การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิก เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคส

Pretreatment of corn husk and coconut husk using ionic liquid to enhance glucose recovery

วัชรี คตินนท์กุล[1]*, เจนจิรา ภูริรักษ์พิติกร[1]
Watcharee Katinonkul[1]*, Jenjira Phuriragpitikhon[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้แสดงการปรับสภาพโดยใช้ของเหลวไอออนิกในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพร้อยละการคืนกลับของน้ำตาลกลูโคสโดยของเหลวไอออนิกที่ใช้ศึกษามีสองชนิดคือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมคลอไรด์ (1-butyl-3-methylimidazolium chloride, BmimCl) และ1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเทต (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, EmimOAc) ภายหลังจากที่วัสดุผ่านการปรับสภาพแล้วจะถูกนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โดยเอนไซม์ที่ใช้คือ Celluclast 1.5L และ Novozymes 188 ซึ่งพบว่าสภาวะการปรับสภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวในการช่วยเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสในรูปของร้อยละคืนกลับสูงสุดคือ การใช้ของเหลวไอออนิกชนิด EmimOAc ปรับสภาพที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นระยะ เวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ผลร้อยละคืนกลับน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ 68.2 และ 62.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับสภาพดังกล่าวสามารถลดปริมาณลิกนินที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวได้มากถึงร้อยละ 9.2 และ 14.6 ตามลำดับ

Abstract

The study demonstrates the ionic liquid pretreatment for lignocellulosic materials like corn husk and coconut husk in order to optimize the yield of glucose recovery. Two ionic liquids: 1-butyl-3-methyl-imidazolium chloride (BmimCl) and 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate (EmimOAc) were studied. The pretreated materials were enzymatically hydrolyzed using Celluclast 1.5L and Novozymes 188. It was found that the optimum pretreatment condition for corn husk and coconut husk were accomplished using EmimOAc at the temperature of 130 °C and duration of 2 hours, resulted in the maximum glucose recovery at 68.2 and 62.8%, respectively. In addition, using ionic liquid pretreatment could decrease the lignin content in corn husk and coconut husk structures for 9.2 and 14.6%, respectively.

คำสำคัญ : วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส, การปรับสภาพ, ของเหลวไอออนิก, การย่อยด้วยเอนไซม์
Keywords : Lignocellulosic materials, Pretreatment, Ionic liquid, Enzymatic hydrolysis

[1]กรมวิทยาศาสตร์บริการ
*Corresponding author E-mail address : kwatcharee@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบันการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงปิโตรเลียมได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยวัสดุหลักที่ใช้ผลิตไบโอเอทานอลคือน้ำตาลกลูโคส วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเป็นน้ำตาลดังกล่าวแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ วัสดุประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัสดุประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ฟางข้าว กากอ้อย แกลบ ซังข้าวโพด และไม้อ่อนชนิดต่างๆ เช่น สน ยูคาลิปตัส เป็นต้น แต่ด้วยข้อจำกัดที่วัสดุสองประเภทแรกนั้นใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ ดังนั้นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีอยู่ปริมาณมากและไม่ได้เป็นพืชอาหารของมนุษย์จึงมีความเหมาะสมมากกว่า กระบวนการย่อยเซลลูโลสของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลนั้นการทำงานของเอนไซม์หรือกรดที่ใช้ในการย่อยนั้นมักถูกกีดขวางโดยปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีหลายประการส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสลดลง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญโดยอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า การปรับสภาพ (pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพคือ การเปลี่ยนหรือกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ที่เป็นสิ่งกีดขวางต่อกระบวน การย่อยเซลลูโลส เพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้นและผลที่ได้คือผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส วัตถุประสงค์ของกระบวนการปรับสภาพคือ กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส เพิ่มพื้นที่ผิวเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัสดุชีวมวล (1) ดังแสดงในรูปที่ 1

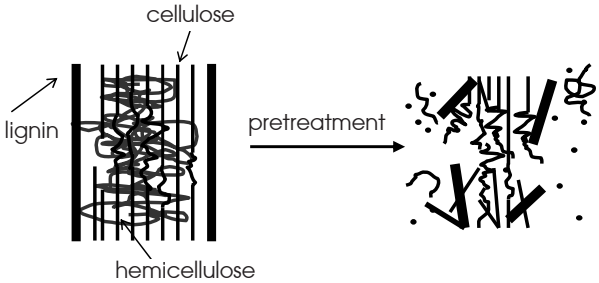

Figure 1 Results in pretreatment of a lignocellulosic material (2)

การปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมีหลายกระบวนการทั้งกระบวนการทางกายภาพ (physical pretreat- ment) โดยการใช้แรงกล เช่น การบด การตัด เป็นต้น การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ (physic-chemical pretreatment) เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion) เป็นต้น การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (chemical pretreatment) เช่น การใช้กรด (acid hydrolysis) การใช้ด่าง (alkaline hydrolysis) การใช้สารละลายอินทรีย์ (organosolve) การใช้โอโซน การกำจัดลิกนินในเซลลูโลสด้วยซัลไฟท์ (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose, SPORL) การใช้ของเหลวไอออนิก (ionic liquid) เป็นต้น และการปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biological pretreatment) เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์จำพวกรา เช่น ราขาว ราน้ำตาล เป็นต้น อย่างไรก็ตามแต่ละกระบวนการปรับสภาพจะส่งผลต่อโครงสร้างของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกกระบวนการปรับสภาพมาใช้ในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุชีวมวลนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิด โครงสร้างทางเคมี และองค์ประกอบอื่นๆ ของวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดเสียก่อน แล้วจึงทำการเลือกกระบวนการปรับสภาพให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ในงานวิจัยนี้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ศึกษาคือ เปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว ทั้งนี้

เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่มากมายในท้องถิ่นและมีเซลลูโลสในปริมาณมาก โดยทั่วไปเปลือกข้าวโพดนอกจากใช้ทำเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์แล้ว ยังใช้ประดิษฐ์งานทางด้านหัตถกรรม เช่น ดอกไม้ประดิษฐ์ ตุ๊กตา เป็นต้น ส่วนเปลือกมะพร้าวโดยทั่วไปใช้ทำกระถางใส่กล้วยไม้ ดังนั้นการเลือกนำวัสดุเหล่านี้มาศึกษาเพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าตัววัสดุเองในแง่ของการนำไปใช้ผลิตน้ำตาลเพื่อผลิตเป็นไบโอเอทานอล กระบวนการปรับสภาพที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิกเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำตาลสูงสุดภายหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยอาศัยหลักการที่ว่าของเหลวไอออนิกสามารถละลายเซลลูโลสได้ดีและบางชนิดยังสามารถละลายลิกนินได้อีกด้วย (3) และด้วยสมบัติที่เป็นสารประเภทเกลือไอออนิกที่คงสถานะเป็นของเหลว ณ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าปกติ ดังนั้นข้อดีของของเหลว ไอออนิก คือ เป็นสารที่ไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ทนต่อความร้อนได้ดี ระเหยกลายเป็นไอได้น้อยและสามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้ง

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

นำเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวมาตัดละเอียดให้มีขนาดความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตรโดยใช้เครื่องตัดประเภท universal cutting mill (FRITSCH, Germany) แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่แห้งและปิดให้มิดชิดเพื่อป้องกันความชื้นก่อนการนำไปใช้งาน ของเหลวไอออนิกที่ใช้คือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมคลอไรด์ (1-butyl-3-methylimidazolium chloride, BmimCl) และ1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเทต (1-ethyl -3-methylimidazolium acetate, EmimOAc) (ยี่ห้อ Sigma-aldrich ความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 90) เนื่องจากทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการละลายเซลลูโลสได้ดี เอนไซม์ที่ใช้คือ Cellulase จาก Trichoderma reesai (ชื่อทางการค้า Celluclast 1.5L) และ Cellobiase จาก Aspergillus niger (ชื่อทางการค้า Novozymes 188), tetracycline, cycloheximide, sodium acetate buffer pH 4.65, แคลเซียมคาร์บอเนต และกรดซัลฟิวริก

Figure 2 Untreated corn husk and coconut husk

2.2 การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิก

ชั่งเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวที่ตัดให้มีขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร 1 กรัม ใส่ในขวดแก้วทนความร้อน อัตราส่วนของของแข็งที่ใช้เป็นร้อยละ 5 ต่อน้ำหนักของของเหลวไอออนิก วางขวดแก้วดังกล่าวลงในอ่างน้ำมันซิลิโคนที่ควบคุมอุณหภูมิและวางอยู่บนเตาความร้อน ใส่แท่งแม่เหล็กเพื่อใช้คนสารละลายของเหลวไอออนิกโดยตั้งความเร็วที่ 250 รอบต่อนาที และคลุมอ่างน้ำมันซิลิโคนด้วยแผ่นอลูมิเนียมเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษาที่อุณหภูมิ 90, 110 และ 130 องศาเซลเซียส เมื่อครบระยะเวลาที่ 120 นาที จึงนำขวดแก้วออกจากอ่างน้ำมันซิลิโคนตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียสจึงเติมน้ำปราศจากไอออนพร้อมคนด้วยแท่งแม่เหล็กเพื่อทำให้เซลลูโลสที่ละลายอยู่ในของเหลวไอออนิกตกตะกอนเป็นเซลลูโลส (regenerated cellulose) อีกครั้งหนึ่ง แยกเซลลูโลสที่ได้ออกจากของเหลวไอออนิก ด้วยวิธีหมุนเหวี่ยง ล้างเซลลูโลสด้วยน้ำปราศจากไอออนจนกระทั่งไม่มีของเหลวไอออนิกหลงเหลืออยู่บนเซลลูโลส โดยวัดจากการนำน้ำล้างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด (FTIR) ซึ่งจะต้องไม่ปรากฏหมู่ฟังก์ชั่นของของเหลวไอออนิก นำเซลลูโลสที่ได้ไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลลูโลสที่ได้นี้จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นน้ำตาลต่อไป

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบในเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว

ปริมาณเซลลูโลส ไซแลน และลิกนินสามารถวิเคราะห์ได้โดยการย่อยตัวอย่างด้วยกรด (acid hydrolysis) ตามด้วยการวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมได้ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทรกราฟีและการวิเคราะห์โดยน้ำหนัก โดยใช้วิธีมาตรฐาน NREL (4, 5) ชั่งตัวอย่าง 0.3 กรัม และเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 72 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 84 มิลลิลิตรเพื่อปรับความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริกเป็นร้อยละ 4 และนำขวดตัวอย่างไปใส่ในเครื่องนึ่งทำลายเชื้อด้วยไอน้ำร้อนแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวที่ได้ซึ่งมีสภาพเป็นกรดไปปรับสภาพเป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และไซแลนด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี (ยี่ห้อ Dionex รุ่น ICS 3000) ระบบของไอออนโครมาโทกราฟีที่ใช้ประกอบด้วยคอลัมน์ชนิด CarboPac PA1 Analytical column โดยทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเครื่องตรวจวัดเป็นชนิดเคมีไฟฟ้า วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือน้ำปราศจากไอออนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ โดยอัตราการไหลที่ใช้คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนปริมาณลิกนินที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble lignin) ภายหลังขั้นตอนการย่อยด้วยกรดสามารถวิเคราะห์ได้โดยการกรองและวิเคราะห์โดยการชั่งน้ำหนักของแข็งที่กรองได้ ส่วนปริมาณลิกนินที่ละลายในกรด (acid-soluble lignin) วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแสงในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาว (UV-visible spectro-photometer) ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร และค่าคงที่การดูดกลืนแสง (extinction coefficient) ที่ใช้คือ 110 ลิตรต่อกรัม-เซนติเมตร

2.4 การย่อยด้วยเอนไซม์ในเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวเพื่อผลิตน้ำตาล

การย่อยเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยเอนไซม์ดำเนินการตามวิธีมาตรฐาน NREL (4) โดยชั่งตัวอย่างให้มีปริมาณเซลลูโลส 0.1 กรัม ใส่ลงในขวดชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเทตบัฟเฟอร์ที่มีค่ากรดเบส (pH) 4.65 และมีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย คือ Tetracycline (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70) และ cycloheximide (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น) ปริมาณ 40 และ 30 ไมโครลิตรตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์ Celluclast 1.5L และ Novozymes 188 ลงไปในปริมาณ 60 FPU ต่อกรัมเซลลูโลส และ 64 pNPGU ต่อกรัมเซลลูโลสตามลำดับ โดยเอนไซม์ Celluclast 1.5L จะทำหน้าที่แตกพันธะบริเวณอสัณฐาน (amorphous sites) ได้เป็นสายโซ่เส้นใหม่และเกิดการแตกออกเป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล (เช่น น้ำตาลสี่โมเลกุล (tetrasaccharides), น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides เป็นต้น) ส่วนเอนไซม์ Novozymes 188 จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลดังกล่าวให้อยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (6) จากนั้นปิดขวดชมพู่และนำไปวางในตู้บ่มเพาะเชื้อชนิดเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายหลังการเก็บตัวอย่างสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ แต่ละครั้งจะต้องนำตัวอย่างดังกล่าวไปจุ่มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นแยกของแข็งออกจากของเหลวด้วยวิธีหมุนเหวี่ยง และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ในแต่ละช่วงเวลาไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องไอออนโครมาโทรกราฟีโดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังที่กล่าวไปแล้วในข้อ 2.3

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 เปรียบเทียบองค์ประกอบของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว

การวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวก่อนการนำไปปรับสภาพเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องศึกษา ทั้งนี้เพื่อใช้เปรียบเทียบว่าภายหลังการปรับสภาพแล้วองค์ประกอบแต่ละชนิดนั้นเปลี่ยนแปลงจากสภาพเริ่มต้นหรือไม่ ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวก่อนการนำไปปรับสภาพ จะเห็นได้ว่าในเปลือกข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ 32) และเฮมิเซลลูโลส (ร้อยละ 35.7) มากกว่าเปลือกมะพร้าวร้อยละ8 และ23.7 ตามลำดับ ในขณะที่เปลือกมะพร้าวมีปริมาณลิกนินทั้งหมด (ร้อยละ 64) มากกว่าเปลือกข้าวโพดถึง 2 เท่า ปริมาณเถ้าในเปลือกข้าวโพดมีน้อยกว่าในเปลือกมะพร้าวประมาณ 3 เท่า และไซแลนซึ่งคำนวณจากน้ำตาลไซโลสในเปลือกข้าวโพดมีปริมาณมากกว่าในเปลือกมะพร้าวประมาณ 2 เท่า

ปริมาณองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้ในงานวิจัยนี้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงอื่นๆ (7, 8) พบว่าได้ค่าต่างกันน้อยกว่าร้อยละ 7 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนต่างๆ ของตัวอย่างที่เลือกนำศึกษา เช่น เลือกเฉพาะเปลือกข้าวโพด ไม่รวมเส้นใยของฝักข้าวโพด เป็นต้น ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตลอดจนวิธีที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์

Table 1 Composition of untreated corn husk and coconut husk (dry basis)

Component (%)	Corn husk	Coconut husk
cellulose	32.0	24.0
Hemicellulose *	35.7	12.0
Total lignin	32.3	64.0
acid soluble lignin	3.67	2.40
acid insoluble lignin	28.6	61.6
ash	2.54	8.48
glucan	35.5	26.6
xylan	4.00	1.82

Note : * hemicellulose (%) = 100-cellulose (%) – lignin (%)

3.2 เปรียบเทียบการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิก

ในงานวิจัยนี้ใช้ของเหลวไอออนิก 2 ชนิดคือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมคลอไรด์ (1-butyl-3-methylimidazo lium chloride, BmimCl) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมอะซิเทต (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, EmimOAc) เพื่อใช้ละลายเซลลูโลสที่มีอยู่ในเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว ณ สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวสามารถละลายได้ดีใน EmimOAc ดังแสดงในรูปที่ 1C และ1D ตาม ลำดับ ในขณะที่ BmimCl สามารถละลายเซลลูโลสที่มีอยู่ในเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวได้เช่นกันแต่น้อยกว่า EmimOAc ดังแสดงในรูปที่ 1A และ1B โดยสังเกตได้จากความสามารถในการละลายเป็นเนื้อเดียวกันและสีที่เข้มน้อยกว่า

Figure 3 Dissolution of Corn husk in BmimCl (A) and EmimOAc (C) and coconut husk in BmimCl (B) and EmimOAc (D)

นอกจากนี้ยังพบว่าของเหลวไอออนิกทั้งสองชนิดสามารถละลายลิกนินที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวได้ โดยสังเกตจากสีของของเหลวไอออนิกที่เปลี่ยนจากใสไม่มีสี (รูปที่ 1 BmimCl) และสีเหลืองอ่อนใส (รูปที่ 1 EmimOAc) เป็นสีน้ำตาลเข้มซึ่งเป็นสีของลิกนินที่ละลายออกมาอยู่ในของเหลวไอออนิก เมื่อเปรียบเทียบสีระหว่างเปลือกข้าวโพดและเปลือก

มะพร้าวจะเห็นได้ว่าสีของเปลือกมะพร้าวที่ละลายในของเหลวไอออนิกทั้งสองชนิดมีสีที่เข้มกว่าเปลือกข้าวโพด ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณลิกนินในองค์ประกอบของเปลือกมะพร้าวมีมากกว่าเปลือกข้าวโพดถึง 2 เท่า ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 1

3.3 การย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตน้ำตาล

ภายหลังจากปรับสภาพตัวอย่างเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิกที่อุณหภูมิ 90, 110 และ 130 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูแคน ไซแลน และลิกนิน เพื่อพิจารณาว่าเปลี่ยนแปลงจากก่อนปรับสภาพมากหรือน้อยเพียงใด ส่วนปริมาณกลูแคนซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเซลลูโลสจะถูกนำมาใช้คำนวณปริมาณเอนไซม์ที่จะเติมลงไป ตารางที่ 2 แสดงปริมาณกลูแคน ไซแลน ลิกนิน ของตัวอย่างภายหลังการปรับสภาพ ณ สภาวะต่างๆ และร้อยละคืนกลับของน้ำตาลกลูโคสที่ได้สูงสุดภายหลังผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5L และ Novozymes 188 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิคงที่ที่ 50 องศาเซลเซียส

Table 2 Experimental data for ionic liquid pretreatment of corn husk and coconut husk

sample	Content (%)		Lignin[a]	glucose
	glucan	xylan	(%)	recovery[b] (%)
Untreated corn husk (ch)	35.5	4.00	32.3	24.4
BmimCl-treated ch at 90°C 2h	33.6	4.45	21.4	30.8
EmimOAc-treated ch at 90°C 2h	30.5	3.91	22.8	48.9
BmimCl-treated ch at 110°C 2h	32.0	5.18	21.8	39.6
EmimOAc-treated ch at 110°C 2h	38.5	4.16	18.9	64.5
BmimCl-treated ch at 130°C 2h	39.0	4.83	24.4	58.2
EmimOAc-treated ch at 130°C 2h	41.5	4.72	23.1	68.2
Untreated coconut husk (cch)	26.6	1.82	64.0	5.4
BmimCl-treated cch at 90°C 2h	23.5	1.85	56.0	2.4
EmimOAc-treated cch at 90°C 2h	25.1	1.73	53.9	4.0
BmimCl-treated cch at 110°C 2h	25.7	2.24	51.5	13.7
EmimOAc-treated cch at 110°C 2h	21.1	1.38	51.7	10.9
BmimCl-treated cch at 130°C 2h	24.7	1.99	54.9	17.1
EmimOAc-treated cch at 130°C 2h	27.2	2.13	49.4	62.8

Note :

[a] lignin (%) = acid-insoluble lignin (%) + acid-soluble lignin (%)

[b] glucose recovery (%) = (maximum glucose released via enzymatic hydrolysis) / (theoretical glucose yield) x 100

ch = corn husk, cch = coconut husk

จากตารางที่ 2 พบว่าปริมาณกลูแคนในตัวอย่างเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวภายหลังการปรับสภาพมีปริมาณไม่แตกต่างจากก่อนปรับสภาพอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ปริมาณไซโลสภายหลังการปรับสภาพแล้วจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยในเปลือกข้าวโพดเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.16 - 1.18 ในขณะที่ในเปลือกมะพร้าวเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.03 - 0.42 ซึ่งสามารถอธิบายการเพิ่มขึ้นของปริมาณไซแลนได้ว่าขณะทำการปรับสภาพนั้นบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในชีวมวลละลายออกมาในของเหลวไอออนิก ดังนั้นภายหลังการปรับสภาพจึงทำให้ปริมาณไซแลนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าของเหลวไอออนิกทั้งสองชนิด เมื่อใช้ปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว ณ สภาวะเดียวกันคือที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะสามารถเพิ่มร้อยละคืนกลับของน้ำตาลกลูโคสได้สูงกว่าโดยสภาวะดังกล่าว เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วย EmimOAc จะให้ผลผลิตน้ำตาลสูงกว่า BmimCl ร้อยละ 10 และมากกว่าเปลือกข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพประมาณ 3 เท่า ในขณะที่การปรับสภาพด้วย BmimCl จะให้ผลผลิตน้ำตาลมากกว่าเปลือกข้าวโพดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ 2 เท่า ส่วนเปลือกมะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วย EmimOAc จะให้ผลผลิตน้ำตาลสูงกว่า BmimCl เช่นกันโดยมากกว่าเปลือกมะพร้าวที่ไม่ผ่านการปรับสภาพถึง 11 และ 3 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับสภาพโดยใช้ของเหลวไอออนิกยังสามารถละลายลิกนินออกจากโครงสร้างชีวมวลโดยปริมาณลิกนินที่มีอยู่ในโครงสร้างของเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวลดลงร้อยละ 9.2 และ 14.6 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้อธิบายสีของของเหลวไอออนิกที่เข้มขึ้นภายหลังการปรับสภาพว่าเป็นสีของลิกนิน ดังแสดงในรูปที่ 1

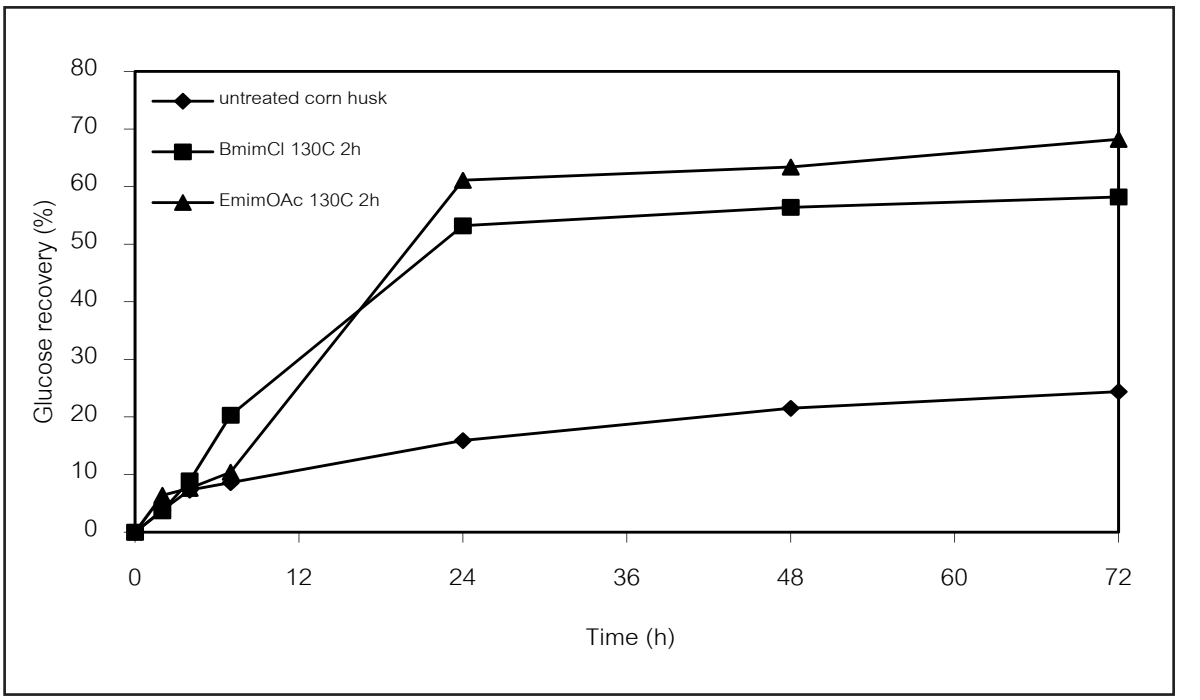

Figure 4 Glucose recovery of untreated and ionic liquid-pretreated corn husk

รูปที่ 3 และ 4 แสดงร้อยละคืนกลับของน้ำตาลกลูโคสจากเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าว ณ เวลาที่ร้อยละ คืนกลับของน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงในช่วงระยะเริ่มต้นและค่อยๆ ลดลงจนคงที่เมื่อเวลาผ่านไป เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวจะพบว่าผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากเปลือกมะพร้าวจะต่ำกว่าเปลือกข้าวโพด ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าโดยธรรมชาติขององค์ประกอบในเปลือกมะพร้าวนั้นมีปริมาณเซลลูโลสน้อยกว่าเปลือกข้าวโพด ยิ่งไปกว่านั้นยังมีปริมาณลิกนินที่สูงถึงร้อยละ 64 ซึ่งส่วนของลิกนินนั้นไม่สามารถใช้ผลิตเป็นน้ำตาลได้ และยังเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้เอนไซม์เข้าถึงพื้นที่การทำปฏิกิริยากับเซลลูโลสได้ยากขึ้นดังนั้นจึงได้ผลผลิตน้ำตาลต่ำกว่าเปลือกข้าวโพด และหากต้องการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสจากเปลือกมะพร้าวให้เพิ่มสูงขึ้น แนวทางการศึกษาต่อไปคือการขจัดลิกนินในเปลือกมะพร้าวให้มีปริมาณลดลงโดยใช้วิธีอื่นก่อนแล้วจึงทำการปรับสภาพด้วยของเหลวไอออนิก

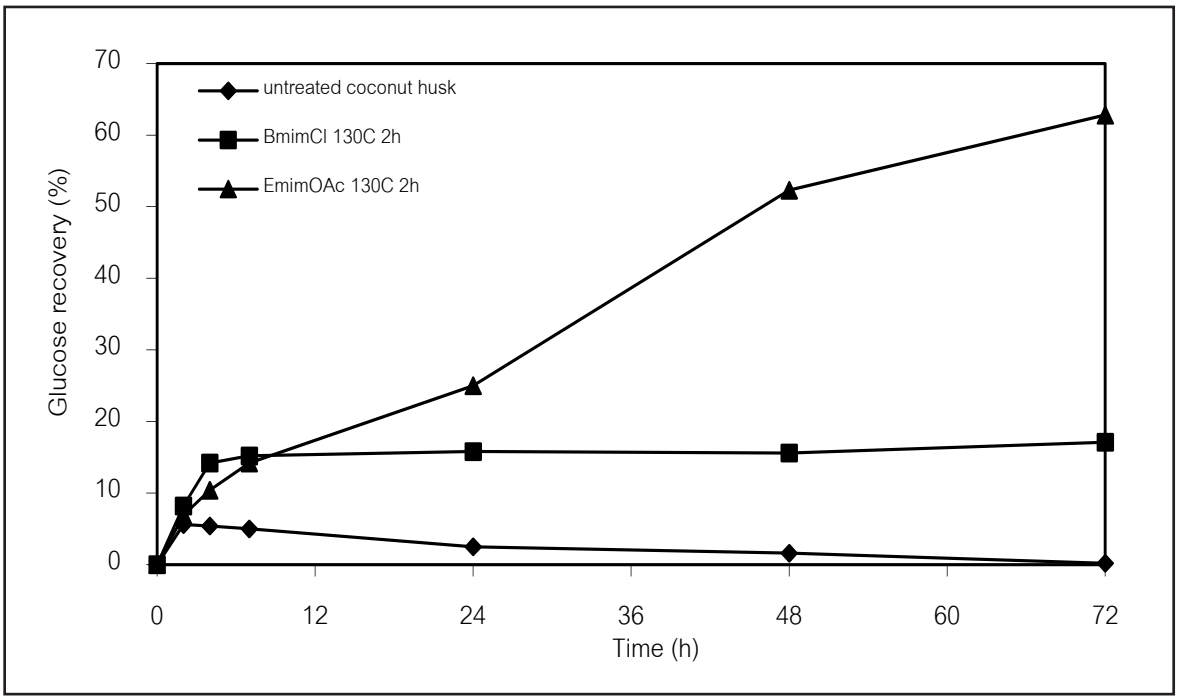

Figure 5 Glucose recovery of untreated and ionic liquid-pretreated coconut husk

4. สรุป (Conclusion)

การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดและเปลือกมะพร้าวด้วยของเหลวไอออนิกสามารถเพิ่มผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเมื่อผ่านขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์สูงขึ้นได้ โดยสภาวะการปรับสภาพที่ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสสูงสุดในชีวมวลทั้งสองชนิดคือที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และของเหลวไอออนิกชนิด EmimOAc จะให้ผลผลิตน้ำตาลที่สูงกว่า BmimCl

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่สนับสนุนทุนวิจัยตลอดโครงการนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักเทคโนโลยีชุมชนและโครงการเคมี กรมวิทยาศาสตร์บริการที่อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือในงานวิจัยครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง (References)

(1) Dadi, A.P., Varanasi, S. and Schall, C.A. "Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step." Biotechnol.Bioeng. 2006, 95, 904-10.

(2) Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." Bioresour. Technol. 2005, 96, 673-86.

(3) Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D. and Rogers, R.D. "Dissolution of cellulose with ionic liquids." J.Am.Chem.Soc., 2002, 124, 4974-75.

(4) NREL, Chemical analysis and testing laboratory analytical procedure (CAT). Golden, CO, USA: National Renewable Energy Laboratory; 2004.

(5) Zhu., L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B. and Holtzapple, M.T. "Structural features affecting biomass enzymatic digestibility." Bioresour. Technol., 2008, 99, 3817-28.

(6) Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O. and Person, V.N. "Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis." J. Biotechnol., 2009, 139, 47-54.

(7) Narenda, R. and Yiqi, Y. " Method of making natural cellulosic fiber bundles from cellulosic source." United State Patent, 2001, US 7887672 B2

(8) Pilanee, V., Waraporn, A., Nanthaya, C., Wuttinunt, K. and Sarima, S. "The potential of coconut husk utilization for bioethanol production." Kasetsart J. (Nat. Sci.), 2011, 45,159-64.