



คุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารสกัด lignin และประสิทธิภาพทางพลังงานของ
กากอ้อยที่เหลือหลังจากการสกัดแยก lignin ด้วยกรดและด่าง
ชุตติมา บุญเรืองรอด¹, ศิริลักษณ์ เลี้ยงประยูร^{2*} และสุมลลิกา โมรากุล¹

Chemical and Biological Characteristics of Lignin and Energy Efficiency
of Acid and Alkali Delignified Bagasse

Chutima Boonruangrod¹, Siriluck Liengprayoon^{2*} and Sumallika Morakul¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

²สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมเกษตรอาคาร 3 ชั้น 7 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, Thailand 10900

²Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute (KAPI), Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, Thailand 10900

* Corresponding author. E-mail address: aapsrl@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ผลผลิตพลอยได้หลักจากอุตสาหกรรมน้ำตาลได้แก่ กากอ้อย ซึ่งมีปริมาณมหาศาลในแต่ละปีและถูกนำมาใช้ประโยชน์หลักในการผลิตเชื้อเพลิงหมุนเวียนในกระบวนการผลิตน้ำตาล งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัด lignin จากกากอ้อยด้วยกรดและด่าง จากนั้นศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้และประสิทธิภาพทางพลังงานของกากอ้อยที่เหลือเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล เนื่องจาก lignin นับเป็น polymer ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจาก cellulose และมีโครงสร้างทางเคมีที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย จากการศึกษาผลได้การสกัดรวมถึงคุณสมบัติของ lignin จากกากอ้อยที่อายุต่างกัน โครงสร้างทางเคมี (FTIR) และคุณสมบัติทางชีวภาพ (antioxidant activity, antimicrobial activity) พบว่าผลได้การสกัดแตกต่างกันไปตามสภาวะการสกัด (1%NaOH และ formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) สัดส่วนของ solid: liquid ratio (1:6 และ 1:12) อายุของกากอ้อย (หลังหีบ 1 วัน, 10-12 เดือน) รวมถึงการ pretreatment (±steam explosion) โดยกากอ้อยเก่าสามารถสกัด lignin ได้โดยไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและให้ผลได้สูงสุดเท่ากับ 26% ในขณะที่กากอ้อยใหม่จำเป็นต้องนำมาผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำโดยได้ผลได้สูงสุด 22% ตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุดคือ 1%NaOH อัตราส่วน 1:12 อย่างไรก็ตาม lignin จากกากอ้อยเก่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าในกากอ้อยใหม่เล็กน้อยซึ่งอาจเนื่องมาจากการเกิด oxidation ของ lignin บางส่วนในสภาวะการเก็บรักษากากอ้อยภายนอกอาคารของโรงงาน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด lignin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1250 µg/ml (MIC) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*, *S. typhimurium* & *V. cholera*) ได้ดีกว่าแกรมบวก (*S. aureus*) นอกจากนี้กากอ้อยที่ผ่านการสกัดแล้วสามารถนำกลับมาใช้ผลิตไฟฟ้าต่อไป โดยให้ค่าพลังงานความร้อนลดลงประมาณ 5-19% เมื่อเทียบกับกากอ้อยที่ยังไม่ผ่านการสกัด

คำสำคัญ: lignin อุตสาหกรรมน้ำตาล สารต้านอนุมูลอิสระ การสกัด lignin ด้วยกรด การสกัด lignin ด้วยด่าง

Abstract

Large amount of sugar industrial by products mainly bagasse is generated annually and mostly used to produce energy for sugar industry itself. The present work aims at extracting lignin from bagasse using acid and alkali delignification methods. The obtained lignin was characterized for its chemical and biological characteristics including the energy efficiency of delignified bagasse. Indeed, lignin becomes more attractive due to its second largest amount compared to cellulose. Moreover, its chemical structures indicate high potential to be developed for various applications. From extraction process, yield of extracted lignin was varied according to extracting media (1%NaOH and formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v), solid: liquid ratio (1:6 and 1:12), state of obtained bagasse (1 day and 12 day after juice extraction) and pretreatment process (steam explosion).



Extraction of twelve month stored bagasse under alkali condition without pretreatment provided the highest yield of 22%. Meanwhile, pretreatment for new bagasse seems necessary in order to improve extraction efficiency when using 1%NaOH at 1:12 ratio. In addition, lignin obtained from twelve month bagasse provided poorer antioxidant activity assessed by DPPH compared to that from new bagasse. This could be due to partial oxidation of lignin under outdoor storage condition of bagasse. Concerning antimicrobial activity, all lignin obtained from all extraction conditions at the concentration of 1,250 $\mu\text{g/ml}$ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) could inhibit microbial growth. The better inhibition was observed in gram negative bacteria (*E. coli*, *S. typhimurium* and *V. cholera*) than gram positive bacteria (*S. aureus*). In addition, delignified bagasse could be reutilized as an energy source with slight reduction of heat building capacity around 5 - 19% compared to normal bagasse.

Keywords: Lignin, Sugar Industry, Antioxidant, Acid delignification, Alkali delignification

บทนำ

ในแต่ละปีอุตสาหกรรมน้ำตาลในประเทศไทยมีปริมาณอ้อยเข้าหีบจำนวนมาก ซึ่งจากข้อมูลรายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานทั่วประเทศประจำปีการผลิต 2557/58 (ฉบับปิดหีบอ้อย) พบว่ามีปริมาณอ้อยเข้าหีบทั้งหมดประมาณ 105.96 ล้านตัน (รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศประจำปีการผลิต 2557/58 (ฉบับปิดหีบอ้อย), 2015) ส่งผลให้มีปริมาณผลผลิตพลอยได้จำนวนมากจากโรงงานน้ำตาลเกิดขึ้นซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายรูปแบบ โดยเฉพาะกากอ้อยซึ่งมีประมาณ 18 ล้านตัน ซึ่งส่วนใหญ่มีการนำกลับมาใช้เป็นพลังงานหมุนเวียนภายในโรงงาน (del Río et al., 2015) และ/หรือใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (Sena-Martins, Almeida-Vara, & Duarte, 2008) กากหม้อกรองถูกนำไปใช้เป็นปุ๋ย (Meunchang, Panichsakpatana, & Weaver, 2005) รวมไปถึงการนำกากน้ำตาลไปใช้ในการผลิตเอทานอล ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากพยายามเพิ่มประสิทธิภาพและมูลค่าจากการนำผลผลิตพลอยได้ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน การสำรวจหาสารที่มีมูลค่าสูงที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ นับเป็นอีกแนวทางที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลพลอยได้เหล่านั้น รวมไปถึงเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าโดยรวมของอุตสาหกรรมน้ำตาลอีกด้วย

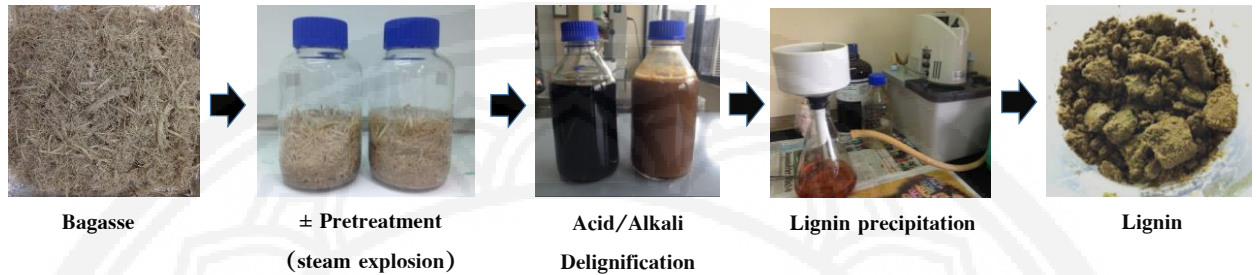
จากแนวคิดของระบบโรงกลั่นชีวภาพ (biorefinery) ที่ต้องการลดสถานะการขาดแคลนวัสดุเชื้อเพลิงในระบบโรงกลั่นปิโตรเคมี โดยเฉพาะน้ำมันดิบและฟอสซิลต่างๆ จึงได้หันมาใช้วัสดุทางเลือกที่สามารถใช้ประโยชน์

หมุนเวียนได้ (renewable feedstock) โดยชีวมวล (biomass) จัดเป็นวัสดุหมุนเวียนชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพเพียงพอต่อความต้องการทางด้านวัสดุและพลังงานของมนุษย์ในอนาคต ซึ่งชีวมวลจากพืชจะประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ เช่น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ มากมาย โดย lignin เป็น aromatic polymer ที่พบมากที่สุดในโลก มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น phenylpropane และมีโมเลกุลที่ซับซ้อนมากทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน อีกทั้งยังเป็นเสมือนเกราะป้องกันการทำลายจากจุลินทรีย์ ส่งผลทำให้แยก lignin ออกได้ยาก ในการผลิตเยื่อกระดาษโดยส่วนใหญ่จึงใช้ Sodium Hydroxide (NaOH) หรือโซดาไฟในการต้มภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง เพื่อให้สามารถแยก lignin ได้และนำเส้นใยไปใช้ประโยชน์ จากนั้น lignin จะถูกแยกออกจากโซดาไฟเพื่อนำโซดาไฟกลับไปใช้ใหม่ โดย lignin จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบที่ไม่ซับซ้อนและมีมูลค่าต่ำ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้ (Arshad & Ahmed, 2016) สารเชื่อมเนื้อไม้ (Ghaffar & Fan, 2014) และยางมะตอยธรรมชาติ เป็นต้น อย่างไรก็ตามหากพิจารณาการนำ lignin มาใช้ประโยชน์กระบวนการดังกล่าวซึ่งเป็นสถานะที่รุนแรงทำให้ lignin ถูกตัดแปลงโครงสร้างมากขึ้น รวมถึงแนวโน้มงานวิจัยในปัจจุบันที่พบว่า lignin มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ได้อีก ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองสกัด lignin จากกากอ้อยด้วยสถานะที่ไม่รุนแรงเนื่องจากต้องการลดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่อาจเกิดขึ้นของ lignin รวมถึงเพื่อช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้กรด (formic acid: acetic acid: H₂O, 30: 55: 15 (v/v/v)) และด่าง (1% NaOH) ตามงานวิจัยของ

Delmas (2011) และ Zabaleta (2012) ตามลำดับ จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพของ lignin ที่สกัดได้จากกากอ้อย และตรวจสอบค่าพลังงานความร้อน

ของกากอ้อยที่เหลือจากการสกัด เพื่อนำกลับมาเผาเป็นพลังงานหมุนเวียนต่อไป

วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์



รูปที่ 1 ขั้นตอนโดยรวมของการศึกษาคูสมบัติต่างๆ ของสารสกัด lignin จากกากอ้อย

1. ตัวอย่างกากอ้อย

ตัวอย่างกากอ้อยแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ ตัวอย่างกากอ้อยใหม่ที่เก็บหลังการหีบ 1 วันและกากอ้อยเก่าอายุ 12 เดือน กากอ้อยทั้งสองชนิดได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานรวมเกษตรกรอุตสาหกรรม (99 หมู่ 10 ต.โคกสะอาด อ.ภูเขียว จ.ชัยภูมิ 36110) หลังการเก็บตัวอย่างกากอ้อยจะถูกนำมาอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน (RF115 (230V), Art. No. 9090-0009, Redline, Germany)

ที่อุณหภูมิ 40°C ใช้เวลาประมาณ 4 วัน จนกระทั่งกากอ้อยมีความชื้น (moisture) ประมาณ 20% หาคความชื้นโดยนำตัวอย่างไปอบที่ 105°C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งน้ำหนักแล้วใส่ตัวอย่างประมาณ 5 กรัม จากนั้นนำไปอบที่ 105°C นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักแล้วนำไปอบต่อจนน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ (ตามมาตรฐาน ASTM D3173) คำนวณผลตามสมการ (1)

$$M = (W_1 - W_2) / W \times 100 \quad (1)$$

M = ร้อยละของปริมาณความชื้น (%moisture)

W_1 = น้ำหนักถ้วยและตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักถ้วยและตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

1. การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

นำกากอ้อย 100 กรัม มาผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำตามวิธีการของ (Cara et al., 2008) ด้วยเครื่องระเบิดเยื่อ (Nitto Koatsu, Japan) ที่อุณหภูมิ 210°C ความดัน 1.3 MPa เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำจืดสะอาด ก่อนนำไปสกัด lignin

2. การสกัด lignin (Delignification)

ทำการสกัดกากอ้อยในสภาวะที่เป็นกรดและต่างดังนี้ สภาวะกรดใช้สารผสม formic acid: acetic

acid: H₂O (30:55:15 v/v/v) ที่ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:6 และ 1:12 (w/v) (Delmas, 2011) หลังจาก autoclave ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Tomy SX-700 Vertical Autoclave, TOMY Digital Biology, Japan) กรองกากอ้อยออกก่อนตกตะกอน lignin ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรอง lignin ผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



การสกัดในสภาวะต่างใช้สารละลาย 1% NaOH ที่ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:6 และ 1:12 (w/v) (Zabaleta, 2012) หลังจาก autoclave ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Tomy SX-700 Vertical Autoclave, TOMY Digital Biology, Japan) กรองกากอ้อยออกก่อนตกตะกอน lignin โดยการปรับ pH ของสารสกัดให้เท่ากับ 2 ด้วยสารละลาย 50% H₂SO₄ จากนั้นกรอง lignin ผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลได้การสกัดของกากอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ

3. การวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อน

นำกากอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการสกัดมาวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อน (Gross Calorific Value) ด้วยเครื่อง Bomb Calorimeter (IKA C-5000 Automated Bomb Calorimeter, IKA Laboratory Equipment, Germany) ตามวิธีการทดสอบของมาตรฐาน ASTM D5865

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์ TPC ด้วย Folin-Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีการของ (Wolfe, Wu, & Liu, 2003) โดยใช้ gallic acid ความเข้มข้น 0-200 µg/ml ในน้ำกลั่น และ kraft lignin ความเข้มข้น 0-

800 µg/ml ใน DMSO เป็นสารละลายมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments, Japan) ที่ความยาวคลื่น 760 nm

5. วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR

นำตัวอย่าง lignin น้ำหนัก 10 mg มาบดเป็นผง ศึกษาโครงสร้างโมเลกุลด้วย ATR-FTIR (Nicolet IR200, Thermo Fisher Scientific, USA) ในช่วงคลื่น 4000-400 cm⁻¹, Resolution 4 cm⁻¹, 128 scan วิเคราะห์โครงสร้างด้วย OMNIC8 software

6. วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยเทคนิค DPPH

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH ดัดแปลงวิธีการจาก Fagali and Catalá (2008) โดยนำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.25 mM ใน DMSO จำนวน 1 ml มาผสมกับสารละลายตัวอย่าง lignin 0.1 mg/ml ใน DMSO จำนวน 1 ml วัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments, Japan) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่ 0-60 นาที แล้วรายงานผลในรูป %DPPHremaining เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0, 0.001, 0.01 mg/ml ใน DMSO และ kraft lignin ที่ 0, 0.05 และ 0.1 mg/ml ใน DMSO ดังสมการ (2)

$$\%DPPH_{\text{remaining}} = (A_f / A_0) \times 100 \quad (2)$$

A_f = ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงเวลา

A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงที่จุดเริ่มต้น

2. ทดสอบการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)

ทำการทดสอบการยับยั้ง (MIC, minimal inhibitory concentration) และการทำลาย (MBC, minimal bactericidal concentration) เชื้อจุลินทรีย์ ดัดแปลงวิธีการจาก (Basri & Fan, 2005) โดยนำสารสกัด lignin ละลายใน DMSO ที่ความเข้มข้น 1250 และ 2500 µg/ml มาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (DMST 8840), *Escherichia coli* (DMST 4212), *Salmonella*

typhimurium (DMST 562), *Vibrio cholera* (DMST 15778)

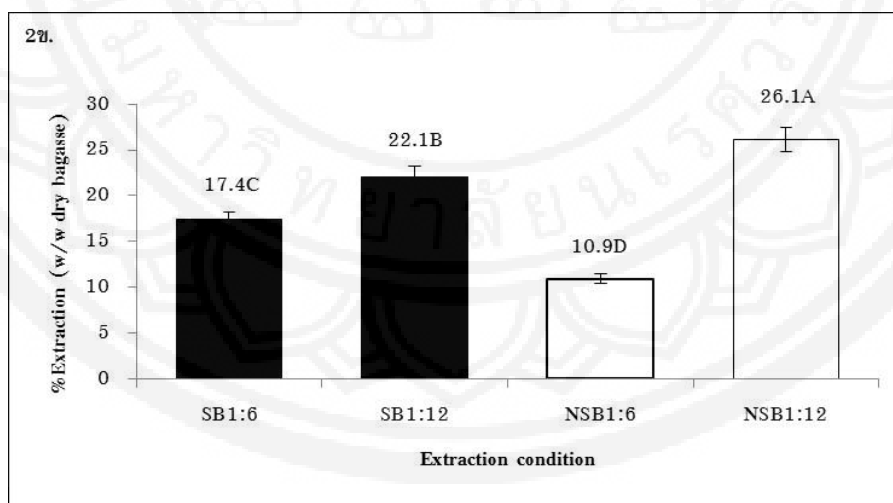
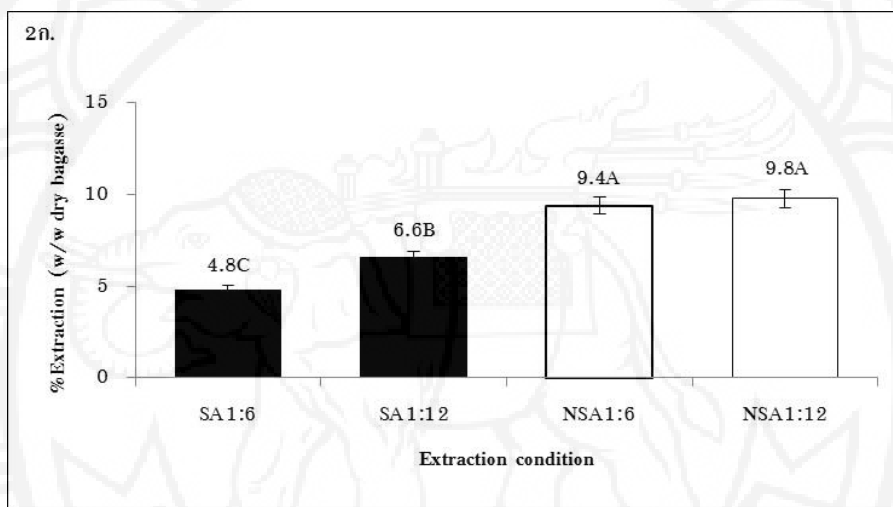
ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

1. ผลของการสกัด lignin จากกากอ้อย

เบื้องต้นได้ทำการสกัด lignin จากกากอ้อยอายุ 12 เดือน เนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ตลอดปี โดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลที่อ้อย และเปรียบเทียบผลได้ในสภาวะการสกัดต่างๆ ดังนี้



- SA 1:6 : Pretreatment (steam explosion) + acid hydrolysis + solid: liquid ratio (1:6)
- SA 1:12 : Pretreatment (steam explosion) + acid hydrolysis + solid: liquid ratio (1:12)
- NSA 1:6 : No-pretreatment + acid hydrolysis + solid: liquid ratio (1:6)
- NSA 1:12 : No-pretreatment + acid hydrolysis + solid: liquid ratio (1:12)
- SB 1:6 : Pretreatment (steam explosion) + alkali hydrolysis + solid: liquid ratio (1:6)
- SB 1:12 : Pretreatment (steam explosion) + alkali hydrolysis + solid: liquid ratio (1:12)
- NSB 1:6 : No-pretreatment + alkali hydrolysis + solid: liquid ratio (1:6)
- NSB 1:12 : No-pretreatment + alkali hydrolysis + solid: liquid ratio (1:12)



หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน (A, B, C, D) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 2 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อยเก่า (%yield, w/w กากอ้อย) ที่ได้จากสภาวะการสกัดด้วยกรด (ภาพที่ 2ก.) และด่าง (ภาพที่ 2ข.)



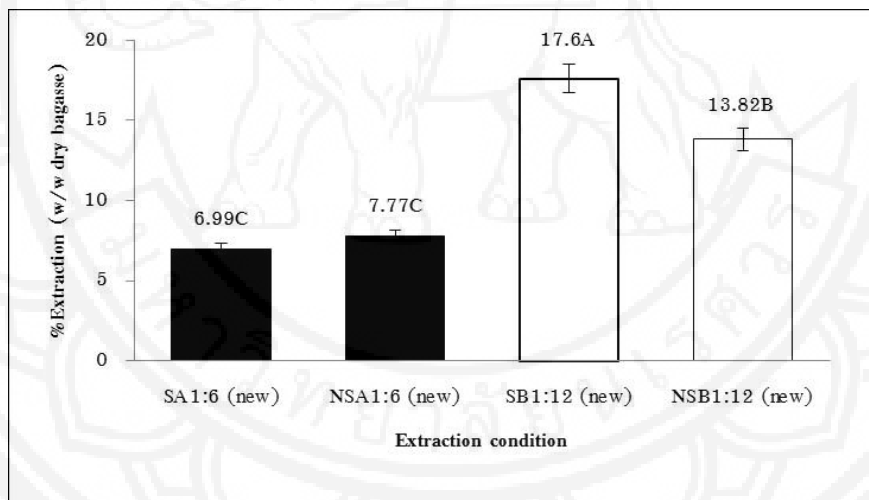
จากสภาวะการสกัดด้วยกรดดังแสดงในภาพที่ 2 ก. พบว่าผลได้การสกัดอยู่ในช่วง 4.8–9.8% (โดยน้ำหนักแห้งกากอ้อย) โดยการใช้อัตราส่วนของ solid : liquid ที่ 1:6 และ 1:12 ในกากอ้อยที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด lignin (NSA1:6 : NSA1:12 เท่ากับ 9.4% : 9.8%) ในขณะที่กากอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้ผลการสกัดเพิ่มขึ้น (SA1:6 : SA1:12 เท่ากับ 4.8% : 6.6%) อย่างไรก็ตามตัวอย่างกากอ้อยที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำให้ผลได้ของ lignin มากกว่าการนำกากอ้อยมาผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำก่อนการสกัด

ในการสกัดในสภาวะต่าง (ภาพที่ 2ข.) พบว่าให้ผลได้การสกัดสูงกว่าการใช้กรดประมาณ 1–3.6 เท่า (SB1:6 : SB1:12 เท่ากับ 17.4% : 22.1% และ NSB1:6 : NSB1:12 เท่ากับ 10.9% : 26.1%) โดยการเพิ่มอัตราส่วนของต่างทำให้ผลได้การสกัดเพิ่มขึ้นทั้งในตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ โดย

การนำกากอ้อยเก่ามาสกัด lignin เพื่อใช้ประโยชน์ กล่าวได้ว่าการระเบิดโครงสร้างของกากอ้อยด้วยไอน้ำอาจไม่จำเป็น หากพิจารณาผลได้กับขั้นตอนการสกัดที่เพิ่มขึ้นจากขั้นตอนนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด lignin ด้วยกรดคือ NSA1:6 และในสภาวะต่างคือ NSB1:12 โดยจะได้ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของ lignin ที่สกัดได้จากทั้งสองสภาวะต่อไป

2. ผลของอายุกากอ้อยต่อผลได้การสกัด lignin

เนื่องจากกากอ้อยที่ได้จากโรงงานมีอายุการเก็บรักษาที่แตกต่างกันตามสภาพการจัดการของโรงงานและการนำไปใช้ประโยชน์ ในขั้นตอนนี้จะเปรียบเทียบผลได้การสกัดของกากอ้อยใหม่ที่เก็บหลังจากการหีบ 1 วัน (ภาพที่ 3) เมื่อใช้อัตราส่วนของ solid : liquid ratio ที่เหมาะสมสำหรับกรดและต่างจากขั้นตอนที่ 1 และเปรียบเทียบผลของการระเบิดด้วยไอน้ำต่อผลได้การสกัด



หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (A, B, C) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

รูปที่ 3 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ (%yield, w/w กากอ้อย) ที่จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ

จากการใช้อัตราส่วนของ solid: liquid ที่เหมาะสมด้วยกรด (1:6) และ ต่าง (1:12) ในการสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ พบว่าการใช้กรดให้ผลได้ไม่แตกต่างกันทั้งในตัวอย่างที่ผ่าน (SA1:6(new)) และไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ (NSA1:6(new)) เท่ากับ 6.99 และ 7.77% ตามลำดับ ในขณะที่การสกัดกากอ้อย

ใหม่ด้วยต่างนั้นการระเบิดด้วยไอน้ำสามารถเพิ่มผลได้การสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญคือจาก 13.8% เป็น 17.6%

ผลได้ของ lignin ที่ต่างกันเมื่อผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำระหว่างกากอ้อยเก่า (ภาพที่ 2) กับกากอ้อยใหม่ (ภาพที่ 3) นั้นอาจเกิดจากความแข็งแรงของโครงสร้าง lignocellulose ในกากอ้อยใหม่ที่มีมากกว่ากากอ้อยเก่าทำ



ให้การสกัดด้วยต่างเพียงอย่างเดียวไม่สามารถแยก lignin ออกได้ จึงจำเป็นต้องนำกากอ้อยมาผ่านกระบวนการ pretreatment ในกรณีของกรดซึ่งผลได้ไม่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากการสลายพันธะ (hydrolysis) ester และ ether ระหว่าง lignin และ polysaccharides มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ต่าง

3. ค่าพลังงานความร้อน

เพื่อตรวจสอบว่ากากอ้อยที่เหลือจากการสกัด lignin สามารถนำคืนเข้าสู่กระบวนการผลิตเชื้อเพลิงตามปกติของโรงงานได้หรือไม่ จึงทำการเปรียบเทียบค่าพลังงานความร้อนที่ได้จากกากอ้อยเก่าและใหม่ที่ผ่านมาและไม่ผ่านกระบวนการสกัด โดยก่อนการวิเคราะห์ค่าพลังงานได้ทำการอบตัวอย่างกากอ้อยเพื่อให้ความชื้นไม่เกิน 10% ผลค่าพลังงานความร้อนดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าพลังงานความร้อนของกากอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการสกัดจากสภาวะต่างๆ

Samples	% moisture	energy power (cal/g)	Energy power (watt-hour)	% ค่าพลังงานความร้อนที่ลดลง (ต่อความร้อนของกากอ้อยก่อนสกัด)
Bagasse	4.7	4129	4.80	-
NSA 1:6	6.5	3744	4.35	9.38
NSB 1:12	10.6	3350	3.90	18.8
Bagasse (new)	4.1	4268	4.96	-
SA 1:6 (new)	5.5	4180	4.86	2.02
NSA 1:6 (new)	5.7	4145	4.70	5.24
SB 1:12 (new)	8.4	3693	4.29	13.5
NSB 1:12 (new)	9.9	3663	4.26	14.1

ผลพบว่าค่าพลังงานแบบ Gross Calorific Value ซึ่งแสดงผลค่าความร้อนจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงจากกากอ้อยเก่าและใหม่ที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดจะให้ใกล้เคียงกันคือ 4129-4268 cal/g หรือคิดเป็นกำลังไฟประมาณ 5 watt/hour ซึ่งหลังจากการผ่านกระบวนการสกัดพบว่าในกากอ้อยที่เหลือจากการสกัดด้วยกรดให้ค่าพลังงานความร้อนลดลงเพียงเล็กน้อยคือ ในกากอ้อยเก่าลดลง 9.38% และ ในกากอ้อยใหม่ลดลง 2.02-5.24% ในขณะที่กากอ้อยที่เหลือจากการสกัด lignin ออกด้วยต่างค่าพลังงานความร้อนลดลงสูงกว่าคือ ในกากอ้อยเก่าลดลง 18.8% และในกากอ้อยใหม่ลดลง 13.5-14.1% โดยค่าความร้อนที่ลดลงของกากอ้อยก่อนและหลังการสกัดสอดคล้องกับผลได้การสกัด lignin ในกากอ้อยแต่ละประเภท กล่าวคือพลังงานความร้อนที่ลดลงเนื่องมาจาก lignin ที่ถูกสกัดออกไปนั้นเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ให้พลังงานเช่นกัน และเป็นที่น่าทึ่งที่ว่าโรงงานเยื่อส่วนใหญ่มีการนำ black liquor ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการ delignification และมี lignin

เป็นองค์ประกอบหลักไปใช้ในการเผาเพื่อเป็นพลังงานหมุนเวียนด้วยเช่นกัน

4. ปริมาณ total phenolic content (TPC) lignin

ปริมาณ total phenolic content (TPC) ของสารสกัด lignin เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และ kraft lignin แสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาค่า TPC จากการใช้กรดและต่างโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในรูป kraft lignin และ gallic acid พบว่าโครงสร้างของสารสกัดที่ได้ส่วนใหญ่เป็น lignin ในขณะที่โครงสร้างบางส่วนเทียบได้กับ gallic acid ซึ่งอาจเป็นสาร polyphenols ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่า ที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกันหรือเกิดจากการ depolymerization อันเนื่องมาจากสภาวะในการสกัด

ในกากอ้อยใหม่ที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยต่างสารสกัดที่ได้จะมีค่า TPC (w/w lignin) ในรูป kraft lignin และ gallic acid สูงสุด คือ 76.6 และ 22.7% ตามลำดับ ในขณะที่กากอ้อยที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำทั้งเก่าและใหม่ (NSB1:12, NSB1:12(new))



ให้ค่า TPC ในรูป kraft lignin และ gallic acid ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (48.2 และ 50.1% (kraft lignin) และ 14.1% และ 14.6% (gallic acid) ตามลำดับ)

ในการสกัดด้วยกรด %TPC สูงที่สุดได้จากกากอ้อยใหม่ที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ (SA1:6(new))

เท่ากับ 64.8% (kraft lignin) จากการวิเคราะห์เชิงคุณภาพกล่าวได้ว่ากากอ้อยใหม่มีค่า %TPC มากกว่ากากอ้อยเก่า เนื่องจากสภาวะการเก็บรักษากากอ้อยเก่าภายนอกอาคารเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการ oxidation ของ phenolic compounds ได้ง่าย

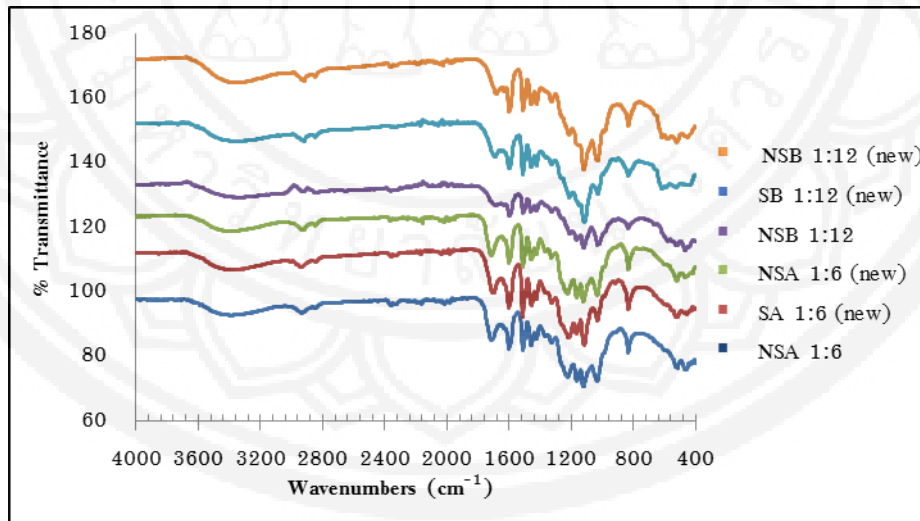
ตารางที่ 2 Total phenolic content (TPC) ในรูปของ gallic acid และ kraft lignin

อายุกากอ้อยหลังหีบ	ชื่อตัวอย่าง	%TPC _{kraft} (w/w lignin)	%TPC _{gallic} (w/w lignin)
12 เดือน	NSA 1:6	43.0 ^d ± 1.15	12.7 ^d ± 0.32
	NSB 1:12	48.2 ^c ± 0.30	14.1 ^c ± 0.08
	SA 1:6 (new)	64.8 ^b ± 1.01	18.8 ^b ± 0.34
1 วัน	NSA 1:6 (new)	37.0 ^c ± 1.22	10.9 ^c ± 0.11
	SB 1:12 (new)	76.6 ^a ± 1.50	22.7 ^a ± 0.28
	NSB 1:12 (new)	50.1 ^c ± 0.41	14.6 ^c ± 0.42

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน (a, b, c, d, e) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ของ %TPC ในรูป gallic acid และ kraft lignin

5. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR ทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัด lignin จากแต่ละสภาวะด้วยเทคนิค FTIR ดังแสดงใน

ภาพที่ 4 และสัญญาณที่ wave number ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 (Zabaleta, 2012)



รูปที่ 4 ATR-FTIR spectrum จากตัวอย่างสารสกัด lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่างๆ

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารสกัด lignin ทั้ง 6 สภาวะ ด้วย FTIR พบสัญญาณที่ wave number 3690-3030 cm^{-1} ซึ่งตรงกับการสั่นสะเทือนของ O-H stretching ของโครงสร้าง aromatic และ aliphatic

สัญญาณที่ 2930-2845 cm^{-1} ตรงกับ C-H stretching ของ aromatic methoxy, methyl และ methylene group ใน side chains นอกจากนี้ยังพบสัญญาณส่วนใหญ่ที่ wave number 1710-835 cm^{-1} ซึ่งประกอบไปด้วยที่

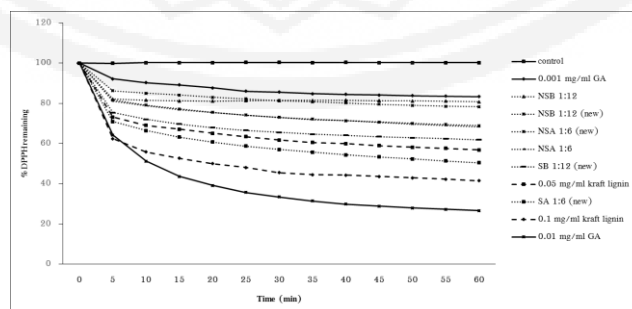


1710 cm^{-1} ตรงกับ C=O bond stretching ของ unconjugated ketone, carboxyl, ester group ที่ 1595, 1515, 1514, 1502, 1465 cm^{-1} ซึ่งตรงกับ aromatic structure และ lignin (Bui et al., 2015; Céline, Gonçalves, Jacquemin, & Fréour, 2014) ที่ 1418 cm^{-1} ตรงกับ C-H ใน lignin ที่ 1218 cm^{-1} ตรงกับ ring breathing กับ C-O stretching ของ syringyl และ guaiacyl structure ที่ 1121 cm^{-1} ตรงกับ aromatic C-H in plain deformation ของ syringyl unit และที่ 835 cm^{-1} ตรงกับ C-H ของ syringyl substructure (Zhou, Jiang, Via, Fasina, & Han, 2015) ซึ่งโดยรวมสารสกัดจากทั้ง 6 สภาวะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 3 Functional group จาก wave number ต่างๆ ของตัวอย่างสารสกัด lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่างๆ

Wave number (cm^{-1})	Functional groups
3690-3030	OH stretching vibrations and hydrogen bonding in phenolic and aliphatic structure
2930-2845	C-H stretching in aromatic methoxyl group and in methyl or methylene group of side chain
1710	C=O bond stretching Unconjugated ketone, carboxyl, ester group
1695	Unconjugated ketone or carboxyl group stretching
1595, 1515, 1514, 1502, 1465	Aromatic structure in lignin
1418	C-H deformation in lignin
1326	Syringyl ring breathing with C-O stretching
1261	Guaiacyl ring breathing with C=O stretching
1218	Ring breathing with C-O stretching of both the syringyl and guaiacyl structure Syringyl substructure
1161	Ester bond associated with p-hydroxypheny propane
1121	Aromatic C-H in plain deformation of syringyl unit Syringyl structure
1030	Deformation of the aromatic C-H linkages in guaiacyl substructure Deformation of the bond C-O in primary alcohols
835	C-H in positions 2 and 6 in syringyl substructure

5. คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) 0.05 mg/ml แสดงผลด้วยค่า %DPPHremaining โดยการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วย ค่า %DPPHremaining ที่ลดลงแสดงสมบัติของสารในวิธี DPPH ของสารสกัด lignin ที่ความเข้มข้น 0.1 การยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากขึ้น ผลการทดสอบนี้ดัง mg/ml เทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ 0, 0.01 แสดงในภาพที่ 5 และ 0.001 mg/ml และ kraft lignin ที่ 0, 0.1 และ



รูปที่ 5 %DPPHremaining ของสารสกัด lignin ความเข้มข้น 0.1 mg/ml จากสภาวะการสกัดต่างๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.01 และ 0.001 mg/ml และ kraft lignin ที่ 0, 0.1 และ 0.05 mg/ml



เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ lignin จากสภาวะการใช้กรดและต่างจากตัวอย่างกากอ้อยทั้งสองกลุ่ม (1 วัน และ 12 เดือน) พบว่า lignin ที่ได้จากการสกัดกากอ้อยใหม่ด้วยกรดมีแนวโน้มให้ค่า %DPPHremaining ที่ต่ำกว่าการสกัดกากอ้อยใหม่ด้วยต่าง ทั้งในกากอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ (SA1:6(new) เท่ากับ 50.6% และ SB1:12(new) เท่ากับ 61.9%) และกากอ้อยที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ (NSA1:6(new) เท่ากับ 68.9% และ NSB1:12(new) เท่ากับ 78.3%) ซึ่งแสดงถึงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่า ในส่วนของกากอ้อยเก่า พบว่า lignin ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดมีค่า %DPPHremaining ที่ต่ำกว่าการสกัดด้วยต่าง (NSA1:6 เท่ากับ 68.4% และ NSB1:12 เท่ากับ 80.8%)

6. การยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity)

ผลการทดสอบคุณสมบัติและความสามารถในการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด lignin แสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัด lignin จากกากอ้อยทุกสภาวะที่ความเข้มข้น 1250 µg/ml ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*, *S. typhimurium* และ *V. cholera*) ได้ แต่ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) ต้องใช้ความเข้มข้นที่มากกว่าคือ 2500 µg/ml ในขณะที่การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถทำได้แม้ว่าจะใช้ระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่เตรียมได้ คือ 2500 µg/ml เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องความสามารถในการละลายของสารสกัด lignin ใน DMSO ทำให้สามารถเตรียมได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 2500 µg/ml จึงไม่ทราบความเข้มข้นสุดท้ายของ MBC

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (µg/ml) ของสารสกัด lignin จากกากอ้อยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration)

Samples	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>V. cholera</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
NSA 1:6	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	2500
NSB 1:12	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	2500
SA 1:6 (new)	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	2500
NSA 1:6 (new)	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	>2500
SB 1:12 (new)	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	2500
NSB 1:12 (new)	2500	>2500	1250	>2500	1250	>2500	1250	2500

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด lignin จากวัสดุการเกษตรอื่นของงานวิจัยที่ผ่านมาเช่น เศษตอซังข้าวโพด ที่เตรียมได้จากสภาวะการสกัดใกล้เคียงกัน (4%NaOH, 95°C, 120 นาที) พบว่า lignin จากเศษตอซังข้าวโพดสามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) ได้ที่ความเข้มข้น 1250 µg/ml และ 3125 µg/ml (Dong et al., 2011) ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปในแนวโน้มเดียวกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองสกัด lignin จากกากอ้อยพบว่าผลได้ของการสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายโดยการใช้ต่าง (1%NaOH) จะให้ผลได้จากการสกัดมากกว่าการใช้กรด (formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) ประมาณ 3 เท่า และอัตราส่วนของ solid : liquid ไม่มีผลต่อผลได้การสกัดในสภาวะกรด แต่ใน



สภาวะต่างที่เพิ่มอัตราส่วนตัวทำละลายจาก 1:6 เป็น 1:12 สามารถเพิ่มผลได้การสกัดขึ้น 5-10% อายุของกากอ้อยนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งเนื่องจากพบว่าการสกัดกากอ้อยที่หีบใหม่จำเป็นต้องทำการ pretreatment (steam explosion) เพราะมีโครงสร้างที่แข็งแรงมากกว่ากากอ้อยเก่าและในเชิงคุณภาพมีค่า %TPC สูงกว่ากากอ้อยเก่า ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR แล้วพบว่าโครงสร้างทางเคมีของสารสกัด lignin จากกากอ้อยทุกสภาวะมีความใกล้เคียงกันและสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ใช้สภาวะในการสกัดคล้ายกัน (Bui et al., 2015; Céline et al., 2014; Zabaleta, 2012; Zhou et al., 2015)

ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการสกัดจะขึ้นอยู่กับความต้องการในการนำ lignin ไปใช้ประโยชน์และการจัดการกากอ้อยของโรงงาน เพราะพบว่ากากอ้อยที่ผ่านการสกัดสามารถนำกลับมาหมวนเวียนใช้ผลิตไฟฟ้าได้ หลังจากผึ่งทิ้งไว้เพื่อให้กลิ่นของกรดและต่างระเหยไปโดยค่าพลังงานความร้อนจะลดลงประมาณ 5-19% เมื่อเทียบกับกากอ้อยที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด และขึ้นอยู่กับปริมาณ lignin ที่ถูกสกัดออกไป เนื่องจากโครงสร้าง lignin เป็น hydrocarbon polymer ซึ่งเป็นส่วนที่ให้พลังงานได้

จากงานวิจัยชิ้นนี้กล่าวได้ว่าสารสกัด lignin จากกากอ้อยเมื่อพิจารณาทั้งในเชิงปริมาณที่มีมากเมื่อเทียบกับสารกลุ่ม bioactive compound จากพืชหลายชนิดและในเชิงคุณภาพที่มีทั้งสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จึงเป็นกลุ่มของสารสกัดที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในหลายด้าน แม้ว่าจะยังมีข้อขัดข้องในเรื่องของความไวต่อการเกิด oxidation และข้อมูลทางด้านโครงสร้างที่ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมก็ตาม

กิตติกรรมประกาศ

นักวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับทุนวิจัยโครงการ “การสำรวจหาสารประกอบ polyphenols เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล (RDG5750030)” ภายใต้แผนงานวิจัย “การสร้างมูลค่าเพิ่มของผลผลิตพลอยได้

จากอุตสาหกรรมน้ำตาล” และ LipPolGreen-Asia Platform ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศประจำปีการผลิต 2557/58 (ฉบับปิดหีบอ้อย). (2015). กรุงเทพฯ: สำนักบริหารอ้อยและน้ำตาลทราย. [1]

Arshad, M., & Ahmed, S. (2016). Cogeneration through bagasse: A renewable strategy to meet the future energy needs. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 732-737.

Basri, D. F., & Fan, S. H. (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(1), 26-29.

Bui, N. Q., Fongarland, P., Rataboul, F., Dartiguelongue, C., Charon, N., Vallée, C., & Essayem, N. (2015). FTIR as a simple tool to quantify unconverted lignin from chars in biomass liquefaction process: Application to SC ethanol liquefaction of pine wood. *Fuel Processing Technology*, 134, 378-386.

Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), 692-700.

Céline, A., Gonçalves, O., Jacquemin, F., & Fréour, S. (2014). Qualitative and quantitative assessment of water sorption in natural fibres using ATR-FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 101, 163-170.



- del Río, J. C., Lino, A. G., Colodette, J. L., Lima, C. F., Gutiérrez, A., Martínez, Á. T., . . . Rencoret, J. (2015). Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy*, *81*, 322–338.
- Delmas, G.-H. (2011). La Biolignine™: Structure et application à l'élaboration de résines. Université de Toulouse: Mécanique, Énergie, Génie civil et Procédés (MEGeP).
- Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T., & Wu, C. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products*, *34*(3), 1629–1634.
- Fagali, N., & Catalá, A. (2008). Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophysical Chemistry*, *137*(1), 56–62.
- Ghaffar, S. H., & Fan, M. (2014). Lignin in straw and its applications as an adhesive. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, *48*, 92–101.
- Meunchang, S., Panichsakpatana, S., & Weaver, R. W. (2005). Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. *Bioresource Technology*, *96*(4), 437–442.
- Sena-Martins, G., Almeida-Vara, E., & Duarte, J. C. (2008). Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Industrial Crops and Products*, *27*(2), 189–195.
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(3), 609–614.
- Zabaleta, A. T. (2012). Lignin Extraction, Purification and Depolymerization Study. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, Argitaletza Zerbitzua: Spain.
- Zhou, C., Jiang, W., Via, B. K., Fasina, O., & Han, G. (2015). Prediction of mixed hardwood lignin and carbohydrate content using ATR-FTIR and FT-NIR. *Carbohydrate Polymers*, *121*, 336–341.

Translated Thai References

- Sugar production report of the production year 2014/2015 (end of production season). (2015). Bangkok: Office of the cane and sugar board. [in Thai] [1]