัญในสมุนไพรและผลไม้, พบน้อยที่จะทำการตรวจวัดในลิกนิน) สาร เทียบสมมูลที่ใช้วัดก็แตกต่างกัน จึงปรากฏช่วงค่าที่หลากหลายยากที่จะใช้เปรียบเทียบเข้าเกณฑ์ เดียวกัน กล่าวคือเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบความสอดคล้องหรือแตกต่างกันในรายงานแต่ละท่าน ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการเทียบความสามารถของลิกนินกับลิกนินที่ผ่านกรรมวิธีและวิธีการ ตรวจวัดในลักษณะเดียวกัน อย่างไรก็ตาม มีวิธีการแสดงผลอีกรูปแบบหนึ่งซึ่งไม่ต้องขึ้นกับการวัดค่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS จากวิธีการที่ หลากหลายของนักวิจัยท่านอื่น ๆ, ผู้วิจัยจะแสดงค่า TPC, DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ของลิกนินตัวอย่าง MAPL และ CPL โดยเทียบสัมพันธ์กับค่า TPC, DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ของ STDL (เป็นการ เปรียบเทียบความสามารถของลิกนินวิจัย 2 ชนิดกับลิกนินมาตรฐานภายในงานของตนเอง) เมื่อ กำหนดให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ STDL เป็น 100% ดังตารางที่ 4.7

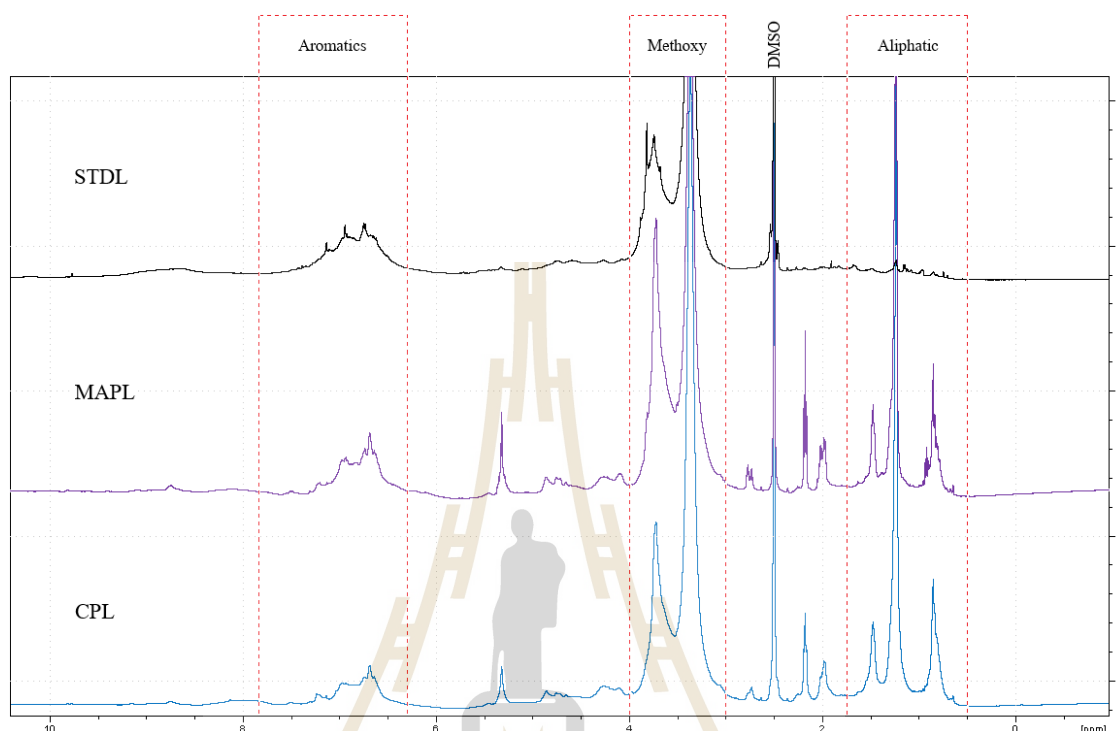
ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนิน MAPL และ CPL เมื่อเทียบกับลิกนินมาตรฐาน STDL เป็นร้อยละ

Lignin samples	TPC of lignin sample, relative on STDL (%)	DPPH _{AA} of lignin sample relative on STDL, (%)	ABTS _{AA} of lignin sample, relative on STDL, (%)
STDL	100	100	100
MAPL	98.64±6.51	86.00±0.54	80.67±0.41
CPL	37.86±1.23	47.05±5.18	25.63±0.82

รายงานค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของลิกนิน STDL MAPL และ CPL มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรง กล่าวคือ เพื่อปริมาณ TPC เพิ่มขึ้น จะมีผล ต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีค่าสหสัมพันธ์ Pearson's correlation ระหว่าง TPC กับ DPPH assay และ TPC กับ ABTS assay เท่ากับ 0.970** และ 0.967** สอดคล้องกับงานของ Djeridane et al. (2006) ซึ่งศึกษารประกอบฟีนอลิกและตรวจวัด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพร 11 ชนิด ของอัลจีเรีย พบว่ามีค่าสหสัมพันธ์ ระหว่าง TPC กับความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS เท่ากับ 0.793, และในงานของ Vieito et al. (2018) ศึกษารประกอบฟีนอลิกและตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกไม้สน (แต่รายงานในรูปแบบของกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น) พบว่ามีค่าความสัมพันธ์ร่วม 0.983

4.5.6 ผลการวิเคราะห์ NMR

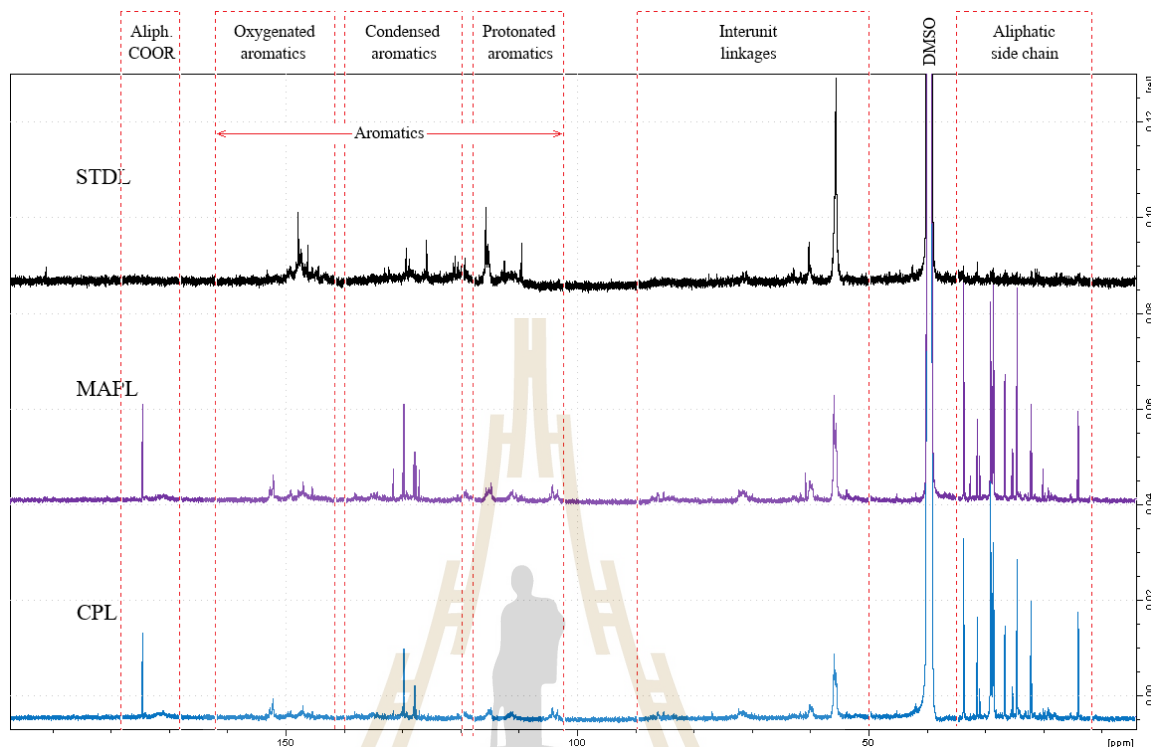
4.5.6.1 ^1H -NMR



รูปที่ 4.8 ^1H -สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ STDL, MAPL และ CPL

อ้างอิงตามสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของโปรตอนในรายงานของ An et al. (2017) ดังตารางภาคผนวกที่ ก.2 ลิกนินทั้ง 3 ชนิด พบสัญญาณของ aromatic proton (δ_{H} 7.54 ppm) ของหน่วย p-hydroxyphenol เล็กน้อย, aromatic protons ในหน่วย guaiacyl (7.30-6.82 ppm) และ syringyl (6.82-6.30 ppm) และ methoxy protons (4.0-3.5 ppm) ใกล้เคียงกัน แต่ลิกนิน MAPL และ CPL มีความไม่บริสุทธิ์จากบางส่วนของคาร์โบไฮเดรตเพราะยังปรากฏสัญญาณของพันธะ β -O-4, β - β , และ β -5 บนเส้นสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ (6.3-4.0 ppm)

4.5.6.2 C13-NMR



รูปที่ 4.9 ^{13}C -สเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ตลอดช่วง 200-0 ppm ของ STDL, MAPL และ CPL

โดยภาพรวมแล้ว MAPL มีลักษณะสเปกตราก็คล้ายกับ CPL อย่างมาก เนื่องจากพบสเปกตรารแสดงสัญญาณของ aliphatic COOR (δ_{C} 174.5 ppm), oxygenated aromatic (152.1 ppm คือ C_3/C_5 ในหน่วย syringyl) condensed aromatic (129.7, 127.8 ppm) interunit linkage (55.9 ppm) และ aliphatic side chain จำนวนมาก เหล่านี้สอดคล้องกันเกือบทุกตำแหน่ง

พิจารณารูปขยายที่ตัดเป็น 2 ช่วง รูปที่ 4.10 ที่ δ_{C} 174.5 ppm พบสัญญาณสเปกตรารอย่างเด่นชัดใน MAPL และ CPL ซึ่งเป็นตำแหน่งของ aliphatic carboxyl groups [Capanema et al. (2004); Nadji et al. (2009); Chen et al. (2010); Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] ดูตารางภาคผนวกที่ ก.3

ตำแหน่ง δ_{C} 152.1 ppm พบสัญญาณสเปกตรารใน MAPL และ CPL ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C_3/C_5 จาก S unit [Nadji et al. (2009); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] ดูตารางภาคผนวกที่ ก.4

ตำแหน่ง δ_c 150-145 ppm เป็นช่วงที่เกิดสัญญาณจำนวนมากทั้ง STDL MAPL และ CPL อันเป็นตำแหน่งของ C3 หรือ C4 จาก G unit ทั้งสิ้น [Nadji et al. (2009); Liu et al. (2011); Xue et al. (2012); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.5

ตำแหน่ง δ_c 130-127 ppm เป็นช่วงที่เกิดสัญญาณเป็นอันมากในลิกนินทั้ง 3 ชนิด MAPL, CPL และ STDL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ ซึ่งเกิดจาก H unit [Nadji et al. (2009); Liu et al. (2011); Xue et al. (2012); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.6

ตำแหน่ง δ_c 120-118 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด STDL, MAPL และ CPL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ โดยสัญญาณ STDL สูงเด่นชัดมาก ซึ่งเกิดจาก C6 จาก G unit [Liu et al. (2011); Xue et al. (2012); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018) Ying et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.7

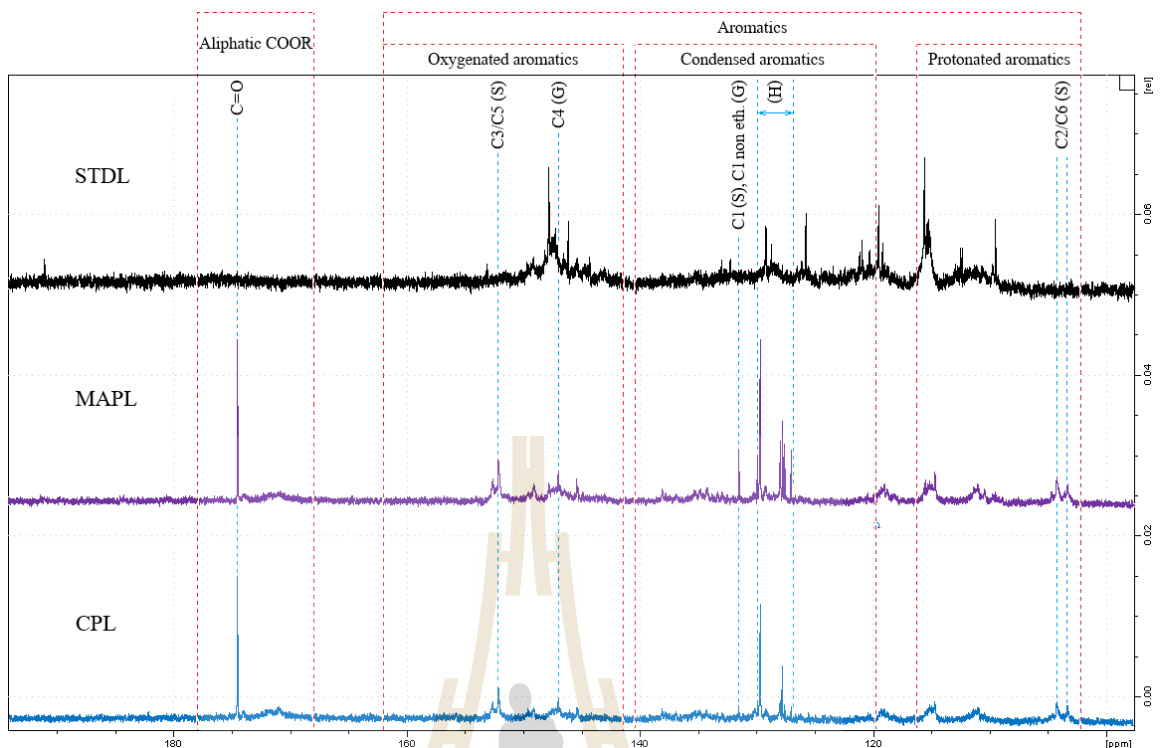
ตำแหน่ง δ_c 116-114 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด STDL, MAPL และ CPL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ ซึ่งบางตำแหน่งเกิดจาก G unit และบางตำแหน่งเกิดจาก pCA [Nadji et al. (2009); Liu et al. (2011); Pu et al. (2013); Xue et al. (2012); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.8

ตำแหน่ง δ_c 112-110 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด STDL, MAPL และ CPL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ ซึ่งเป็นสัญญาณ C2 จาก G unit [Liu et al. (2011); Xue et al. (2012); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018) Ying et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.9

ตำแหน่ง δ_c 104-103 ppm พบสัญญาณในลิกนิน MAPL และ CPL แต่ไม่พบใน STDL (หรืออาจมีแต่สัญญาณต่ำมากกระทั่งแยกไม่ออกจาก noise) ซึ่งในช่วง 104-103 ppm เป็นสัญญาณ C2/C6 จาก S unit [Gonçalves et al. (2000); Nadji et al. (2009); Wen et al. (2013)a, b; Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] คูตารางภาคผนวกที่ ก.10

จากค่า δ_c ในช่วงโมเลกุลอโรมาติก 160-100 ppm ลิกนินทั้ง 3 ชนิดสามารถพบ H และ G ได้ทั่วไป แต่เป็นที่สังเกตว่า STDL ไม่พบสัญญาณ (หรือเป็นสัญญาณที่น้อยมาก) ของ S unit ทั้งที่ δ_c 152.1 ppm และ 104-103 ppm

อย่างไรก็ดี ควรสำเร็จซึ่งสมมติฐานได้ว่า การที่ STDL MAPL และ CPL มีค่า TPC และการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS สูงไปต่ำกว่ากัน ดังหัวข้อก่อนนี้ เกิดจากปริมาณผลรวมพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละช่วงสัญญาณ H, G, S units อันแสดงถึงปริมาณรวมของ H+G+S โดยอนุมานใน STDL MAPL และ CPL ที่มีความเด่นชัดจากไปน้อยตามลำดับ (รูปที่ 4.10 ช่วงโมเลกุลอโรมาติก 160-100 ppm)



รูปที่ 4.10 ภาพขยาย ^{13}C -สเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ช่วง 195-100 ppm ของ STDL, MAPL และ CPL

พิจารณารูปที่ 4.11 ตำแหน่ง δ_{C} 73-70 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด MAPL, CPL และ STDL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ เป็นสัญญาณ คาร์บอนอะตอม C_{α} หรือ C_{β} ของโมโนลิกนอล G หรือ H unit ใน $\beta\text{-O-4}$ unit อันมีพันธะอีเธอร์ของโมโนลิกนอลคาร์บอนอะตอม C_{β} ในโมโนลิกนอล หนึ่ง-O-C4 ของอีกโมโนลิกนอลหนึ่ง ($\beta\text{-O-4}$ ether linkage) และหรือโมโนลิกนอลคาร์บอนอะตอม C_{β} ในโมโนลิกนอลหนึ่งเชื่อมต่อกับโมโนลิกนอลคาร์บอนอะตอม C_{β} ในอีกโมโนลิกนอลหนึ่ง แล้วทำให้เกิดโครงสร้าง $\beta\text{-}\beta$ resinol และอาจรวมถึงพันธะที่เชื่อมระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต (การมีคาร์โบไฮเดรตปะปนอยู่ในลิกนิน) [Terashima et al. (2002); Nadji et al. (2009); Liu et al. (2011); Xue et al. (2012); Pu et al. (2013) และ Wen et al. (2013)a; Yao et al. (2018)] ดูตารางภาคผนวกที่ ก. 11

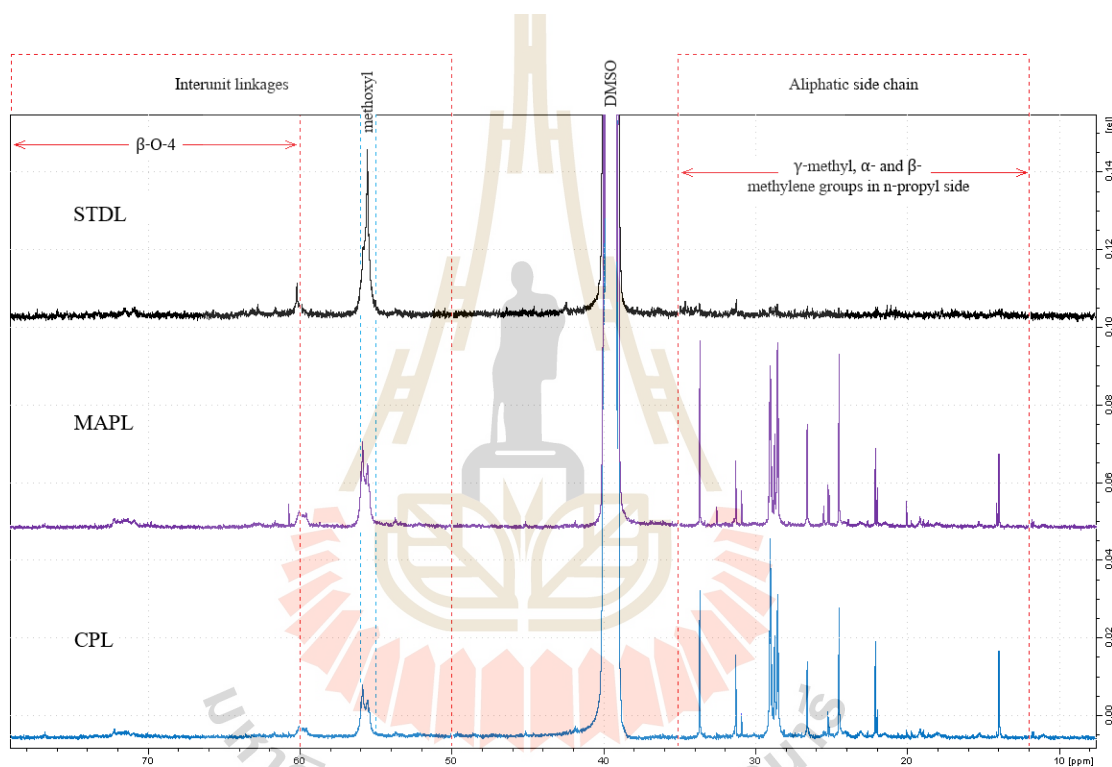
ตำแหน่ง δ_{C} 60.5-59.5 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด MAPL, CPL และ STDL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ เป็นสัญญาณการเชื่อมหน่วยโมโนลิกนอล C_{γ} จาก $\beta\text{-O-4}$ unit [Xue et al. (2012); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a; Yao et al. (2018)] ดูตารางภาคผนวกที่ ก.12

ตำแหน่ง δ_{C} 56.5-55.0 ppm พบสัญญาณในลิกนินทั้ง 3 ชนิด STDL, MAPL และ CPL เรียงจากมาก-น้อยตามลำดับ แสดง Methoxyl group $-\text{OCH}_3$ [Nadji et al. (2009); Liu et al. (2011); Xue

et al. (2012); Pu et al. (2013); Wen et al. (2013)a; Coral Medina (2016); Yao et al. (2018); Ying et al. (2018)] ดูตารางภาคผนวกที่ ก.13

ตำแหน่ง δ_c 35-21 ppm พบสัญญาณในลิกนิน MAPL และ CPL อย่างเด่นชัด แต่ STDL ปรากฏสัญญาณเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปแล้วในช่วงดังกล่าวเป็นสัญญาณจาก aliphatic side chain [Liu et al. (2011); Wen et al. (2013)a, b] ดู ตารางภาคผนวกที่ ก.14

ดังรูป 4.11 ลิกนินทั้ง 3 ชนิดสามารถพบ interunit linkage และ methoxyl group ได้ แต่ใน STDL พบสัญญาณ aliphatic side chain δ_c 35-21 ppm เพียงเล็กน้อย



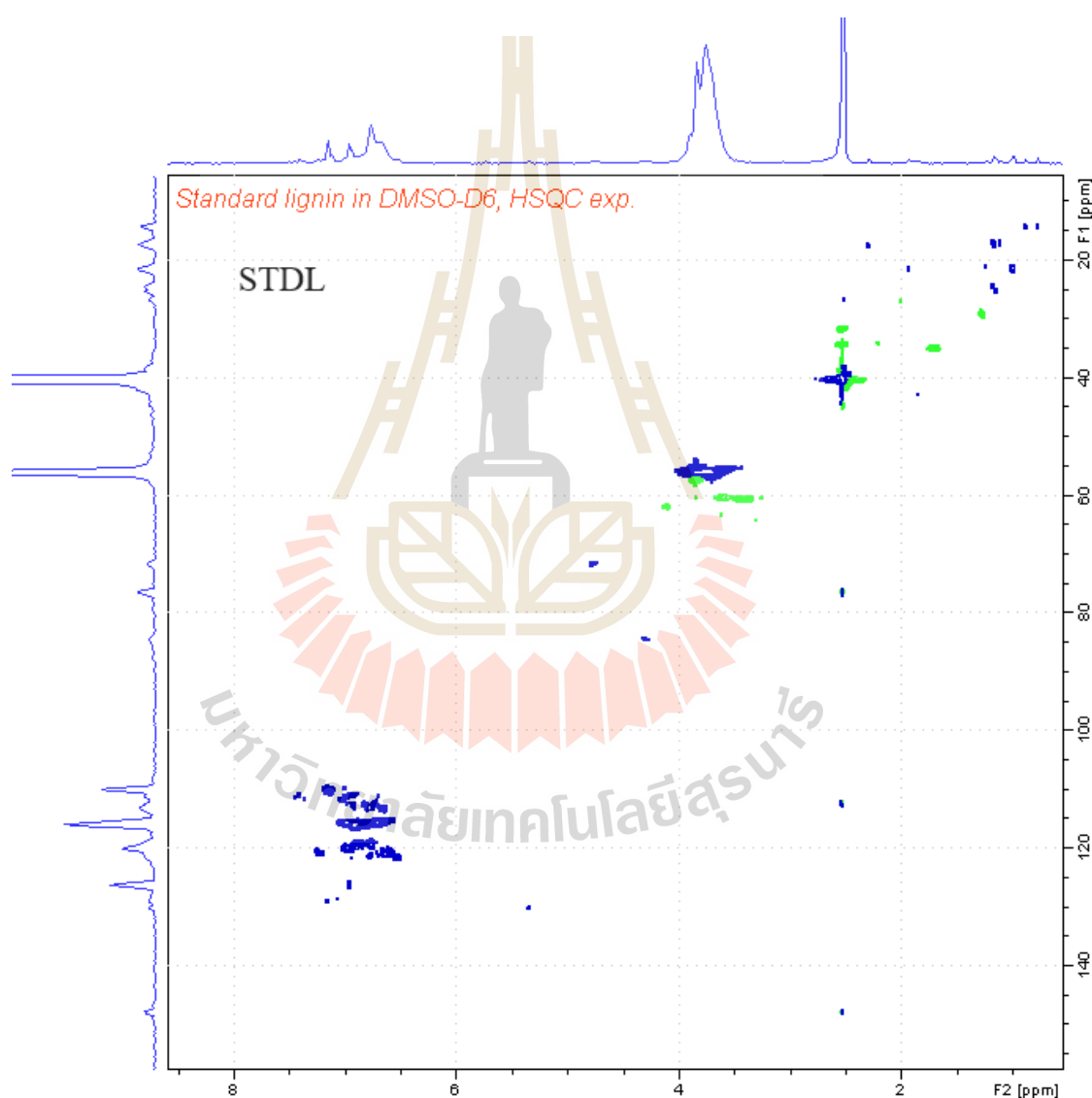
รูปที่ 4.11 ภาพขยาย ^{13}C -สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ช่วง 80-10 ppm ของ STDL, MAPL และ CPL

4.5.6.3 HSQC-NMR

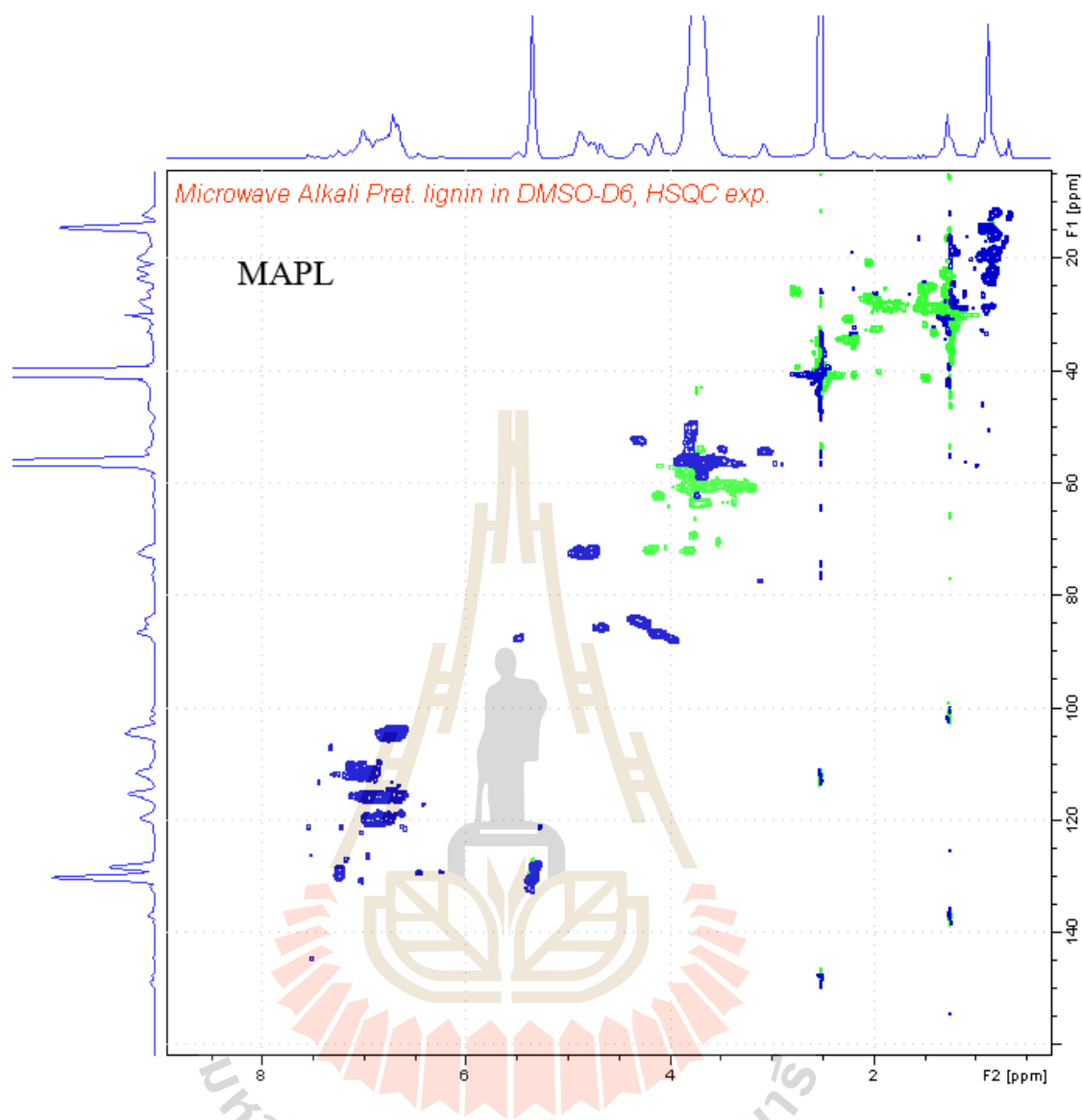
การทำสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์โดยใช้โปรตอนหรือ ^{13}C อย่างไม่อย่างหนึ่งอาจสังเกตลักษณะการตอบสนองของสารตัวอย่างบางตำแหน่งได้ไม่ชัดเจน เพราะสเปกตรานี้โดยเฉพาะใน ^{13}C จะปรากฏสัญญาณที่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสัญญาณจากตัวอย่างหรือเป็นสัญญาณจาก noise จึงมีการสร้างกราฟสเปกตรานี้ 2 มิติโดยใช้ค่าสัญญาณจาก ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR สร้างแกนพิกัดจาก ค่าสัญญาณที่ได้จะสนธิ (cross) กัน เกิดภาพสัญญาณแนวระดับ

(contour) เหมือนมองค่าระดับความสูงของภูมิประเทศจากดาวเทียม ด้วยเหตุว่าเทคนิคนี้ใช้ทั้ง ^1H และ ^{13}C ขึ้นชั้นเอกลักษณ์ของสารตัวอย่าง จึงทำให้ได้พิกัดสัญญาณที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้เมื่อเทคนิค NMR มีการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันรายงานทางวิชาการจำนวนมาก จึงไม่ใช่เพียง ^1H หรือ ^{13}C อย่างใดอย่างหนึ่งอีกต่อไป และคาดว่ากรายงานเฉพาะค่าหนึ่งค่าใดคงจะหมดความนิยมไปในอนาคตอันใกล้

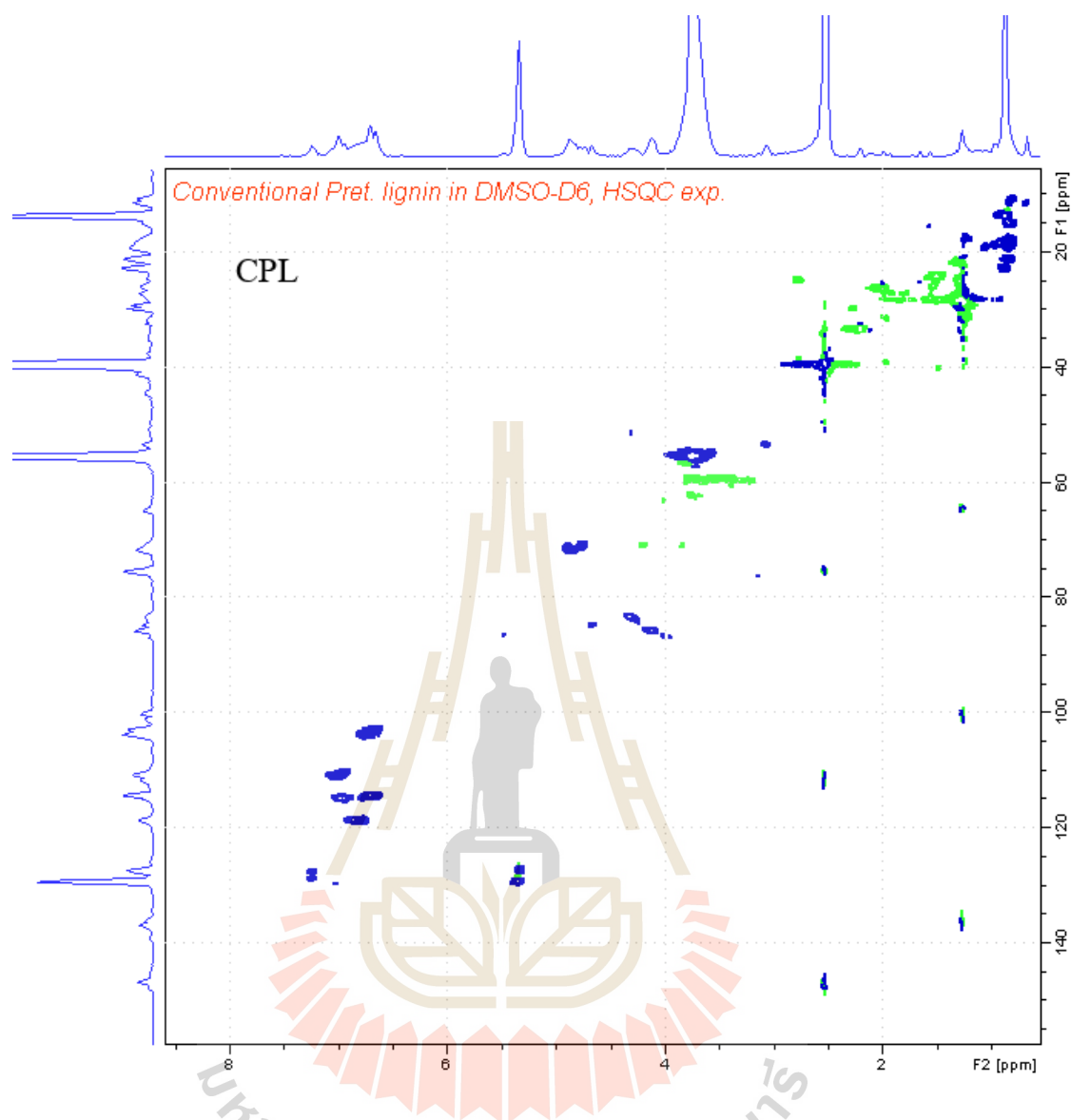
พิจารณากราฟสเปกตรา HSQC ของ STDL MAPL CPL ดังรูปที่ 4.12-4.14 ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 ^{13}C - ^1H สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ STDL



รูปที่ 4.13 ^{13}C - ^1H สเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ MAPL



รูปที่ 4.14 ^{13}C - ^1H สเปกตรากำหนดแม่เหล็กนิวเคลียร์ 2 มิติของ CPL

รายงานพิกัดสเปกตรา HSQC ในลิกนินของนักวิจัยท่านอื่นๆ พบว่า STDL, MAPL และ CPL มีความสัมพันธ์กันตามองค์ประกอบที่ปรากฏ สามารถจำแนกกลุ่มได้ 6 ประเภทดังต่อไปนี้

1) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะใน STDL

ได้จากสัญญาณของ condensed guaiacyl ซึ่งเป็นหน่วยของ coniferyl alcohol คูตารางภาคผนวกที่ ก.15

2) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะใน MAPL

ได้จากสัญญาณของ ferulate, *p*-coumarate, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxyphenyl units, G units, oxidized G units, cinnamyl alcohol, S units, oxidized S units, phenylcoumaran, และ resinol คูตารางภาคผนวกที่ ก.16

3) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะ CPL

ได้จากสัญญาณของ resinol, dibenzodioxocin, และ tetrahydrofuran ตารางภาคผนวกที่ ก.17

4) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะ STDL และ MAPL

ได้จากสัญญาณของ G units, ferulate, dibenzodioxocin, *p*-hydroxycinnamyl alcohol, และ cinnamyl alcohol คูตารางภาคผนวกที่ ก.18

5) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะ MAPL และ CPL

ได้จากสัญญาณของ oleofinic structures, *p*-coumarate, *p*-hydroxyphenyl (H) units, S units, etherified S units, phenylcoumaran, dibenzodioxocin, β -O-4 linked to S unit, β -O-4 linked to S unit, β -O-4 linked to G unit, β -O-4 linked to G unit และ resinol คูตารางภาคผนวกที่ ก.19

6) พิกัดสัญญาณเอกลักษณ์ที่พบทั้ง STDL, MAPL และ CPL

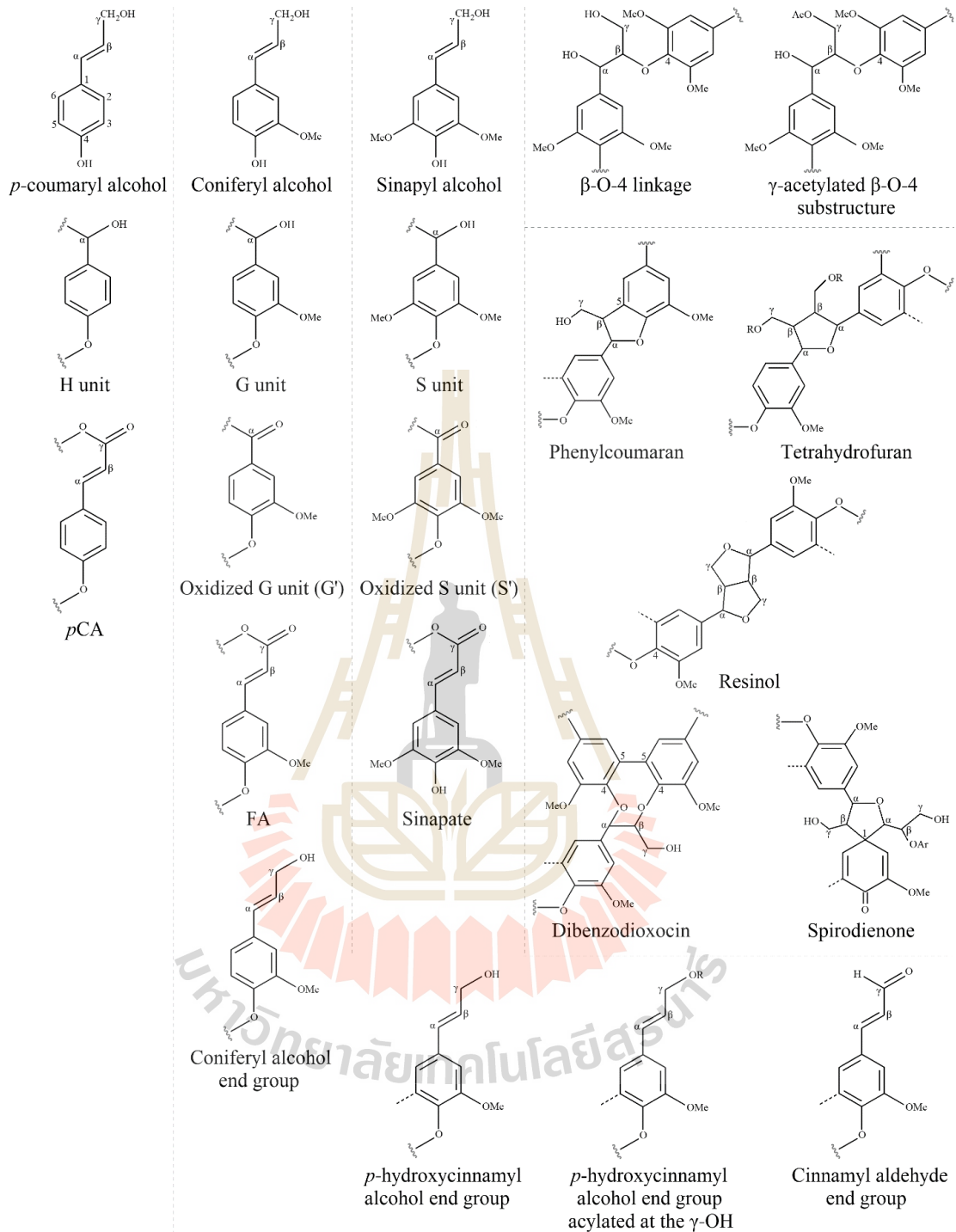
ได้จากสัญญาณของ aromatic regions, aliphatic regions, oxygenated aliphatic region, *p*-coumarate, *p*-hydroxyphenyl units, G units, etherified G units, β -O-4 linked to G units, β -O-4 ether linkage, β -O-4 substructures, xylan, cellulose, methoxyls คูตารางภาคผนวกที่ ก.20

อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า ข้อมูลจากสัญญาณเอกลักษณ์ของสเปกตรานพิกัด HSQC พบว่า STDL, MAPL และ CPL แต่ละชนิด มีองค์ประกอบโดยสรุปดังต่อไปนี้

เมื่อพิจารณาปริมาณ TPC DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} จะพบว่า MAPL มีค่าใกล้เคียงกับ STDL แต่ CPL มีค่า TPC DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ที่ต่ำกว่ามาก ขณะที่สเปกตรา ¹³C, ¹H และ HSQC NMR พบว่า MAPL มีสเปกตราที่คล้ายคลึงกับ CPL แต่ตำแหน่งต่าง ๆ ของ MAPL ต่างจาก STDL ทำให้พิจารณาได้ยากว่าสิ่งใดที่สเปกตรา NMR ของ MAPL จะแสดงหลักฐานยืนยันความสอดคล้องกับ STDL และแตกต่างไปจาก CPL ทว่าโดยแท้จริงแล้วผลของปริมาณ TPC DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ในสเปกตรา NMR (ดู HSQC จะชัดเจนกว่า) ขึ้นกับสารประกอบ hydroxyphenyls ในช่วงพิกัด aromatics

ตารางที่ 4.8 สรุปองค์ประกอบลิกนินที่ HSQC NMR สามารถระบุได้

STD L	MAP L	CPL
Aliphatic region	Aliphatic regions	Aliphatic regions
Aromatic region	Aromatic regions	Aromatic regions
Cellulose	Cellulose	Cellulose
Cinnamyl alcohol	Cinnamyl alcohol	Dibenzodioxocin
Dibenzodioxocin	Dibenzodioxocin	G unit
Ferulate	Ferulate	Etherified G unit
G unit	G unit	H unit
Etherified G unit	Etherified G unit	Methoxyl
Condensed G	Oxidized G unit (G')	Oxygenated aliphatic region
H unit	H unit	Phenylcoumaran
Methoxyl	Methoxyl	<i>p</i> -coumarate
Oxygenated aliphatic region	Oxygenated aliphatic region	Resinol
<i>p</i> -coumarate	Phenylcoumaran	S unit
<i>p</i> -hydroxycinnamyl alcohol	<i>p</i> -coumarate	Etherified S unit
Xylan	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Tetrahydrofuran
β -O-4 linked to G unit	<i>p</i> -hydroxycinnamyl alcohol	Xylan
	Resinol	β -O-4 linked to G unit
	S unit	β -O-4 linked to S unit
	Etherified S unit	
	Oxidized S unit (S')	
	Xylan	
	β -O-4 linked to G unit	
	β -O-4 linked to S unit	



รูปที่ 4.15 โมเลกุลและส่วนของโมเลกุลที่อาจพบได้ใน STD, MAPL และ CPL [สร้างรูปโดยอ้างอิงข้อมูลจาก Del Rio et al. (2012), Xue et al., (2012), Wen et al. (2013)a, Zhou et al. (2016) และ Qin et al., (2018)]

134-103/7.9-6.1 อันเป็นพื้นที่จากสัญญาณของ H, pCA, G, และ S units ซึ่งเป็น antiradical phenolic ทั้งสิ้น จะเห็นได้ว่าในช่วงพิกัดดังกล่าว (รูปที่ 4.12-4.14) MAPL มีปริมาณ antiradical phenolic มาก สมเหตุสมผลกับ STDL ขณะที่ CPL มีปริมาณ antiradical phenolic ต่ำกว่า ส่วนในพื้นที่นอกกรอบ พิกัด 134-103/7.9-6.1 ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบที่ยังเชื่อมกับบางส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส หรือสิ่งเจือปนอื่นๆ โดยการที่ MAPL และ CPL แสดงตำแหน่งต่างๆ สอดคล้องกันเพราะเป็นลิกนิน จากวัตถุดิบชนิดเดียวกันคือเหง้ามันสำปะหลังชนิดที่ถูกแยกด้วยสารละลายต่าง NaOH

อย่างไรก็ดี สามารถสรุปได้ว่าการ MAPL มีอิทธิพลต่อการทำลายโครงสร้างของลิกนินสูงกว่า การปรับสภาพด้วยค่าคงที่โดยใช้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิม เห็นได้จากความเข้มของสัญญาณ NMR จากโมโนลิกนอลใน MAPL อันแสดงถึงปริมาณของโมโนลิกนอลที่ได้หลังจากการปรับสภาพด้วย คลื่นไมโครเวฟมีสูงกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีการดั้งเดิม นอกจากนี้หลักฐานสนับสนุนอิทธิพลของ คลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณ TPC และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้แม้กระทั่ง การอบเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อบริโภค ก็สามารถเพิ่มปริมาณ TPC และ DPPH_{AA} อย่างมีนัยสำคัญ (Uslu and Özcan, 2019) สำหรับอิทธิพลของคลื่นไมโครเวฟต่อลิกนิน ใน งานของ Li et al. (2012) พบว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟสามารถลดขนาดโมเลกุลของลิกนินและเพิ่ม ปริมาณ phenolic hydroxyl ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในการต้านอนุมูลอิสระ, ในงานของ Zhou et al. (2012) พบว่า ลิกนินการใช้คลื่นไมโครเวฟและลิกนินจากการบดไม้ไผ่แล้วให้ความร้อนด้วยวิธีการ ดั้งเดิมให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1.20 และ 0.53 ตามลำดับ โดยวัดในหน่วย radical scavenging index หรืออาจกล่าวได้ว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล อิสรสูงกว่าลิกนินจากการบดไม้ไผ่แล้วให้ความร้อนด้วยวิธีการดั้งเดิมถึง 2.26 เท่า นอกจากนี้ยัง สอดคล้องกับ Tsubaki et al. (2010) ที่ให้เหตุผลว่าคลื่นไมโครเวฟจะไปสลายโครงสร้าง polyphenol ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่อยู่ในลิกนิน ให้เป็นสารประกอบ phenolic ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า มีความว่องไวในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า

4.6 สรุปผลการทดลอง

น้ำหนักแห้งของลิกนินจากการปรับสภาพเหง้ามันสำปะหลังด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟ ร่วมกับสารละลายต่าง (MAPL) และ ลิกนินจากการปรับสภาพด้วยวิธีการดั้งเดิม (CPL) มีค่า 1.6032±0.2469% และ 0.6748±0.0145% เทียบกับ NCR DM. เมื่อตรวจสอบด้วย FTIR พบว่ามีหมู่ อโรมาติก หมู่เมทิล คาร์โบไฮเดรต เทียบได้กับ STDL แต่ยังไม่สามารถแสดงองค์ประกอบได้ชัด เมื่อ ทำการตรวจสอบการสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน พบว่า STDL, MAPL และ CPL มีร้อยละของมวล คงเหลือที่อุณหภูมิ 800°C เท่ากับ 42.69±0.81, 41.48±1.94, 28.76±0.57 ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมด (TPC) ของ MAPL และ CPL มีค่า 171.87±11.35 และ 65.47±2.29 mg GAE/g lignin คิดเป็น

98.64 และ 37.86% ของ TPC ของ STDL ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 267.32±1.68 และ 146.23±16.09 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 86.00 และ 47.05% ของ DPPH_{AA} ของ STDL ตามลำดับ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 545.56±2.76 และ 173.29±5.53 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 80.67 และ 25.63% ของ ABTS_{AA} ของ STDL ตามลำดับ ตำแหน่งยอดคลื่นของสเปกตรัม กำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ (NMR) ของ MAPL สอดคล้องกับตำแหน่งยอดคลื่นของ CPL คือพบโมโนลิแกนด์ของทั้ง H G และ S unit ขณะที่ STDL ไม่พบสัญญาณ S unit หรือมีสัญญาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม ผลสเปกตรัม NMR ของ MAPL แสดงสัญญาณในช่วงของหมู่โรรมาติกมาก ใกล้เคียงกับ STDL จึงเป็นสาเหตุที่ค่า TPC DPPH_{AA} และ ABTS_{AA} ของ MAPL สูงใกล้เคียง STDL ทว่าสเปกตรัม CPL แม้จะมีตำแหน่งยอดกราฟ (ชนิดของสาร) ที่สอดคล้องกับ MAPL แต่เป็นสัญญาณที่ต่ำ (ปริมาณสาร) กว่าทั้งสิ้น เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสส่งผลดีต่อปริมาณและคุณภาพลิกนินในการสร้างผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระ และ MAPL สามารถพัฒนาต่อในการเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม

4.7 ข้อเสนอแนะ

MAPL ลิกนินสามารถพัฒนาต่อไปได้ โดยเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยการแยกระดับ (fractionate) ทางเคมีโดยใช้สารละลายหรือตัวทำละลายต่างๆ (Jaaskelainen et al., 2017; Ramagoti et al., 2019; Tagami et al., 2019) อาจให้พลังงานจลน์ด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในแต่ละชั้นการแยก ระดับความสามารถในการทำละลายทางเคมีร่วมด้วย (An et al., 2017) หรือวิธีทางกลเช่นกรองด้วย เซรามิกเมมเบรน (García et al., 2010) ผู้เขียนเชื่ออย่างยิ่งว่าลิกนินที่ได้ในแต่ละช่วงคุณสมบัติการละลายหรือช่วงขนาดโมเลกุลสามารถให้คุณสมบัติจำเพาะที่เด่นชัดขึ้น สำหรับการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลชีพ สารผสมเนื้อฟิล์มเพื่อกรองรังสี UV สมบัติทางความร้อนสำหรับสารผสมพอลิเมอร์ ฯลฯ

4.8 รายการอ้างอิง

เนตรนภา เมฆกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2557). การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องคั้นน้ำผลไม้. วารสารวิจัย มข. (บศ.) 14(4): 69-79.
 แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวนิช, ภควดี สุทธิไวยกิจ, มาณพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์, อูมาพร สุขม่วง และ วันเพ็ญ ช้อนแก้ว. (2555). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, Principles and techniques of instrumental analysis part II Chromatography and others. **ชวนพิมพ์ 50**. กรุงเทพฯ. 623 หน้า.

- อิสระวัฒน์ ฤทธนพงศธร และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. (2556). การแยกสารประกอบฟีนอลิกและ
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากผลสับุดำดิบ. **Veridian E-Journal** 6(3): 887-902.
- Abbati de Assis, C., Greca, L.G., Ago, M., Balakshin, M.Y., Jameel, H., Gonzalez, R., and Rojas,
O.J. (2018). Techno-economic assessment, scalability, and applications of aerosol lignin
micro- and nanoparticles. **ACS Sustainable Chem. Eng.** 6(9): 11853-11868.
- Afrin, T., Tsuzuki, T., Kanwar, R.K., and Wang, X. (2012). The origin of the antibacterial property
of bamboo. **Journal of the Textile Institute.** 103(8): 844-849.
- Ago, M., Huan, S., Borghei, M., Raula, J., Kauppinen, E.I., and Rojas, O.J. (2016). High-
throughput synthesis of lignin particles (~30 nm to ~2 µm) via aerosol flow reactor: size
fractionation and utilization in pickering emulsions. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** 8(35):
23302-23310.
- Ajjan, F. N., Jafari, M.J., Rębiś, T., Ederth, T., and Inganäs, O. (2012). Spectro electrochemical
investigation of redox states in a polypyrrole/lignin composite electrode material. **Journal
of Materials Chemistry A.** (24): 1-13.
- An, L., Wang, G., Jia, H., Liu, C., Sui, W. and Si, C. (2017). Fractionation of enzymatic hydrolysis
lignin by sequential extraction for enhancing antioxidant performance. **International
Journal of Biological Macromolecules.** 99: 674-681.
- Beisl, S., Miltner A., and Friedl, A. (2017). Lignin from Micro- to Nanosize: Production Methods.
Int. J. Mol. Sci. 18(1244): 31 pages.
- Bayerbach, R., Nguyen, V.D., Schurr, U., and Meier, D. (2006). Characterization of the water-
insoluble fraction from fast pyrolysis liquids (pyrolytic lignin): Part III. Molar mass
characteristics by SEC, MALDI-TOF-MS, LDI-TOF-MS, and Py-FIMS. **Journal of
Analytical and Applied Pyrolysis.** 77(2): 95-101.
- Brebu, M., Tamminen, T., and Spiridon, I. (2013). Thermal degradation of various lignins by TG-
MS/FTIR and Py-GC-MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.** 104: 531-539.
- Calvo-Flores, F.G., and Dobado, J.A. (2010). Lignin as Renewable Raw Material. **ChemSusChem.**
3(11): 1227-1235.
- Capanema, E.A., Balakshin, M.Y., and Kadla, J.F. (2004) A comprehensive approach for
quantitative lignin characterization by NR Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** 52: 2850-
1860.

- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Alda, W.M. and Ho, C.W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. **Int. Food Res. J.** 16: 203-213.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M.H., ElSohly, M.A., and Khan, I.A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** Article ID 253875: 1-9.
- Chaudhary, R. and Dhepe, P.L. (2016). Solid base catalyzed depolymerization of lignin into low molecular weight products. in The Royal Society of Chemistry, **Green Chem.** 19(3): 12 pages.
- Chen, G., Fu, S., Liu, R., Zhan, H., and Chen, Y. (2010). Analysis of structural changes of Masson pine lignin reacted with superoxide anion radical using NMR spectroscopy. **BioResources.** 5(2): 1156-1163.
- Chen, N., Dempere, L.A., and Tong, Z. (2016). Synthesis of pH-responsive lignin-based nanocapsules for controlled release of hydrophobic molecules. **ACS Sustain. Chem. Eng.** 4(10): 5204-5211.
- Cheng, H., Wu, S., and Liu, C. (2014). Study on the mechanism of the pyrolysis of a lignin monomeric model compound by in situ FTIR. **BioResources.** 9(3): 4441-4448.
- Coral Medina, J.D., Woiciechowski, A.L., Filho, A.Z., Bissoqui, L., Nosedá, M.D., De Salsa Vandenberghe, L.P., Zawadzki, S.F., and Soccol, C.R. (2016). Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. **Industrial Crops and Products.** 94: 630-637.
- Del Rio, J.C., Rencoret, J., Prinsen, P., Martinez, A.T., Ralph, J., and Gutierrez, A. (2012). Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 60: 5922-5935.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry.** 97(4): 654-660.
- Doherty, W., Mousavioun, P., Fellows, C. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products.** 33(2): 259-276.

- Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T., and Wu, C. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. **Industrial Crops and Products**. 34: 1629-1634.
- Dos Santos, P.S.B., Erdocia, X., Gatto, D.A. and Labidi, J. (2014). Characteristic of kraft lignin separated by gradient acid precipitation. **Industrial crops and products** 55: 149-154.
- Duan, D., Wang, Y., Ruan, R., Tayier, M., Dai, L., Zhao, Y., Zhou, Y., and Liu, Y., (2018). Comparative study on various alcohols solvolysis of organosolv lignin using microwave energy: Physicochemical and morphological properties. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**. 126: 38-44.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C. and Duarte, A.P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. **Molecules**. 15: 9308-9322.
- Gao, Y., Walker, M.J., Barrett, J.A., Hosseinaei, O., Harper, D.P., Ford, P.C., Williams, B.J., Foston, M.B. Analysis of gas chromatography/mass spectrometry data for catalytic lignin depolymerization using positive matrix factorization. **Green Chemistry**. 18: 12 pages.
- García, A., Toledano, A., Andrés, M.Á., and Labidi, J. (2010). Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. **Process Biochemistry**. 45(6): 935-940.
- Gonçalves, A.R., Schuchardt, U., Bianchi, M.L. and Curvelo, A.A.S. (2000). Piassava Fibers (*Attalea funifera*): NMR Spectroscopy of their Lignin. **J. Braz. Chem. Soc.** 11(5): 491-494.
- Gordobil, O., Moriana, R., Zhang, L., Labidi, J., and Sevastyanova, O. (2016). Assesment of technical lignins for uses in biofuels and biomaterials: Structure-related properties, proximate analysis and chemical modification. **Industrial Crops and Products**. 83: 155-165.
- Guo, Y., Tian, D., Shen, F., Yang, G., Long, L., He, J., Song, C., Zhang, J., Zhu, Y., Huang, C., and Deng, S. (2019). Transparent cellulose/technical lignin composite films for advanced packaging. **Polymers**. 11(9): 1455. 11 pages.
- Haz, A., Jablonsky, M., Orsagova, A., and Surina, I. (2013). Characterization of lignins by Py-GC/MS. 4nd **International Conference Renewable Energy Sources 2013**, May 21-23, 2013 Tatranské Matliare High Tatras, Slovak Republic. 5 pages.
- Haz, A., Jablonsky, M., Surina, I., Kacik, F., Bubenikova, T., and Durkovic, J. (2019). Chemical composition and thermal behavior of kraft lignins. **Forest**. 10(483): 12 pages.

- Horst, D., Behainne, J., Júnior, P., and Kovaleski, J. (2014). An experimental comparison of lignin yield from the Klason and Willstatter extraction methods. **Energy for Sustainable Development**. 23(1): 78-84.
- Hua, W., Liu, C., Wu, S.B. and Li, X.H. (2016). Analysis of structural units and their influence on thermal degradation of alkali lignins. "Structure & pyrolysis of lignins" **BioResources** 11(1): 1959-1970.
- Ibrahim, M.N.M., Iqbal, A., Shen, C.C., Bhawani, S.A. and Adam, F. Synthesis of lignin based composites of TiO₂ for potential application as radical scavengers in sunscreen formulation. **BMC Chemistry**. 13(17).
- Jingjing, L. (2011). Isolation of lignin from wood. Bachelor's Thesis. Paper Technology, Faculty of Technology. **Saimaa University of Applied Sciences**. Finland. 57 pages
- Jaaskelainen, A.-S., Liitia, T., Mikkelsen, A., Tamminen, T. (2017). Aqueous organic solvent fractionation as means to improve lignin homogeneity and purity. **Industrial Crops & Products**. 103: 51-58.
- Kaiser, K., and Benner, R., (2012). Characterization of lignin by gas chromatography and mass spectrometry using a simplified CuO oxidation method. **Anal. Chem.** 84(1): 459-464.
- Kent, M.S., Zeng, J., Rader, N., Avina, I.C., Simoes, C.T., Brenden, C.K., Busse, M.L., Watt, J., Giron, N.H., Alam, T.M., Allendorf, M.D., Simmons, B.A., Bell, N.S., and Sale, K.L. (2018). Efficient conversion of lignin into a water-soluble polymer by a chelator-mediated Fenton reaction: optimization of H₂O₂ use and performance as a dispersant. **Green Chem.** 20: 3024-3037.
- Khaldi-Hansen, B.E., Schulze, M., and Kamm, B. (2016). Analytical techniques and methods for biomass. Chapter 2: Qualitative and quantitative analysis of lignins from different sources and isolation methods for an application as a biobased chemical resource and polymeric material. pp 15-44. *in* Analytical techniques and methods for biomass. Silvio Vaz Jr. (ed.), **Springer International Publishing**, Switzerland. 279 pages.
- Kim, H. and Ralph, J. (2014). A gel-state 2D-NMR method for plant cell wall profiling and analysis: A model study with the amorphous cellulose and xylan from ball-milled cotton linters. **RSC Advances**. 4: 7549-7560.

- Köhnke, J., Gierlinger, N., Prats-Mateu, B., Unterweger, C., Solt, P., Mahler, A., Schwaiger, E., Liebner, F., and Gindl-Altmatter, W. (2019). Comparison of four technical lignins as a resource for electrically conductive carbon particles. **BioRes.** 14(1): 1091-1109.
- Köhnke, J., Rennhofer, H., Unterweger, C., Gierlinger, N., Keckes, J., Zollfrank, C., Rojas, O.J., and Gindl-Altmatter, W. (2018). Electrically-conductive sub-micron carbon particles from lignin: Elucidation of nanostructure and use as filler in cellulose nanopapers. **Nanomaterials.** 8(12): 1055.
- Lai, L.W., Idris, A. and Yusof, N.D. (2014). Lignin extraction from oil palm trunk by microwave-alkali technique. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences.** 10(2): 59-63.
- Li, M.-F., Sun, S.N., Xu, F., and Sun, R.-C. (2012). Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. **Food Chemistry.** 134(3): 1392-1398.
- Li D., Briens C., and Berruti F. (2015), Improved lignin pyrolysis for phenolics production in a bubbling bed reactor - Effect of bed materials. **Bioresour. Technol.** 189: 7-14.
- Liu, J.Y., Wu, S.B. and Lou, R. (2011). Chemical structure and pyrolysis response of β -O-4 lignin model polymer. **BioResources.** 6(2): 1079-1093.
- Lu, Y., Lu, Y.-C., Hu, H.-Q., Xie, F.-J., Wei, X.-Y., and Fan, X. (2017). Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. **Hindawi Journal of Spectroscopy.** Vol Article ID 8951658, 15 pages.
- Lutz, M., Hernández, J., and Henríquez, C. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. **CYTA J. Food.** 13(4): 541-547.
- Ma, H., Li, H., Zhao, W., Li, L., Liu, S., Long, J., and Li, X. (2019). Selective depolymerization of lignin catalyzed by nickel supported on zirconium phosphate, Supplementary information. Electronic Supplementary Material (ESI) for Green Chemistry. **The Royal Society of Chemistry.** 22 pages.
- Marathe, P.S., Westerhof, R.J.M., and Kersten, S.R.A. (2019). Fast pyrolysis of lignins with different molecular weight: Experiments and modelling. **Applied Energy.** 236: 1125-1137.
- Menezes Nogueira, I.d., Avelino, F., Oliveira, D.R.d., Souza, N.F., Rosa, M.F. Mazzetto, S.E. and Lomonaco, D. (2019). Organic solvent fractionation of acetosolv palm oil lignin: The role

- of its structure on the antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. 122: 1163-1172.
- Meng, L.Y., Ma, M.G., and Ji, X.X. (2019). Preparation of lignin-based carbon materials and its application as a sorbent. **Materials**. 12(1111): 11 pages.
- Michelin, M., Liebentritt, S., Vicente, A.A., and Teixeira, J.A. (2018). Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. 120: 159-169.
- Mohammed I.A. and Hamidi, M.R. (2012). New liquid crystalline polyurethane elastomers containing Thiazolo [5,4d] thiazole moiety: Synthesis and properties. *in* Polyurethane by (Ed.) F. Zafar and E. Sharmin. **IntechOpen**. 19-32.
- Molina-Cortés, A., Sánchez Motta, T., Tobar-Tosse, F., and Quimbaya, M. (2019). Spectrophotometric estimation of total phenolic content and antioxidant capacity of molasses and vinasses generated from the sugarcane industry. **Waste and Biomass Valorization**. 10(62): 1-11.
- Monteil-Rivera, F., Phuong, M., Ye, M., Halasz, A., and Hawari, J. (2013). Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. **Industrial Crops and Products**. 41: 356-364.
- Mota, T.R., Oliveira, D.M.E., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O. and Dos Santos, W.D. (2018). Plant cell wall composition and enzymatic deconstruction. **AIMS Bioengineering**. 5(1): 63-77.
- Myint, A.A., Lee, H., Seo, B., Son, W.-S., Yoon, J., Yoon, T.J., Park, H.J., Yu, J., Yoon, J., Lee, Y.-W. (2015). One pot synthesis of environmentally friendly lignin nanoparticles with compressed liquid carbon dioxide as an antisolvent. **Green Chem**. 18: 2129-2146.
- Nadji, H., Diouf, P.N., Benaboura, A., Bedard, Y., Riedl, B., and Stevanovic, T. (2009). Comparative study of lignins isolated from Alfa grass (*Stipa tenacissima* L.). **Bioresour Technol**. 100(14): 3585-3592.
- Nunes, K.S.D., and Pardini, L.C. (2019). Purification and characterization methods for lignin biomass as a potential precursor for carbon materials. **Cellulose Chem. Technol**. 53(3-4) 227-242.

- Oluwadare, A., Angguruwa, G.T., and Sotannde O. (2016). Characterization of energy value of lignin extracted from mill wood residues of *Gmelina arborea* and *Tectona grandis*. **J. For. Sci. Env.** 1(1): 14-20.
- Priya, S.Y., Khan, G.M.A., Uddin, M.H., Haque, M.A., Islam, M.S., Abdullah-Al-Mamun, M., Gafur, M.A., and Alam M.S. (2015). Characterization of Micro-fibrillated Cellulose Produced from Sawmill Wastage: Crystallinity and Thermal Properties. **American Chemical Science Journal.** 9(1): 1-8.
- Pu, Y., Hallac, B., and Ragauskas, A.J. (2013). Plant biomass characterization: Application of solution- and solid-state NMR spectroscopy. *in* Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals, 1st edition. Edited by Charles E. Wyman. **John Wiley & Sons, Ltd.** 369-390.
- Qazi, S.S., Li, D., Briens, C., Berruti, F., and Abou-Zaid, M.M. (2017). Antioxidant activity of the lignins derived from fluidized-bed fast pyrolysis. **Molecules.** 22(3), 372: 1-14.
- Qian, Y., Deng, Y., Xueqing, Q., Li, H., and Yang, D. (2013). Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor. **Green Chemistry.** 16(16): 2156-2163.
- Qin, Z., Zhang, Z.G., Liu, H.M., Qin, G.Y., and Wang, X.D. (2018). Acetic acid lignin from Chinese quince fruit (*Chaenomeles sinensis*): Effect of pretreatment on their structural features and antioxidant activities. **RSC Advances.** 8: 24923-24931.
- Ralph J., and Landucci, L.L. (2010). Chapter 5: NMR of lignins, pp. 137-244. *in* Lignin and Lignans: Advances in Chemistry. Edited by C. Heitner, D.R. Dimmel, and J.A. Schmidt. **CRC Press Taylor & Francis Group.** Boca Raton.
- Ralph J., and Lu, F., (2004). Cryoprobes 3D NMR of acetylated ball milled pine cell walls. **Org. Biomol. Chem.** 2(19): 2714-2715.
- Ramakoti, B., Dhanagopal, H., Deepa, K., Rajesh, M., Ramaswamy, S., and Tamilarasan, K. (2019). Solvent fractionation of organosolv lignin to improve lignin homogeneity: Structural characterization. **Bioreource Technology Reports.** 100293. 6 pages.
- Rao, X., Liu, Y., Zhang, Q., Chen, W., Liu, Y., and Yu, H. (2017). Assembly of organosolv lignin residues into submicron spheres: The effects of granulating in ethanol/water mixtures and homogenization. **ACS Omega.** 2(6): 2858-2865.

- Rencoret, J., Marques, G., Gutierrez, A., Ibarra, D., Li, J., Gellerstedt, G., Santos, J.I., Jimenez-Barbero, J., Martinez, A.T., and Del Rio, J.C. (2008). Structural characterization of milled wood lignins from different eucalypt species. **Walter de Gruyter, Holzforschung**. 62: 514-526.
- Richel, A., Vanderghem, C., Simon, M., Wathelet, B., and Paquot, M. (2012). Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for second-generation lignin analysis. **Anal Chem Insights**. 7: 79-89.
- Richter, A.P., Bharti, B., Armstrong, H.B., Brown, J.S., Plemmons, D., Paunov, V.N., Stoyanov, S.D., and Velev, O.D. (2016). Synthesis and characterization of biodegradable lignin nanoparticles with tunable surface properties. **Langmuir**. 32(25): 6468-6477.
- Rucigaj, A., Krajnc, M., and Šebenik, U. (2017). Kinetic study of thermal degradation of polydimethylsiloxane: The effect of molecular weight on thermal stability in inert atmosphere. **Polymer Sciences**. 3(2:9): 1-7.
- Sagues, W.J., Bao, H., Nemenyi, J.L., and Tong, Z. (2018) Lignin-first approach to biorefining: Utilizing Fenton's reagent and supercritical ethanol for the production of phenolics and sugars. **ACS Sustainable Chem. Eng.** 8 pages, 10.1021/acssuschemeng.7b04500.
- Samuel, R., Pu, Y., Jiang, N., Fu, C., Wang, Z.Y., and Ragauskas, A. (2014). Structural characterization of lignin in wild-type versus COMT down-regulated switchgrass. **Front. Energy Res.** 1: 1-9.
- Scholze, B., and Meier, D. (2001). Characterization of the water-insoluble fraction from pyrolysis oil (pyrolytic lignin). Part I. PY-GC/MS, FTIR, and functional groups. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. 60(1): 41-54.
- Sipponen, M.H., Lange, H., Ago, M., and Crestini, C. (2018). Understanding lignin aggregation processes. A case study: Budesonide entrapment and stimuli controlled release from lignin nanoparticles. **ACS Sustainable Chem. Eng.** 6: 9342-9351.
- Song, C., Hu, H., Zhu, S., Wang, G., and Chen, G. (2004). Nonisothermal catalytic liquefaction of corn stalk in subcritical and supercritical water. **Energy Fuels**. 18(1): 90-96.
- Stankovic', N., Mihajilov-Krstev, T., Zlatkovic', B., Stankov-Jovanovic', V., Mitic', V., Jovic', J., Comic, L., Kocic', B., and Bernsteine, N., (2016). Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**. 78: 21-28.

- Stark, N.M., Yelle, D.J., and Agarwal, U.P. (2015). Chapter 4: Techniques for characterizing lignin. *in Lignin in Polymer Composites*. Elsevier Inc. (2016). pp. 49-65.
- Takada, D., Ehara, K., and Saka, S., (2004). Gas chromatographic and mass spectrometric (GC-MS) analysis of lignin-derived products from *Cryptomeria japonica* treated in supercritical water. *Journal of Wood Science*. 50(3): 253-259.
- Tagami, A., Gioia, C., Lauberts, M., Budnyak, T., Moriana, R., Lindström, M.E., Sevastyanova, O. (2019). Solvent fractionation of softwood and hardwood kraft lignins for more efficient uses: Compositional, structural, thermal, antioxidant and adsorption properties. **Industrial Crops & Products**. 129: 123-134.
- Teixeira, T.S., Cássia do Vale, R., Almeida, R., Ferreira, T.P.S., Guimarães, L.G.L. (2017). Antioxidant potential and its correlation with the contents of phenolic compounds and flavonoids of methanolic extracts from different medicinal plants. **Rev. Virtual Quím.** 9 (4): 1546-1559.
- Terashima, N., Hafren, J., Westermarck, U., and VanderHart, D.L. (2002). Nondestructive analysis of lignin structure by NMR spectroscopy of specifically ¹³C-enriched lignins. Part 1. Solid state study of Ginkgo wood. **Holzforchung by Walter de Gruyter**. 56(1): 43-50.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., and Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19: 669-675.
- Tian, D., Hu, J., Bao, J., Chandra, R.P., Saddler, J.N. and Lu, C., (2017). Lignin valorization: lignin nanoparticles as high-value bio-additive for multifunctional nanocomposites. **Biotechnol Biofuels**. 10(192).
- Tolbert, A., Akinosho, H., Khunsupat, R., Naskar, A.K., and Ragauskas, A.J. (2014). Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. **Biofuels, Bioprod. Bioref.** 21 pages.
- Tsubaki, S., Sakamoto, M., and Azuma, J. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from tea residues under autohydrolytic conditions. **Food chemistry**. 123(4): 1255-1258.
- Uslu, N., and Özcan, M.M. (2019). Effect of microwave heating on phenolic compounds and fatty acid composition of cashew (*Anacardium occidentale*) nut and oil. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. 18(3): 344-347.

- Van Le, H., and Le, V.V.M. (2012). Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **International Journal of Food Science and Technology**. 47: 1206-1214.
- Vieito, C., Fernandes, É., Vaz Velho, M., and Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (*Pinus pinaster* subsp. atlantica) **Chemical Engineering Transactions**. 64: 6 pages.
- Vinardell, M.P., and Mitjans, M. (2017). Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health. **Int J Mol Sciv**. 18(6): 1219, 15 pages.
- Wang, Q., Guan, S., and Shen, D., (2017). Experimental and kinetic study on lignin depolymerization in water/formic acid system. **Int J Mol Sci**. 18(10).
- Watkins, D., Nuruddin, Md., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A., Jeelani, S. (2015). Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Research and Technology**. 4(1): 26-32.
- Wen, J.-L., Sun, S.-L., Xue, B.-L., and Sun, R.-C. (2013)a. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology. **Materials**. 6: 359-391.
- Wen, J.-L., Sun, S.-L., Xue, B.-L. and Sun, R.-C. (2013)b. Quantitative structural characterization of the lignins from the stem and pith of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) **Walter de Gruyter, Holzforschung**. 13 pages. 10.1515/hf-2012-0162.
- Xiong, L., Yang, J., Jiang, Y., Lu, B., Hu, Y., Zhou, F., Mao, S., and Shen, C. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacities of 10 common edible flowers from China. **Food Chemistry**. 79(4): C517-C525.
- Xue, B.-L., Li, M.-F., Xu, F., Sun, R.C. and Jones, G., (2012). Microwave-enhanced alkali treatment of *Pinus yunnanensis*: Physiochemical characterization of the dissolved lignins. **Industrial Crops and Products**. 36: 209-216.
- Yao, L., Yang, H., Yoo, C.G., Meng, X., Pu, Y., Hao, N., and Ragauskas, A.J. (2018). Characteristics of lignin fractions from dilute acid pretreated switchgrass and their effect on cellobiohydrolase from *Trichoderma longibrachiatum*. **Frontiers in Energy Research**. 6(1): 9 pages.

- Ying, W., Shi, Z., Yang, H., Xu, G., Zheng, Z., and Yang, J. (2018). Effect of alkaline lignin modification on cellulase–lignin interactions and enzymatic saccharification yield. **Biotechnol Biofuels**. 11(214): 1-13.
- Zhang, L., Yan, L., Wang, Z., Laskar, D.D., Swita., M.S., Cort, J.R., and Yang, B. (2015). Characterization of lignin derived from water-only and dilute acid flowthrough pretreatment of poplar wood at elevated temperatures. **Biotechnol Biofuels**. 8: 203. 14 pages.
- Zhao, P., Niu, H., Liu, G. and Ye, W. (2015). Polymethacrylates with pendant charge-transporting groups synthesized via RAFT polymerization. **Polymer Bulletin**. 72(1): 19-33.
- Zhong, X., Qian, Y., Huang, J., Yang, D., Deng, Y., and Qiu, X. (2016). Fabrication of lignosulfonate vesicular reverse micelles to immobilize horseradish peroxidase. **Ind. Eng. Chem. Res.** 55(10): 2731-2737.
- Zhou, S., Liu, L., Wang, B., Xu, F., and Sun, R., (2012). Microwave-enhanced extraction of lignin from birch in formic acid: Structural characterization and antioxidant activity study. **Process Biochemistry**. 47(12): 1799-1806.
- Zhou, Z., Xue, W., Lei, F., Cheng, Y., Jiang, J., and Sun, D. (2016). Kraft GL-ethanol pretreatment on sugarcane bagasse for effective enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**. 90: 100-109.
- Zhu, J., Xue, L., Wei, W., Mu, C., Jiang, M., and Zhou, Z. (2015). Modification of lignin with silane coupling agent to improve the interface of poly(L-lactic) acid/lignin composites. **BioResources**. 10(3): 4315-4325.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจสอบค่าที่เหมาะสมที่สุดในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสแห้งมันสำปะหลัง (NCR) ด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับสารละลายต่าง (MAP) เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคสสูงที่สุดหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ (EnH) ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) จากการใช้แบบการทดลองบล็อก-เบห์นเคน (BBD) อันมีพารามิเตอร์ที่ใช้ในการปรับสภาพ ได้แก่ กำลังของคลื่นไมโครเวฟ (X_1), ระยะเวลาการฉายคลื่น (X_2), และความเข้มข้นของสารละลายต่าง (X_3), ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 300, 600 และ 900 W; 5, 10 และ 15 min; และ 3, 5, และ 7% (w/v), ตามลำดับ และการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ผลผลิตกลูโคส เป็นเวลา 24 และ 48 h แบบจำลองพหุนามพื้นผิวตอบสนอง (quadratic RSM models) ถูกสร้างขึ้น และได้ดำเนินการวิเคราะห์ทางสถิติ ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ได้ตรวจสอบกำลังการพยากรณ์ (predictive power) ของแบบจำลอง โดยให้ความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการ MAP ตั้งอยู่บนฐานทางคณิตศาสตร์โดยใช้ RSM มีค่า 840 W 9 min 3%w/v สำหรับ X_1 , X_2 , และ X_3 ตามลำดับ แบบจำลองพหุนามกำลังสองที่เหมาะสมคือ $Y_1 = 7.040 + 0.020X_1 + 0.820X_2 - 1.420X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.00001X_1^2 - 0.029X_2^2 + 0.135X_3^2$ และ $Y_2 = 5.565 + 0.022X_1 + 0.840X_2 - 0.816X_3 - 0.0004X_1X_2 - 0.0005X_1X_3 - 0.00001X_1^2 - 0.028X_2^2 + 0.109X_3^2$ เมื่อ Y_1 และ Y_2 แสดงปริมาณผลผลิตกลูโคสจากการ EnH OPCR เป็นระยะเวลา 24 และ 48 h ตามลำดับ ภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ แบบจำลองได้พยากรณ์ปริมาณผลผลิตกลูโคสจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่เวลา 24 และ 48 h เท่ากับ 15.39 และ 16.40 g/100 g NCR DM., ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่ได้จากการทดลอง 15.82 ± 0.22 และ 16.95 ± 0.31 g/100 NCR DM., บ่งชี้ถึงความสอดคล้องด้วยวิธีหาค่าพยากรณ์ที่ได้จากแบบจำลองและค่าที่ได้จากการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่ากำลังของคลื่นไมโครเวฟ เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่มีนัยสำคัญต่อการยกระดับปริมาณกลูโคส งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบผลกระทบของการ MAP สมบัติทางกายภาพ-เคมี ของ NCR และ PCR โดยใช้เทคนิคภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (XRD), การวิเคราะห์พื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุน (BET & porosity), การวิเคราะห์ค่า Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน (TGA) บ่งชี้ว่าผลของการ MAP ได้เปลี่ยนแปลงสมบัติของ PCR อย่างมีนัยสำคัญอันส่งผลต่อการยกระดับการเข้าทำการของเอนไซม์

และให้ปริมาณผลผลิตกลูโคสอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ เพื่อสนับสนุนอุตสาหกรรมต่อเนื่องภาคเกษตรและพลังงาน จึงได้ศึกษาคุณลักษณะของลิกนินซึ่งตกตะกอนจาก black liquor ที่เหลือจากการ MAP ด้วยสถานะเหมาะสมที่สุดดังกล่าวข้างต้น (MAPL) เทียบกับลิกนินจากการปรับสภาพ NCR ด้วยวิธีการดั้งเดิม (CPL: 40°C, 1 h, 10% w/v NaOH) พบว่าน้ำหนักแห้งของ MAPL และ CPL ที่ได้ มีค่า $1.6032 \pm 0.2469\%$ และ $0.6748 \pm 0.0145\%$ เทียบกับ NCR DM. เมื่อตรวจสอบด้วย FTIR พบว่ามีหมู่โรรมาติก เมทิล คาร์โบไฮเดรต เทียบได้กับ STDL เมื่อทำการตรวจสอบการสลายมวลเมื่อได้รับความร้อน พบว่า STDL, MAPL และ CPL มีร้อยละของมวลคงเหลือที่อุณหภูมิ 800°C เท่ากับ 42.69 ± 0.81 , 41.48 ± 1.94 , 28.76 ± 0.57 ตามลำดับ; ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของ MAPL และ CPL มีค่า 171.87 ± 11.35 และ 65.47 ± 2.29 mg GAE/g lignin คิดเป็น 98.64 และ 37.86% ของ TPC ของ STDL ตามลำดับ; ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 267.32 ± 1.68 และ 146.23 ± 16.09 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 86.00 และ 47.05% ของ DPPH_{AA} ของ STDL ตามลำดับ; ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS_{AA}) ของ MAPL และ CPL มีค่า 545.56 ± 2.76 และ 173.29 ± 5.53 mg TEAC/g lignin คิดเป็น 80.67 และ 25.63% ของ ABTS_{AA} ของ STDL ตามลำดับ; สเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ MAPL สอดคล้องกับสเปกตรากำทอนยอคคลื่นของ CPL คือพบโมโนลิกนอลของทั้ง H G และ S unit ขณะที่ STDL ไม่พบสัญญาณ S unit หรือมีสัญญาณที่น้อยมาก อย่างไรก็ตาม ผลสเปกตรากำทอนแม่เหล็กนิวเคลียร์ของ MAPL แสดงสัญญาณในช่วงของหมู่โรรมาติกมาก ใกล้เคียงกับ STDL จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ MAPL สูงใกล้เคียง STDL ขณะที่ สเปกตรากำทอน CPL แม้จะมีตำแหน่งยอคกราฟ (ชนิดของสาร) ที่สอดคล้องกับ MAPL แต่เป็นสัญญาณที่ต่ำ (ปริมาณสาร) กว่าทั้งสิ้น เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อปรับสภาพลิกนินเซลลูโลสส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพลิกนินในการสร้างผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ STDL ดังนั้น MAPL สามารถพัฒนาต่อไปในการเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

ค่าสูงสุดของผลิตภัณฑ์ฟิงได้ อาจอยู่ที่ตำแหน่ง $X_3 < 3\%$ w/v NaOH เพราะแนวโน้มของเส้นผลิตภัณฑ์ฟิงได้ อาจสูงขึ้นไปนอกกรอบเขต BBD เมื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ลงไปต่ำกว่า 3% w/v, แม้กระนั้นก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเมื่อลดความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ลงแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ฟิงได้สูงขึ้น เพราะผลผลิตฟิงได้เกิดจากอิทธิพลของปัจจัยจำนวนมากที่มีอิทธิพลต่อกันและกัน (ความสัมพันธ์ของ X_1 , X_2 , X_3 ตามสมการพหุนามกำลังสองเมื่อแตกพจน์แล้ว บางอันตรกิริยาอาจมีอิทธิพลทำให้เส้นแนวโน้มเปลี่ยนแปลงได้ โดยเฉพาะเมื่ออยู่นอกกรอบเขตการทดลอง) อย่างไรก็ตาม หากมีผู้สนใจขยายระดับการผลิต ฟิงศึกษาในช่วงความเข้มข้นของสารละลาย

NaOH < 3% w/v ลงไปด้วย ขณะที่ MAPL ลิกนินสามารถพัฒนาต่อไปได้ โดยเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยการแยกแกระดับ (fractionate) ทางเคมีโดยใช้สารละลายหรือตัวทำละลายต่างๆ อาจให้พลังงานจลน์ด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในแต่ละชั้นการแยกแกระดับความสามารถในการทำละลายทางเคมีร่วมด้วย หรือวิธีทางกลเช่นกรองด้วยเซรามิกเมมเบรน ผู้เขียนเชื่ออย่างยิ่งว่าลิกนินที่ได้ในแต่ละช่วงคุณสมบัติการละลายหรือช่วงขนาดโมเลกุลสามารถให้คุณสมบัติจำเพาะที่เด่นชัดขึ้น สำหรับการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลชีพ สารผสมเนื้อฟิล์มเพื่อกรองรังสี UV สมบัติทางความร้อนสำหรับสารผสมพอลิเมอร์ ฯลฯ

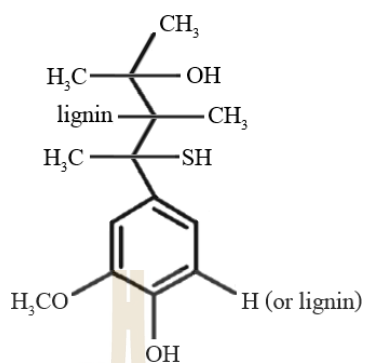




ภาคผนวก

ข้อมูลอ้างอิงประกอบการพิจารณาคุณสมบัติของลิกนิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ ๓.1 STDL, Alkali lignin

Sigma-Aldrich / Merck Co., Ltd.

Name: Lignin, alkali; lignin, kraft

CAS Number 8068-05-0-1

MDL number MFCD09039274

Pcode 1002063141

370959 (100 grams)

Lot#MKBV5831V

Surface tensor 43 mN/m (1% aqueous)

Impurities 5% moisture

Loss 3.3 wt. % loss on heating, @ 149°C

5.7 wt. % loss on heating, @ 204°C

8.5 wt. % loss on heating, @ 260°C

13.4 wt. % loss on heating, @ 316°C

pH 6.2 (25°C, 5% aqueous solution)

Transition temp: sintering point 188°C

Solubility NaOH: 0.05% (warm 5% aqueous)

MEK: partially soluble

Benzene: insoluble

Dioxane: soluble

Ethylene glycol: soluble

Hexane: insoluble

Methanol: partially soluble

Density 1.3 g/mL at 25°C

ตารางที่ ก.1 ลิกนินจากงานของ An et al. (2017) สำหรับวิจารณ์ STDL MAPL และ CPL

วัสดุ	กรรมวิธี	TPC (mg GAE/g)
EHR	ต่อซังข้าวโพดผ่านการระเบิดไอน้ำและย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว ได้สิ่งคงเหลือเรียกว่า EHR	144.19±1.07
EHL	นำ EHR : [สารละลาย 1,4 dioxane/water solution (3:1 v/v)] = 1:30 (g/mL) ผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงอีก 2 h ที่อุณหภูมิห้อง, ปั่นเหวี่ยง ทำเข้มข้นด้วยเครื่องหมุนระเหยสุญญากาศ ทำแห้งเยือกแข็ง ได้ลิกนินดิบ (เพราะไม่ได้ผ่านการกรองหรือสกัดลำดับส่วน) เรียกลิกนินในขั้นนี้ว่า EHL	177.39±0.39
F1	นำ EHL สกัดด้วย dichloromethane (solid liquid 1:40 g/mL) ที่สภาวะคลื่นเสียงความถี่สูงอีก 2 h อุณหภูมิห้อง กรองส่วนที่ละลาย ปั่นเหวี่ยง ทำเข้มข้นด้วยเครื่องหมุนระเหยสุญญากาศ ทำแห้งเยือกแข็ง ได้ลิกนิน F1 fraction; ส่วนที่ไม่ละลายในขั้นนี้ นำไปสกัดต่อด้วย acetic ether	246.13±2.72
F2	ส่วนไม่ละลายก่อนหน้านี้ ถูกนำมาสกัดต่อด้วย acetic ether (solid liquid 1:40 g/mL) ที่สภาวะคลื่นเสียงความถี่สูงอีก 2 h อุณหภูมิห้อง กรองส่วนที่ละลาย ปั่นเหวี่ยง ทำเข้มข้นด้วยเครื่องหมุนระเหยสุญญากาศ ทำแห้งเยือกแข็ง ได้ลิกนิน F2 fraction; ส่วนไม่ละลายนำไปสกัดต่อด้วย n-butyl alcohol	221.45±2.62
F3	ส่วนไม่ละลายก่อนหน้านี้ ถูกนำมาสกัดต่อด้วย n-butyl alcohol (solid liquid 1:40 g/mL) ที่สภาวะคลื่นเสียงความถี่สูงอีก 2 h อุณหภูมิห้อง กรองส่วนที่ละลาย ปั่นเหวี่ยง ทำเข้มข้นด้วยเครื่องหมุนระเหยสุญญากาศ ทำแห้งเยือกแข็ง ได้ลิกนิน F3 fraction	155.41±3.39
F4	ส่วนไม่ละลายก่อนหน้านี้ เรียกว่า F4 residue fraction	157.73±5.25

ตารางที่ ก.2 ช่วงสเปกตรัมและตำแหน่งของสารที่ตอบสนองต่อ $^1\text{H-NMR}$ (An et al., 2017)

δ_{H} (ppm)	Assignments
7.54	Aromatic proton of H units
7.30-6.82	Aromatic protons in G units
6.82-6.30	Aromatic protons in S units
6.3-4.0	Aliphatic protons with the structure of β -O-4, β - β , and β -5
4.0-3.5	Methoxy protons ($-\text{OCH}_3$)
3.10	Protons of hemicellulose anhydroxylose units

ตารางที่ ก.3 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 174.5 ppm

δ_{C} (ppm)	Assignments	References
178-168	Aliphatic carboxyl groups	Ying et al. (2018)
176-160	Carboxyl groups	Nadji et al. (2009)
175-168	Aliphatic COOR	Capanema et al. (2004)
174.5	Aliphatic carboxyl groups	Chen et al. (2010)
173.9	C=O	Yao et al. (2018)

ตารางที่ ก.4 สัญญาณสเปกตรัม δ_{C} 152.1 ppm

δ_{C} (ppm)	Assignments	References
153-152	C_3/C_5 in S units	Nadji et al. (2009)
152.7-152.2	$\text{C}_{3/5}$ in S unit	Yao et al. (2018)
152.5	C_3/C_5 in etherified S units	Wen et al. (2013)a, b
152.3	C_3/C_5 in S unit	Ying et al. (2018)
152.1	C_3/C_5 in etherified S units and B ring of 4-O-5 units	Pu et al. (2013)

ตารางที่ ก.5 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 150-145 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
149.7	C3, etherified G units	Wen et al. (2013)a, b
149.6	C3 in G etherified units	Xue et al (2012)
149.4	C3 in etherified G units	Pu et al. (2013)
149.1	C3 in etherified G type β -O-4 units	Pu et al. (2013)
148.4, 148.0	C3, G units	Wen et al. (2013)a
148.4-148.0	C3, nonetherified G	Wen et al. (2013)b
149.23-147.81	C3, C4 in G type	Liu et al. (2011)
148.0-147.5	C3 in guaiacyl	Yao et al. (2018)
147.5	C4 in G etherified units	Xue et al (2012)
147.5	C4 in G units	Nadji et al. (2009)
146.9	C3 in G nonetherified units	Xue et al (2012)
146.8	C4 in etherified G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a,
146.6	C3 in non-etherified G units (β -O-4)	Pu et al. (2013)
145.8	C4 in non-etherified G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a, Xue et al (2012)
145.5-145.1	C4, non-etherified G	Wen et al. (2013)b

ตารางที่ ก.6 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 130-127 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
129.9, 129.6	H units (p-hydroxyphenyl)	Nadji et al. (2009)
129.2, 128.4	C2/C6, in H units	Xue et al (2012)
129.2	C6 in H unit	Ying et al. (2018)
128.9	C2/6 in p-hydroxyphenyl	Yao et al. (2018)
128.1	C2/C6, (C _{2/6}) in H units	Wen et al. (2013)a, b
128	C2/C6 H unit	Ying et al. (2018)
127.98-127.83	C2, C6 in H type	Liu et al. (2011)

ตารางที่ ก.7 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 120-118 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
119.9	C6 in G units	Pu et al. (2013)
119.8	C6 in G units	Xue et al (2012)
119.8	C6 in etherified and non-etherified G	Wen et al. (2013)b
119.4	C6 in G units	Wen et al. (2013)a
119.1	C6 in G unit	Yao et al. (2018)
119	C6/C5 in G unit	Ying et al. (2018)
118.93	C6 in G type	Liu et al. (2011)
118.4	C6 in G units	Pu et al. (2013)
118.4	C6 in G units	Wen et al. (2013)a

ตารางที่ ก.8 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 116-114 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
116	C3/C-5 in p-coumarate	Wen et al. (2013)a
116	C3/C-5 in p-coumaric ester	Wen et al. (2013)b
115.9-115.1	C5 in guaiacyl unit	Yao et al. (2018)
115.70-	C3, C5 in H type	Liu et al. (2011)
114.61		
115.6	C5 in G unit	Ying et al. (2018)
115.5	C5 in G units	Xue et al (2012)
115.1	C5 in G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a
115	C5 in guaiacyl unit	Yao et al. (2018)
115	C8 in p-coumarate	Wen et al. (2013)a
115	C8 in p-coumaric ester	Wen et al. (2013)b
114.8	C5, etherified and non-etherified G	Wen et al. (2013)b
114.7	C5 in G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a

ตารางที่ ก.9 สัญญาณสเปกตร้า δ_c 112-110 ppm

δ_c (ppm)	Assignments	References
111.8-111.4	C2 in guaiacyl unit	Yao et al. (2018)
113.81- 111.37	C2-C5 in G type	Liu et al. (2011)
111.1	C2 in G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a
111.1	C2 in etherified and non-etherified G units	Wen et al. (2013)b
110.6	C2 in G unit	Ying et al. (2018)
110.5	C2 in G units	Xue et al (2012)
110.4	C2 in G units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a

ตารางที่ ก.10 สัญญาณสเปกตร้า δ_c 104-103 ppm

δ_c (ppm)	Assignments	References
103-107	C2/C6 syringyl	Gonçalves et al. (2000)
104.4	C2/C6, normal S units	Wen et al. (2013)b
104.3	C2/C6, S units	Wen et al. (2013)a
104.3	C2/C6 in S units	Nadji et al. (2009)
104.0-104.1	C2/6 in syringyl	Yao et al. (2018)
104	C2/6 in syringyl	Yao et al. (2018)
103	C2,6 in S unit	Ying et al. (2018)

ตารางที่ ก.11 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 73-70 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
74-72	C_α in β -O-4	Terashima et al. (2002)
74-72	Carbohydrates impurities	Nadji et al. (2009)
72.4	C_α in β -O-4 structures	Nadji et al. (2009)
72.3-72.2	C_α in β -O-4	Yao et al. (2018)
71.8	C_α in G β -O-4 units, C_β of β -O-4 units	Xue et al. (2012)
71.8	C_α in G type β -O-4 units (erythro)	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a
71.7	C_γ in β - β	Yao et al. (2018)
71.7-71.4	C_γ in β - β	Yao et al. (2018)
71.2	C_α in G type β -O-4 units (threo); C_γ in G type β - β	Pu et al. (2013)
71.2	C_α in G type β -O-4 units (threo)	Wen et al. (2013)a
71.17	C_α in H type	Liu et al. (2011)
71.16	C_α in G type	Liu et al. (2011)

ตารางที่ ก.12 สัญญาณสเปกตรัม δ_C 60.5-59.5 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
60.2	C_γ in G type β -O-4 units	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a
60.1	C_γ in β -O-4	Yao et al. (2018)
60	C_γ in G β -O-4 units	Xue et al (2012)

ตารางที่ ก.13 สัญญาณสเปกตรา δ_C 56.5-55.0 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
56.5	-OCH ₃ in G and S unit	Ying et al. (2018)
56.02	-OCH ₃ in G unit	Liu et al. (2011)
56	Methoxyl groups	Xue et al (2012)
56	Methoxyl groups in S and G units	Nadji et al. (2009)
55.8	Aliphatic region -OCH ₃	Coral Medina et al. (2016)
55.8	-OCH ₃	Yao et al. (2018)
55.6	C in Ar-OCH ₃	Pu et al. (2013), Wen et al. (2013)a

ตารางที่ ก.14 สัญญาณสเปกตรา δ_C 35-21 ppm

δ_C (ppm)	Assignments	References
31.5-32.5	C _α in dihydroconiferyl alcohol	Capanema et al. (2004)
29.2	CH ₂ in aliphatic side chain	Wen et al. (2013)a
26.7	CH ₃ or CH ₂ group in saturated side chains	Wen et al. (2013)a
22.69	CH ₃ in H type	Liu et al. (2011)
21.19	CH ₃ in G type composed of the β-O-4 structure	Liu et al. (2011)
21	Methyl carbon in acetyl groups	Wen et al. (2013)b

ตารางที่ ก.15 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน STDL

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
113.4	6.7	Condensed guaiacyl	Yao et al. (2018)

ตารางที่ ก.16 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
147.0-143.0	7.62-7.33	C_7-H_7 in ferulate (FA) and C_7-H_7 in <i>p</i> -coumarate (<i>p</i> CA)	Sagues et al. (2018)
144.8	7.51	C_7-H_7 in <i>p</i> CA and C_7-H_7 in FA	Wen et al. (2013)a
144.5	7.47	$C_\alpha-H_\alpha$ in <i>p</i> CA/FA	Samuel et al. (2014)
143.9	7.51	$C_\alpha-H_\alpha$ in <i>p</i> -coumaroylated substructures	Ying et al. (2018)
143.9	7.48	$C_\alpha-H_\alpha$ in <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Zhou et al. (2016)
128.3	6.45	$C_\alpha-H_\alpha$ in cinnamyl alcohol	Pu et al. (2013)
128.2	7.31	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in H units	Ma et al. (2019)
127.5	7.13	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in H units	Samuel et al. (2014)
113	7.42	C_6-H of G units in 5-5' linkage structure	Chen et al. (2010)
112.7	7.06	C_2-H_2 in G units	Ma et al. (2019)
112.5	7.31	C_2-H_2 in FA	Ma et al. (2019)
110-112	7.31	C_2-H_2 in oxidized ($C_\alpha=O$) G units (G')	Zhou et al. (2016)
106.8	7.32	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in oxidized ($C_\alpha=O$) phenolic S units (S')	Rencoret et al. (2008)
106.4	7.31	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in oxidized ($C_\alpha=O$) phenolic S units (S')	Ying et al. (2018)
106.3	7.32	C_α -oxidized S units (S')	Wen et al. (2013)b
106.3	7.32	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in oxidized S units (S')	Wen et al. (2013)a
105.6	6.72	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Ma et al. (2019)
87.48	5.44	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran substructure	Rao et al. (2017)
87.4	5.47	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran substructures	Rencoret et al. (2008)
87	5.52	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran substructure (β -5/ α -O-4 phenylcoumaran)	Pu et al. (2013)
71.2	3.75	$C_\gamma-H_\gamma$ in phenylcoumaran substructures	Ma et al. (2019)
71.1	4.13	$C_\gamma-H_\gamma$ in resinol substructure (β - β)	Pu et al. (2013)
71.1	3.77	$C_\gamma-H_\gamma$ in resinol substructure (β - β)	Pu et al. (2013)

ตารางที่ ก.16 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL (ต่อ)

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
70	3.5	C $_{\gamma}$ -H of resinol units	Chen et al. (2010)
63.6	3.67	C $_{\gamma}$ -H of phenylcoumaran units	Chen et al. (2010)
61.2	4.09	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ in cinnamyl alcohol end-groups	Wen et al. (2013)a
54	3.45	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran	Xue et al. (2012)
53.7	3.46	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran substructures	Rencoret et al. (2008)
53.7	3.43	C $_{\beta}$ -H of resinol units	Chen et al. (2010)
53.62	3.47	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran substructures	Rao et al. (2017)
53.2	3.76	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumarane substructures	Ma et al. (2019)
53.1	3.46	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran	Wen et al. (2013)a
53.1	3.44	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran substructure (β -5/ α -O-4 phenylcoumaran)	Pu et al. (2013)
53.1	3.43	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in phenylcoumaran substructure	Del Rio et al. (2012)

ตารางที่ ก.17 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน CPL

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
86.1	5.47	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ in resinol substructures	Ma et al. (2019)
84.2	4.69	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ in dibenzodioxocin	Pu et al. (2013)
49.8	2.56	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ in β - β tetrahydrofuran	Wen et al. (2013)a

ตารางที่ ก.18 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน STDL และ MAPL

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
116.1	6.92	C ₅ -H	Chen et al. (2010)
116	6.8	C ₅ -H ₅ in G units	Menezes Nogueira et al (2019)
113.0-109.8	7.42-7.28	C ₂ -H ₂ in FA	Sagues et al. (2018)
62.3	4.08	C _γ -H _γ in dibenzodioxocin	Pu et al. (2013)
62	4.27-4.08	C _γ -H _γ correlation of β-O-4 structure	Wen et al. (2013)b
61.9	4.09	C _γ -H _γ in p-hydroxycinnamyl (sinapyl/coniferyl) alcohol	Rencoret et al. (2008)
61.7	4.15	C _γ -H _γ in cinnamyl alcohol end groups	Xue et al. (2012)
61.7	4.09	C _γ -H _γ in cinnamyl alcohol	Pu et al. (2013)
61.3	4.09	C _γ -H _γ correlation of cinnamyl alcohol end-groups	Wen et al. (2013)b
61.3	4.08	C _γ -H _γ in cinnamyl alcohol end groups	Del Rio et al. (2012)

ตารางที่ ก.19 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL และ CPL

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
129.6	7.25	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in p-hydroxyphenyl (H) units	Menezes Nogueira et al (2019)
129	5.32	C=C in oleofinic structures	Coral Medina et al. (2016)
129	5.32	C=C in oleofinic structures	Coral Medina et al. (2016)
129	7.2	$C_{2,6}-H_{2,6}$	Coral Medina et al. (2016)
129.0-126.0	7.3-7.2	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in pCA	Sagues et al. (2018)
128.4	7.27	$C_{2,6}-H_{2,6}$ aromatic correlations of minor H units	Xue et al. (2012)
127.8	7.22	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in H units	Del Rio et al. (2012)
127.5	7.23	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in H units	Ying et al. (2018)
108.0-102.3	6.8-6.24	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Sagues et al. (2018)
104.7	6.69	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Rencoret et al. (2008)
104.1	6.71	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Menezes Nogueira et al (2019)
104	6.7	$C_{2,6}-H_{2,6}$	Coral Medina et al. (2016)
103.94	6.68	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Rao et al. (2017)
103.9	6.73	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Samuel et al. (2014)
103.9	6.7	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Wen et al. (2013)a
103.8	6.7	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Pu et al. (2013)
103.8	6.69	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Del Rio et al. (2012)
103.8	6.69	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Ying et al. (2018)
103.6	6.7	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in etherified S units	Zhou et al. (2016)
103.5	6.66	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in S units	Wen et al. (2013)b
87.1	5.49	$C_\alpha-H_\alpha$ of the phenylcoumaran C (β -5) structures	Wen et al. (2013)b

ตารางที่ ก.19 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
86.8	5.48	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran	Samuel et al. (2014)
86.8	5.45	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran	Wen et al. (2013)a
86.8	5.43	$C_\alpha-H_\alpha$ in phenylcoumaran substructures	Del Rio et al. (2012)
86.7	4	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to S (thero)	Wen et al. (2013)a
86.6	4.08	$C_\beta-H_\beta$ in dibenzodioxocin	Pu et al. (2013)
86.4	4.11	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to a S unit	Rencoret et al. (2008)
86.3	4.13	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to a S unit ($\beta-O-4$ ether linkage)	Pu et al. (2013)
85.9	4.1	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ substructure linked to a S unit	Del Rio et al. (2012)
85.8	4.12	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$	Coral Medina et al. (2016)
85.8	4.12	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to S (erythro)	Wen et al. (2013)a
85.8	4.09	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to S unit	Samuel et al. (2014)
85.7	4.06	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ (erythro form)	Zhou et al. (2016)
85.6	4.7	$C_\alpha-H_\alpha$ of the resinol ($\beta-\beta$) substructures	Wen et al. (2013)b
85.55	4.67	$C_\alpha-H_\alpha$ in resinol substructures	Rao et al. (2017)
85.5	4.67	$C_\alpha-H_\alpha$ in resinol substructures	Rencoret et al. (2008)
85.2	4.63	$C_\alpha-H_\alpha$ in resinol ($\beta-\beta$)	Pu et al. (2013)
85	4.6	$C_\alpha-H_\alpha$ in resinol ($\beta-\beta$) substructure	Yao et al. (2018)
84.8	4.66	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-\beta$ resinol	Wen et al. (2013)a
84.8	4.65	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-\beta$ resinol substructures	Del Rio et al. (2012)
84.7	4.7	$C_\alpha-H_\alpha$ in spirodienone substructure	Pu et al. (2013)
83.7	4.31	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to a G unit ($\beta-O-4$ ether linkage)	Pu et al. (2013)
83.4	4.38	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ linked to a G unit	Wen et al. (2013)a
83.4	4.27	$C_\beta-H_\beta$ in $\beta-O-4$ substructure linked to a G unit	Del Rio et al. (2012)

ตารางที่ ก.19 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
72.7	4.85	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ substructures	Ma et al. (2019)
72.52	4.83	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ substructures and γ -acylated $\beta-O-4$ substructures	Rao et al. (2017)
72.4	4.86	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linked to a S unit	Rencoret et al. (2008)
72.1	4.86	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linked to a S unit ($\beta-O-4$ ether linkage)	Pu et al. (2013)
72	4.8	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linkage	Yao et al. (2018)
71.8	4.9	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$	Coral Medina et al. (2016)
71.8	4.86	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ unit (erythro)	Wen et al. (2013)a
71.8	4.86	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ unit (threo)	Wen et al. (2013)a
71.8	4.83	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ substructures linked to a S unit	Del Rio et al. (2012)
71.7	4.74	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linked to a G unit	Rencoret et al. (2008)
71.7	4.20-3.84	$C_\beta-H_\beta$ of the resinol B ($\beta-\beta$) substructures	Wen et al. (2013)b
71.7	3.83	$C_\gamma-H_\gamma$ in resinol substructures	Rencoret et al. (2008)
71.65	4.19,	$C_\gamma-H_\gamma$ in resinol substructures	Rao et al. (2017)
	3.91		
71.6	4.88	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ substructures linked to a S unit	Ying et al. (2018)
71.5	4.81	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ (β -aryl-ether units) and $\beta-O-4$ (aryl ethers linkages with an p-hydroxybenzoated-OH at C_γ)	Zhou et al. (2016)
71.4	4.76	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linked to a G unit ($\beta-O-4$ ether linkage)	Pu et al. (2013)
71.2	4.84	$C_\alpha-H_\alpha$ in $\beta-O-4$ linkage	Samuel et al. (2014)

ตารางที่ ก4.19 องค์ประกอบที่พบเฉพาะในลิกนิน MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
71.2	3.82-4.18	$C_\gamma-H_\gamma$ in β - β resinol	Wen et al. (2013)a
71	4.17, 3.81	$C_\gamma-H_\gamma$ in β - β resinol substructures	Del Rio et al. (2012)
70.9	4.71	$C_\alpha-H_\alpha$ in β -O-4 substructures linked to a G unit	Del Rio et al. (2012)
63	4.10-3.8	$C_\gamma-H_\gamma$ of acylated β -O-4	Wen et al. (2013)b
62.8	3.76	$C_\gamma-H_\gamma$ in phenylcoumaran substructure (β -5/ α -O-4 phenylcoumaran)	Pu et al. (2013)
62.6	3.67	$C_\gamma-H_\gamma$ in phenylcoumaran substructures	Del Rio et al. (2012)
62.2	3.76	$C_\gamma-H_\gamma$ in phenylcoumaran	Wen et al. (2013)a
60.1	3.72	$C_\gamma-H_\gamma$ in β -O-4 substructures	Rencoret et al. (2008)
59.5	3.73	$C_\gamma-H_\gamma$ in β -O-4	Coral Medina et al. (2016)
59.5	3.73	$C_\gamma-H_\gamma$ in β -O-4	Coral Medina et al. (2016)
54.15	3.06	$C_\beta-H_\beta$ in resinol substructures	Rao et al. (2017)
54.1	3.06	$C_\beta-H_\beta$ in resinol substructures	Rencoret et al. (2008)
53.6	3.03	$C_\beta-H_\beta$ in resinol substructure (β - β)	Pu et al. (2013)
53.5	3.07	$C_\beta-H_\beta$ in β - β (resinol)	Wen et al. (2013)a
53.5	3.07	$C_\gamma-H_\gamma$ of the resinol (β - β) substructures	Wen et al. (2013)b
53.5	3.05	$C_\beta-H_\beta$ in β - β resinol substructures	Del Rio et al. (2012)

ตารางที่ ก.20 องค์ประกอบที่สามารถพบในได้ในลิกนินทั้ง STDL, MAPL และ CPL

δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
160.0-90.0	8.0-5.5	Aromatic regions	Yao et al. (2018)
150.0-90.0	8.0-6.0	Aromatic regions	Sagues et al. (2018)
135.0-107.0	7.6-6.0	Aromatic regions	Xue et al. (2012)
135.0-100.0	8.0-6.0	Aromatic regions	Xue et al. (2012)
130.2-125.8	7.3-6.92	$C_{2,6}-H_{2,6}$ in <i>p</i> CA	Sagues et al. (2018)
122.0-117.0	6.96-6.53	C_5-H_5 , C_6-H_6 in G units	Sagues et al. (2018)
121.6-113.3	7.00-6.43	C_5-H_5 , C_6-H_6 in G units	Sagues et al. (2018)
120	6.79	C_6-H_6 in G units	Menezes Nogueira et al (2019)
119.8	6.73	C_6-H_6	Chen et al. (2010)
119.67	6.81	C_6-H_6 in G units	Rao et al. (2017)
119.5	6.88	C_6-H_6 in G units	Xue et al. (2012)
119.5	6.77	C_6-H_6 in G units	Rencoret et al. (2008)
119.1	6.8	C_6-H_6 in G units	Pu et al. (2013)
119	6.78	C_6-H_6 in G units	Wen et al. (2013)b
119	6.78	C_6-H_6 in G units	Wen et al. (2013)a
119	6.77	C_6-H_6 in G units	Ying et al. (2018)
118.8	6.75	C_6-H_6 in G units	Zhou et al. (2016)
118.7	6.77	C_5-H_5 and C_6-H_6 in G units	Del Rio et al. (2012)
118.6	6.79	C_6-H_6 in G units	Samuel et al. (2014)
115.8	6.91	C_5-H_5 in G units	Ma et al. (2019)
115.64	6.81	C_5-H_5 in G units	Rao et al. (2017)

ตารางที่ ก4.20 องค์ประกอบที่สามารถพบได้ในลิกนินทั้ง STDL, MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
115.6	6.8	C ₅ -H ₅ in G units	Xue et al. (2012)
115.6	6.77	C _{3,5} -H _{3,5} in <i>p</i> CA	Wen et al. (2013)a
115.5	6.77	C _{3,5} -H _{3,5} of the <i>p</i> CA	Wen et al. (2013)b
115.5	6.77	C _{3,5} -H _{3,5} in <i>p</i> CA	Del Rio et al. (2012)
115.4	6.94	C ₅ -H ₅ in G units	Rencoret et al. (2008)
115.4	6.72	C ₅ -H ₅ in G units	Rencoret et al. (2008)
115.3	6.87	C ₅ -H ₅ in G units	Samuel et al. (2014)
115.1	6.98	C ₅ -H ₅ in G units	Pu et al. (2013)
115.1	6.95	C ₅ -H ₅ in G units	Wen et al. (2013)b
115.1	6.95	C ₅ -H ₅ in etherified G units	Wen et al. (2013)a
115.1	6.72	C ₅ -H ₅ in G units	Ying et al. (2018)
115.1	6.72	C ₅ -H ₅ in G units	Pu et al. (2013)
115	6.8	C ₅ -H ₅ in G units	Zhou et al. (2016)
114.9	6.94, 6.72	C ₅ -H ₅ and C ₆ -H ₆ in G units	Del Rio et al. (2012)
114.8	6.73	C _{3,5} -H _{3,5} in H units	Pu et al. (2013)
114.5	6.7	C ₅ -H ₅	Coral Medina et al. (2016)
114.5	6.7	C ₅ -H ₅ in G units	Wen et al. (2013)b
114.5	6.7	C ₅ -H ₅ in G units	Wen et al. (2013)a
112	7	C ₂ -H ₂	Chen et al. (2010)
112	6.97	C ₂ -H ₂ in G units	Menezes Nogueira et al (2019)
111.7-108.0	7.06-6.93	C ₂ -H ₂ in G units	Sagues et al. (2018)
111.6	6.99	C ₂ -H ₂ in G units	Rencoret et al. (2008)
111.5	7.01	C ₂ -H ₂ in G units	Xue et al. (2012)
111.36	6.95	C ₂ -H ₂ in G units	Rao et al. (2017)

ตารางที่ ก.20 องค์ประกอบที่สามารถพบได้ในลิกนินทั้ง STDL, MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
111.1	6.96	C ₂ -H ₂ in G units	Samuel et al. (2014)
111	7.02	C ₂ -H ₂ in G units	Ying et al. (2018)
111	6.98	C ₂ -H ₂ in G units	Pu et al. (2013)
110.9	6.99	C ₂ -H ₂ in G units	Del Rio et al. (2012)
110.8	6.97	C ₂ -H ₂ in G units	Wen et al. (2013)b
110.8	6.97	C ₂ -H ₂ in G units	Wen et al. (2013)a
110.5	7.02	C ₂ -H ₂ in G units	Zhou et al. (2016)
95-50	6.0-2.5	Oxygenated aliphatic region	Xue et al. (2012)
90-50	5.0-3.0	Aliphatic regions	Sagues et al. (2018)
90-50	6.0-2.5	Oxygenated aliphatic region	Xue et al. (2012)
90.0-45.0	6.0-2.0	Aliphatic regions	Yao et al. (2018)
85.7-82.8	4.46-4.13	C _β -H _β in β-O-4 substructures linked to a G and S unit	Ying et al. (2018)
84.1	4.28	C _β -H _β in β-O-4 linked to G units	Rencoret et al. (2008)
84	4.3	C _β -H _β in β-O-4 linked to G units	Xue et al. (2012)
68.0-62.0	3.73-3.18	Xylan	Sagues et al. (2018)
66.2-59.8	3.70-3.18	Xylan	Sagues et al. (2018)
61.3-59.0	3.72-3.46	Cellulose	Sagues et al. (2018)
61.3-59.3	3.76-3.57	C _γ -H _γ in β-O-4 substructures	Ma et al. (2019)
61.3-59.0	3.72-3.46	Cellulose	Sagues et al. (2018)
60.56-58.98	3.72-3.40	C _γ -H _γ in β-O-4 substructures	Rao et al. (2017)
60.2	3.73, 3.40	C ₅ -H ₅ in β-D-xylopyranoside	Rao et al. (2017)
60.1	3.62	C _γ -H _γ in β-O-4 substructure	Zhou et al. (2016)
60.1	3.4	C _γ -H _γ in β-O-4 substructures	Rencoret et al. (2008)
60	3.6	Evidence of polysaccharides	Sagues et al. (2018)

ตารางที่ 4.20 องค์ประกอบที่สามารถพบได้ในลิกนินทั้ง STDL, MAPL และ CPL (ต่อ)

δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Assignments	References
59.9	3.80-3.35	$C_\gamma-H_\gamma$ in $\beta-O-4$ substructure	Wen et al. (2013)a
59.8	3.62	$C_\gamma-H_\gamma$ in $\beta-O-4$ ether linkage	Pu et al. (2013)
59.7-59.5	3.63-3.40	$C_\gamma-H_\gamma$ in $\beta-O-4$ substructures	Ying et al. (2018)
59.5	3.6, 3.4	$C_\gamma-H_\gamma$ in $\beta-O-4$	Xue et al. (2012)
59.4	3.72, 3.40	$C_\gamma-H_\gamma$ in γ -hydroxylated $\beta-O-4$ substructures	Del Rio et al. (2012)
57.7-54.0	3.94-3.45	Methoxyl groups	Sagues et al. (2018)
56.4	3.7	C-H in methoxyls	Wen et al. (2013)a
56.26	3.74	C-H in methoxyls	Rao et al. (2017)
56.2	3.73	C-H in methoxyls	Rencoret et al. (2008)
56.1	3.77	C-H in methoxyls	Ma et al. (2019)
56.1	3.75	C-H in methoxyl	Zhou et al. (2016)
55.9	3.75	Methoxyl groups	Xue et al. (2012)
55.7	3.7	C-H in methoxyl group	Pu et al. (2013)
55.6	3.76	Methoxyl groups	Wen et al. (2013)b
55.6	3.73	C-H in methoxyls	Del Rio et al. (2012)
55.5	3.7	C-H in methoxyls	Coral Medina et al. (2016)
55.4	3.73	C-H in methoxyl group	Samuel et al. (2014)
55.4	3.72	C-H in methoxyls	Ying et al. (2018)
53.8	3.86	$C_\beta-H_\beta$ in resinol substructures	Ma et al. (2019)
50.0-0	2.5-0	Aliphatic regions	Xue et al. (2012)
40.0-20.0	2.5-1.0	Aliphatic regions	Coral Medina et al. (2016)

ประวัติผู้เขียน

นายศักยะ สมบัติไพรววัน จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย (2548), ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (2552), ปริญญาโท วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเกษตรและอาหาร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (2555), ปริญญาเอก วิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิศวกรรมเกษตรและอาหาร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (2562)

ผลงาน

ศักยะ สมบัติไพรววัน, เทวรัตน์ ตรีอำนาจ และกระวี ตรีอำนาจ. 2555. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับระยะการสุกของมะม่วงน้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว. วารสารสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย. 18(1): 52-58.

ศักยะ สมบัติไพรววัน, เทวรัตน์ ตรีอำนาจ และกระวี ตรีอำนาจ. 2555. การศึกษาการชะลอการสุกของมะม่วงน้ำดอกไม้. ว. วิทย์. กษ. 43 (3 พิเศษ): 355-358.

ศักยะ สมบัติไพรววัน. 2555. การชะลอการสุกของมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยถ่านกัมมันต์. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเกษตรและอาหาร). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 181 หน้า.

Sombatpraiwan, S., Junyusen, T., Treeamnak, T., and Junyusen, P. (2019). Optimization of microwave-assisted alkali pretreatment of cassava rhizome for enhanced enzymatic hydrolysis glucose yield. *in* Wiley online library, **Food Energy Secur.** 8(4): e00174, 15 p.

Sombatpraiwan, S., Junyusen, T., Treeamnak, T., and Junyusen, P. (2019). The evaluation effect of microwave irradiation on the enzymatic digestibility and structural characteristics of cassava rhizome. The 13th SEATUC Symposium. 14th-15th March 2019, **Hanoi University of Science and Technology**. ISSN 2186-7631. 105-109.