บทความวิจัย

งานประชุมวิชาการทางวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 (TIchE2016)

การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2®

อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา* สุวภัทร ไทยานุสร เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ เมธี สายศรีหยุด
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0–2797–0999 ต่อ 1218 อีเมล: fengjrc@gmail.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2018.03.009
รับเมื่อ 1 มิถุนายน 2560 ตอบรับเมื่อ 30 สิงหาคม 2560 เผยแพร่ออนไลน์ 23 มีนาคม 2561
© 2018 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์ม (Oil Palm Empty Fruit Bunches) ด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® โดยทะลายเปล่าปาล์มจัดว่าเป็นวัสดุหมักประเภทลิกโนเซลลูโลสที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อทำการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของทะลายเปล่าปาล์มพบว่ามีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเท่ากับ 54.74, 21.73 และ 16.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ หลังการทำการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที พบว่าการปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นั้นมีความเหมาะสมมากที่สุดโดยมีปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 14.28 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนินลดลง 3.41 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนัก จากนั้นนำเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ปริมาณ 5, 7, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® ที่ความเข้มข้น 20 FPU/g substrate อัตราการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 5 วัน ของการไฮโดรไลซิส เยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 85.79 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปหาชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 60.29 และ 12.51 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: ทะลายเปล่าปาล์ม, กลูโคส, ไซโลส

การอ้างอิงบทความ: อนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา สุวภัทร ไทยานุสร เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ เมธี สายศรีหยุด, "การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2®," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 28, ฉบับที่ 2, หน้า 285–290, เม.ย.–มิ.ย. 2561.

Research Article

The 26th National Thai Institute of Chemical Engineering and Applied Science Conference (TIChE2016)

Reducing Sugar Production from Empty Fruit Bunches with Enzyme Cellic Ctec2®

Anusith Thanapimmetha*, Suwatipat Tiyanusorn, Penjit Srinophakun and Maythee Saisriyoot

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0–2797–0999 Ext. 1218, E–mail: fengjrc@gmail.com
DOI: 10.14416/j.kmutnb.2018.03.009

Received 1 June 2017; Accepted 30 August 2017; Published online: 23 March 2018
© 2018 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) was an agricultural residue that consists mostly of lignocellulosic material (57.88% cellulose, 23.81% hemicellulose and 16.51% lignin by weight). In this study, OPEFB was pretreated with 10, 15 and 20% (w/v) of sodium hydroxide for 60 minutes. The best pretreatment of OPEFB was 15% of sodium hydroxide. The result of pretreatment showed that the percentage of cellulose increased by 14.28% and the percentages of lignin decreased by 3.41%. After that, the pretreated OPEFB was hydrolyzed by Cellic Ctec2®enzyme with substrate loading of 5, 7, 10 and 15% (w/v), enzyme loading of 20 FPU/g substrate and 140 rpm for 5 days. The highest reducing sugar from OPEFB was 85.79 g·L^{-1} by using 10% substrate loading for 5 days. The reducing sugar consists of 60.29 g/L of glucose and 12.51 g/L of xylose by HPLC analysis.

Keywords: Oil Palm Empty Fruit Bunch, Glucose, Xylose

Please cite this article as: A. Thanapimmetha, S. Tiyanusorn, P. Srinophakun, and M. Saisriyoot, "Reducing sugar production from empty fruit bunches with enzyme Cellic Ctec2®," *The Journal of KMUTNB*, vol. 28, no. 2, pp. 285–290, Apr.–Jun. 2018 (in Thai).

1. บทนำ

ปัจจุบันในกระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงกำลังได้ความสนใจโดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีฐานทางการเกษตรกรรม โดยเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถผลิตได้จากการหมักผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งผลิตผลเหล่านี้ประเทศไทยสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปีและส่งเป็นสินค้าออกเพื่อไปจำหน่ายยังต่างประเทศในราคาที่ค่อนข้างต่ำ ทะลายเปล่าปาล์มก็เป็นชีวมวลทางการเกษตรที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม โดยในแต่ละปีทั่วโลกจะมีทะลายเปล่าปาล์มที่เหลือทิ้งจากโรงงานถึง 37.7 ล้านตัน [1] ซึ่งทะลายเปล่าปาล์มเหลือทิ้งเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ให้เกิดมูลค่ามากขึ้น โดยนำทะลายเปล่าปาล์มมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นก๊าซมีเทน ถ่าน และไม้อัด เป็นต้น [2] นอกจากนี้ทะลายเปล่าปาล์มยังสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้อีกด้วย เนื่องจากทะลายเปล่าปาล์มจัดว่าเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโล และลิกนิน 44.2, 33.5 และ 20.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [3] เมื่อทำการปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มให้เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสด้วยด่างเพื่อกำจัดลิกนิน และลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสแล้ว นำทะลายเปล่าปาล์มนั้นมาทำการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ *Aspergillus niger Aspergillus oryzae* และ *Trichoderma reesei* จากงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ Cellic Ctec2® เพื่อทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ เนื่องจากเอนไซม์ Cellic Ctec2® ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ เซลลูเลส เบต้ากลูโคสซิเดส และไซแลนเนส [4] ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะไปทำการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่ในทะลายเปล่าปาล์มให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อนำไปผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำทะลายเปล่าปาล์มที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์ม (บริษัท สุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม จำกัด) มาทำการล้างน้ำให้สะอาดและอบให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นนำทะลายเปล่าปาล์มมาตัดเพื่อลดขนาดให้มีขนาด 0.3–0.5 มิลลิเมตร นำทะลายเปล่าปาล์มที่ลดขนาดแล้วมาหาองค์ประกอบเบื้องต้นตามวิธีของ Goering และ Van [5]

2.2 การปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำทะลายเปล่าปาล์มที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบมาทำการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นแยกของแข็งออกจากของเหลว นำของแข็งที่ได้ไปล้างด้วยน้ำจนค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับน้ำเริ่มต้น หลังจากนั้นนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการหาองค์ประกอบหลังการปรับสภาพตามวิธีของ Goering และ Van [5]

2.3 การไฮโดรไลซิสทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์

นำเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ปริมาณ 5, 7, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสโดยการเติมเอนไซม์ Cellic Ctec2® (Novozyme เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ ประเทศไทย จำกัด มหาชน) ที่ความเข้มข้น 20 FPU/g substrate ที่อัตราการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตามวิธีของ Miller [6]

2.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาล

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) โดยนำตัวอย่างที่ได้ไปกรองผ่าน Syring Filter (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร) จากนั้นนำตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ไปฉีดผ่าน

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทะลายเปล่าปาล์มก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

องค์ประกอบ	ก่อนการปรับสภาพ	หลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์		
		10% NaOH	15% NaOH	20% NaOH
เฮมิเซลลูโลส	21.73±0.65	7.56±0.94	9.81±0.48	9.08±0.16
เซลลูโลส	54.74±1.85	67.46±0.85	69.02±0.70	70.32±0.43
ลิกนิน	16.17±1.05	16.28±0.71	12.76±0.96	9.21±0.17
เถ้า	0.47±0.02	0.50±0.02	0.03±0.04	0.10±0.05

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (การทดลอง 3 ซ้ำ)

คอลัมน์ Rezex RPM mono saccharide 00H-0135-K0 (300 × 7.8 มิลลิเมตร) ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบอาร์ไอ (RI Detector) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของทะลายเปล่าปาล์ม

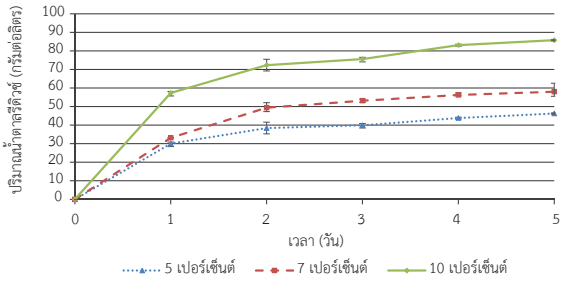
ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบเริ่มต้นของทะลายเปล่าปาล์ม ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 1 พบว่าทะลายเปล่าปาล์มมีค่าเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า มีค่าเท่ากับ 21.73, 54.74, 16.17 และ 0.47 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Ishola M ในปี 2014 [7] ที่พบเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน เท่ากับ 23.04, 39.13 และ 34.37 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ ที่องค์ประกอบของทะลายเปล่าปาล์มมีแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากภูมิประเทศที่ทำการเพาะปลูก และสายพันธุ์ของทะลายเปล่าปาล์ม

3.2 การปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

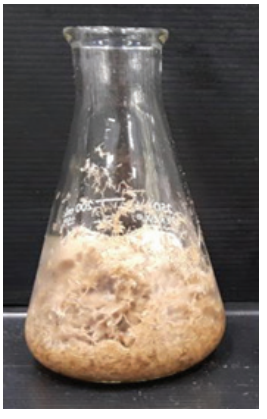
เมื่อทำการปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่ามีปริมาณเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น และปริมาณลิกนินลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dahnum D ในปี 2015 [8] และ L.W. Lai ในปี 2016 [9] โดยปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเท่ากับ 69.02 และ 70.32 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณเซลลูโลสแล้วมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าต่างกันอยู่ 1.29 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อีกทั้งการปรับสภาพวัตถุดิบที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการปรับสภาพวัตถุดิบและเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มคือ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 14.28 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนินลดลง 3.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3.3 การไฮโดรไลซิสทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์

นำเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ปริมาณ 5, 7, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสโดยการเติมเอนไซม์ Cellic Ctec2® ที่ความเข้มข้น 20 FPU/g substrate ที่อัตราการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงในรูปที่ 1 พบว่า การไฮโดรไลซิสทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® ในปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 7 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรมีค่าเท่ากับ 85.79, 58.05 และ 46.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 5



รูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 5, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร หลังการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic CTec2® ที่ความเข้มข้น 20 FPU/g substrate ที่อัตราการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน



รูปที่ 2 ปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร

ของการไฮโดรไลซิส ส่วนปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 2 ไม่สามารถทำการไฮโดรซิสได้ เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มและสารละลายบัพเฟอร์ไม่เหมาะสม ทำให้เยื่อทะลายเปล่าปาล์มดูดซับสารละลายบัพเฟอร์จนไม่สามารถทำการเขย่าได้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มมากขึ้น ในสภาวะที่อัตราส่วนระหว่างเยื่อทะลายเปล่าปาล์มและสารละลายบัพเฟอร์ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Modenbach ในปี 2013 [10]

3.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลหลังจากการไฮโดรไลซิส

นำตัวอย่างหลังการไฮโดรไลซิสที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ประกอบไปด้วยกลูโคสและไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีปริมาณกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 60.29 และ 12.51 กรัมต่อลิตร

4. สรุป

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® พบว่าปริมาณเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® จะได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 85.79 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 60.29 และ 12.51 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทะลายเปล่าปาล์มมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นวัสดุในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัทสุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม ที่ให้ความอนุเคราะห์ทะลายเปล่าปาล์มมาใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณ ห้องปฏิการวิศวกรรมชีวกระบวนการ และภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

[1] X. Cui, X. Zhao, J. Zeng, S. K. Loh, Y. M. Choo, and D. Liu, “Robust enzymatic hydrolysis of Formiline-pretreated oil palm Empty Fruit Bunches (EFB) for efficient conversion of polysaccharide to sugars and ethanol,” *Bioresour Technol*, vol. 166, pp. 584–591, 2014.

[2] S. Sumathi, S. P. Chai, and A. R. Mohamed,

"Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 12, no. 9, pp. 2404–2421, 2008.

[3] F. Hamzah, A. Idris, and T.K. Shuan, "Preliminary study on enzymatic hydrolysis of treated oil palm (Elaeis) Empty Fruit Bunches Fibre (EFB) by using combination of cellulase and β 1-4 glucosidase," *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, no. 3, pp. 1055–1059, 2011.

[4] E. Triwahyuni, Muryanto, Y. Sudiyani, and H. Abimanyu, "The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunches," *Energy Procedia*, vol. 68, pp. 138–146, 2015.

[5] H. K. Goering and P. J. Van, *Forage Fiber Analysis: Apparatus Reagents, Procedures, and Some Applications*, U.S. Government Print. Office, DC: Washington, 1970.

[6] G. L. MILLER, "Use of dinitrosaiicyiic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.

[7] M. M. Ishola, Isroi, and M. J. Taherzadeh, "Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from Oil Palm Empty Fruit Bunches (OPEFB)," *Bioresour Technol*, vol. 165, pp. 9–12, 2014.

[8] D. Dahnum, S.O. Tasum, E. Triwahyuni, M. Nurdin, and H. Abimanyu, "Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch," *Energy Procedia*, vol. 68, pp. 107–1165, 2015.

[9] L. W. Lai and A. Idris, Comparison of steam-alkali-chemical and microwave-alkali pretreatment for enhancing the enzymatic saccharification of oil palm trunk, *Renewable Energy*, vol. 99, pp. 738–746, 2016.

[10] A. Modenbach, "Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modeling and glucose recovery," Ph.D. dissertation, Department of Biosystems and Agricultural Engineering, University of Kentucky, USA, 2013.