



บทความวิจัย

งานประชุมวิชาการทางวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 26 (TichE2016)

การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2®

อนุสิทธิ์ ณะพิมพ์เมธา* สุวัชร ไทยานุสรณ์ 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 เมื่อทำการศึกษาค่าประกอบเบื้องต้นของทะลายเปล่าปาล์มพบว่าปริมาณเซลลูโลส 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 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก 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: อนุสิทธิ์ ณะพิมพ์เมธา สุวัชร ไทยานุสรณ์ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ เมธี สายศรีหยุด, “การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2®,” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, ปีที่ 28, ฉบับที่ 2, หน้า 285-290, เม.ย.-มิ.ย. 2561.

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

ปัจจุบันในกระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงกำลังได้รับความสนใจโดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีฐานทางการเกษตรกรรม โดยเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถผลิตได้จากการหมักผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งผลิตผลเหล่านี้ประเทศไทยสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปีและส่งเป็นสินค้าออกเพื่อไปจำหน่ายยังต่างประเทศในราคาที่ย่อมเยากว่า ทะลายเปล่าปาล์มก็เป็นชีวมวลทางการเกษตรที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม โดยในแต่ละปีทั่วโลกจะมีทะลายเปล่าปาล์มที่เหลือทิ้งจากโรงงานถึง 37.7 ล้านตัน [1] ซึ่งทะลายเปล่าปาล์มเหลือทิ้งเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ให้เกิดมูลค่ามากขึ้น โดยนำทะลายเปล่าปาล์มมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นก๊าซมีเทน ถ่าน และไม้อัด เป็นต้น [2] นอกจากนี้ทะลายเปล่าปาล์มยังสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้อีกด้วย เนื่องจากทะลายเปล่าปาล์มจัดว่าเป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน 44.2, 33.5 และ 20.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ [3] เมื่อทำการปรับสภาพทะลายเปล่าปาล์มให้เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซิสด้วยต่างเพื่อกำจัดลิกนิน และลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลสแล้ว นำทะลายเปล่าปาล์มนั้นมาทำการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซิสเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae* และ *Trichoderma reesei* จากงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอนไซม์ Cellic Ctec2® เพื่อทำการศึกษการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ เนื่องจากเอนไซม์ Cellic Ctec2® ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลักอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ เซลลูเลส เบต้ากลูโคซิเดส และไซแลนเนส [4] ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะไปทำการไฮโดรไลซิสเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่อยู่ในทะลายเปล่าปาล์มให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อนำไปผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

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

2.3 การไฮโดรไลซิสทะลายเปล่าปาล์มด้วยเอนไซม์

นำเยื่อทะลายเปล่าปาล์มที่ผ่านการปรับสภาพแล้วที่ปริมาณ 5, 7, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสโดยการเติมเอนไซม์ Cellic Ctec2® (Novozyme เบรินแนท์ก์ 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 องค์ประกอบทะเลลายเปลาปาเลียมก่อนและหลังการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

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 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของทะเลลายเปลาปาเลียม

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของทะเลลายเปลาปาเลียม ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 1 พบว่าทะเลลายเปลาปาเลียมมีค่าเฮมิเซลลูโลส 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 ที่องค์ประกอบของทะเลลายเปลาปาเลียมมีแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากภูมิประเทศที่ทำการเพาะปลูก และสายพันธุ์ของทะเลลายเปลาปาเลียม

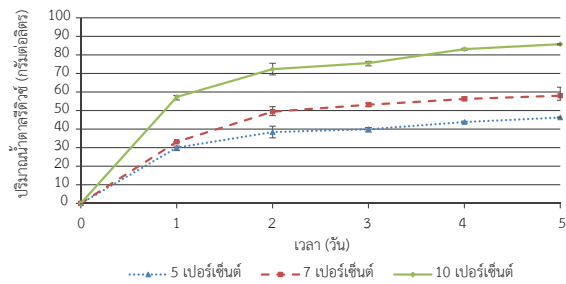
3.2 การปรับสภาพทะเลลายเปลาปาเลียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

เมื่อทำการปรับสภาพทะเลลายเปลาปาเลียมด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 60 นาที และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่า มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น และปริมาณลิกนินลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย

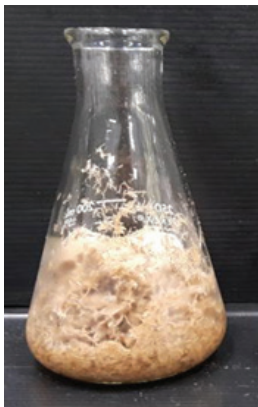
ของ Dahnum D ในปี 2015 [8] และ L.W. Lai ในปี 2016 [9] โดยปริมาณเซลลูโลสที่ได้จากการปรับสภาพโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเท่ากับ 69.02 และ 70.32 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบค่าปริมาณเซลลูโลสแล้วมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าต่างกันอยู่ 1.29 ± 0.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อีกทั้งการปรับสภาพวัตถุดิบที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการปรับสภาพวัตถุดิบและเป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพทะเลลายเปลาปาเลียมคือ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้น 14.28 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และลิกนินลดลง 3.41 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3.3 การไฮโดรไลซิสทะเลลายเปลาปาเลียมด้วยเอนไซม์

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



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



รูปที่ 2 ปริมาณเยื่อหอยเปลือกปาล์มที่ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร

ของการไฮโดรไลซิส ส่วนปริมาณเยื่อหอยเปลือกปาล์มที่ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ดังแสดงในรูปที่ 2 ไม่สามารถทำการไฮโดรไลซิสได้ เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างปริมาณเยื่อหอยเปลือกปาล์มและสารละลายบัฟเฟอร์ไม่เหมาะสม ทำให้เยื่อหอยเปลือกปาล์มดูดซับสารละลายบัฟเฟอร์จนไม่สามารถทำการเขย่าได้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเยื่อหอยเปลือกปาล์มมากขึ้น ในสภาวะที่อัตราส่วนระหว่างเยื่อหอยเปลือกปาล์มและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Modenbach ในปี 2013 [10]

3.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลหลังจากการไฮโดรไลซิส

นำตัวอย่างหลังการไฮโดรไลซิสที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ประกอบไปด้วยกลูโคสและไซโลสเป็นส่วนใหญ่ โดยมีปริมาณกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 60.29 และ 12.51 กรัมต่อลิตร

4. สรุป

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากหอยเปลือกปาล์มด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® พบว่าปริมาณเยื่อหอยเปลือกปาล์มที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร มาทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ Cellic Ctec2® จะได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 85.79 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเท่ากับ 60.29 และ 12.51 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหอยเปลือกปาล์มมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นวัสดุในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในการผลิตเป็นไบโอเอทานอลต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัทสุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม ที่ให้ความอนุเคราะห์หอยเปลือกปาล์มมาใช้ในการงานวิจัย ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการกรรมชีวกระบวนการ 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 dinitrosalicylic 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.