



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การเตรียมชิลิกาอสังฐานจากเกลบและฟางข้าว
โดยการใช้เอนไซม์

โดย สุธี วัฒนศิริเวช และคณะ

กุมภาพันธ์ 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การเตรียมชิลิกาอสังฐานจากแกลบและฟางข้าว
โดยใช้เอนไซม์”

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. สุธี วัฒนศิริเวช

ศ. ดร. มรว. ชินธุสรวร สวัสดิวัตน์

สังกัด

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

มหาวิทยาลัยมหิดล

กุมภาพันธ์ 2552

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และโครงการ
เจียระไนเพชร ที่ริเริ่มและให้การสนับสนุนการพัฒนาศักยภาพในการทำวิจัยให้แก่
อาจารย์รุ่นใหม่ ของสถาบันอุดมศึกษาหลายแห่งที่ขาดความพร้อม ได้มีโอกาสเรียนรู้
และฝึกฝนการทำงานวิจัยอย่างเป็นระบบ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. มรว. ชัยณูสร สวัสดิวัตน์ ที่ได้กรุณารับ
เป็นนักวิจัยที่ปรึกษา และได้ให้การสนับสนุน ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ยิ่ง
ต่อการดำเนินโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ รศ. ดร. ธรณินทร์ ไชยเรืองศรี จากภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการวิเคราะห์ตรวจสอบตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ขอขอบคุณ สว่าง เก่งเกรียงไกร หัสวิภา หamayมั้น และเกียรติ
พงษ์ ได้การ นักวิทยาศาสตร์ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ม. แม่ฟ้าหลวง สำหรับการ
วิเคราะห์ทดสอบทางกายภาพ ขอขอบคุณ ญัฐยา แซ่ก้อ และ ประภาพร เป้าเพ็ง
นักศึกษาสาขาทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับการวิเคราะห์ทดสอบทางชีวเคมี

สุธี วัฒนศิริเวช
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

รหัสโครงการ : MRG4680131

ชื่อโครงการ : การเตรียมซิลิกาออสฐานจากแกลบ(และฟางข้าว) โดยใช้เอนไซม์

ชื่อนักวิจัย : อาจารย์ ดร. สุธี วัฒนศิริเวช สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย 57100

E-mail Address : suthee@mfu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (กรกฎาคม 2546 – มิถุนายน 2548) และขอขยายเวลา เป็น 4 ปี

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในการเตรียมซิลิกาออสฐานจากแกลบและฟางข้าว โดยวิธีแรกคือ การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei* ในการย่อยสลายส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลสในแกลบพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5 mg/ml อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการย่อยสลาย 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการย่อยสลายดีที่สุด และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด วัดโดย DNS method เท่ากับ 0.63 mg/ml ส่วนวิธีที่สอง คือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบบเดี่ยว (*Trichoderma reesei* TISTR 3080) และจุลินทรีย์รวม (พด. 1 โดยกรมพัฒนาที่ดิน) ในการย่อยสลายฟางข้าว พบว่าเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว pH 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายฟางที่ใช้เป็น substrate ได้สูงสุดร้อยละ 55 และได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1.26 mg/ml ในขณะที่การใช้เชื้อ *T. reesei* เป็นระยะเวลาเท่ากัน สามารถย่อยสลายฟางได้เพียงร้อยละ 40 และได้น้ำตาลรีดิวซ์ 0.5 mg/ml สอดคล้องกับปริมาณเถ้าหลังเผาของกากฟางที่เหลือจากการย่อยสลาย ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TGA ที่ร้อยละ 23 สำหรับการใช้ พด.1 และร้อยละ 12 สำหรับการใช้ *T. reesei* แต่จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเถ้าหลังเผาด้วยเทคนิค XRF พบว่ามีปริมาณซิลิกาอยู่ในช่วงร้อยละ 72.6 ถึง 82.5 และถึงแม้ว่าผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค XRD และ TEM ยืนยันว่าซิลิกาที่ได้เป็นชนิดออสฐาน แต่ยังพบสารประกอบอื่น เช่น แมงกานีสฟอสเฟต โพแทสเซียมแมงกานेट ปะปนอยู่ด้วย ดังนั้นในการผลิตซิลิกาออสฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง อาจจำเป็นต้องใช้กรดเพื่อขจัดมลทินเหล่านี้ออกจากกากฟางก่อนนำไปเผา

คำหลัก : ซิลิกาชนิดออสฐาน, ฟางข้าว, การย่อยสลายด้วยเอนไซม์, เชื้อจุลินทรีย์รวม,
Trichoderma reesei

Project Code : MRG4680131

Project Title : Preparation of Amorphous Silica from Rice Husk (and Rice Straw)
Using Enzymatic Approach

Investigator : Dr. Suthee Wattanasiriwech, School of Science,
Mae Fah Luang University, Chiang Rai, 57100

E-mail Address : suthee@mfu.ac.th

Project Period : 2 years (with 2 years extension)

Abstract

The aim of this work was to explore the possibility of using enzymatic hydrolysis in preparation of amorphous silica from rice husk and rice straw. The first approach was to digest away the lignocellulosic part of the substrate using a pure cellulase enzyme produced from *Trichoderma reesei*. The optimal condition for hydrolysis of rice husk was found to be at cellulase concentration of 0.5 mg/ml, temperature of 60°C, and 24 h of hydrolysis period. This was associated with the highest reducing sugar of 0.63 mg/ml determined by DNS method. The second approach was to decompose rice straw using on-site enzyme production either by a microbial isolate (*Trichoderma reesei* TISTR 3080) or microbial community (LDD1 from The Land Development Department). The highest rice straw decomposing of 55%, associated with the highest reducing sugar 1.26 mg/ml, was resulted from the LD.1 culture incubated in basal media at pH 6, 40°C, for a period of 72 h. For the same period of incubation, the *T. reesei* culture decomposed only 40% of the initial weight and produced 0.5 mg/ml of reducing sugar. The substrate residues were subjected to thermal analysis (TGA) and the ash content was 23% and 12% for LDD1 and *T. reesei* cultures, respectively. However, the silica content in the ash samples determined by XRF was between 72.6 and 82.5%. Although XRD and TEM analysis of the ash confirmed that amorphous silica was the major constituent, but minor phases including manganese phosphate and potassium manganite were clearly detected, suggesting that acid leaching prior to ashing might be needed in order to produce high purity amorphous silica.

Keywords: Amorphous silica, rice straw, enzymatic hydrolysis, microbial community, *Trichoderma reesei*.

เนื้อหางานวิจัย

บทที่ 1	บทนำ
บทที่ 2	วิธีการทดลอง
บทที่ 3	ผลการทดลองและการอภิปรายผล
บทที่ 4	บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง เอกสารอ้างอิง ภาคผนวก

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

แกลบ (rice husk) และฟางข้าว (rice straw) เป็นเศษวัสดุที่ได้จากการผลิตข้าว จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นหลัก ในสัดส่วนที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดและสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1: องค์ประกอบของสารอินทรีย์กลุ่มลิกโนเซลลูโลสในแกลบข้าวสายพันธุ์ต่างๆ (Mansaray, 1999)

องค์ประกอบ	Lemont LG	ROK 14	CP 4	Pa Potho
เซลลูโลส	29.20	33.47	25.89	35.50
เฮมิเซลลูโลส	20.10	21.03	18.10	21.35
ลิกนิน	20.00	18.80	24.60	18.20
รวม*	69.30	73.30	68.59	75.05

ในแกลบมีสารประกอบอินทรีย์และความชื้นประมาณร้อยละ 80-85 โดยน้ำหนัก และส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 15-20 ประกอบไปด้วยสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด โดยมี ซิลิกอน แคลเซียมและโพแทสเซียม เป็นองค์ประกอบหลัก มีแมกนีเซียม โซเดียม และสารอื่นๆ อีกเล็กน้อย (Lanning, 1963) ส่วนในฟางข้าว มีปริมาณของสารอินทรีย์มากกว่าในแกลบเล็กน้อย คือประมาณร้อยละ 85-90 ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์ประเภทเดียวกับที่พบในแกลบ แต่มีปริมาณลิกนินต่ำกว่า คือประมาณร้อยละ 10 (Watanabe, 1993)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตข้าวสูงถึงปีละประมาณ 20 ล้านตัน มีฟางข้าวเกิดขึ้นประมาณ 50 ล้านตันต่อปี (Department of Agriculture, 2007) และมีแกลบจากการสีข้าวเกิดขึ้นกว่า 5 ล้านตันต่อปี ทั้งแกลบและฟางข้าว ถูกจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาต่อหน่วยต่ำ และมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมน้อยมาก จากการสำรวจปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในปี 2544 (วิไลและคณะ, 2544) พบว่า ฟางข้าวบางส่วนจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ (10 ล้านตันต่อปี) เป็นวัสดุสำหรับเพาะเห็ดและปรับสภาพดิน (6 ล้านตันต่อปี) แต่ฟางข้าวที่เหลืออีกจำนวนมาก (24 ล้านตันต่อปี) ยังไม่มีการใช้ประโยชน์โดยตรง เกษตรกรมักจะเผาทิ้งภายหลังการเก็บเกี่ยวและมักก่อให้เกิดปัญหาฝุ่นควันในอากาศ ในส่วนของแกลบที่เกิดขึ้น โรงสีข้าวขนาด

ใหญ่หลายแห่งได้นำมาเผาเป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนเครื่องสีข้าวและผลิตไอน้ำเพื่อใช้หนึ่งข้าว รวมถึงใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตกระแสไฟฟ้า นอกจากนี้ ตามเขตชนบทของประเทศไทยได้มีการใช้แกลบเป็นเชื้อเพลิงสำหรับอุตสาหกรรมขนาดย่อม เช่น การเผาถ่าน การเผาอิฐมอญ เป็นต้น รวมแล้วประมาณ 4 ล้านตันต่อปี เมื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง แกลบหนึ่งกิโลกรัมให้พลังงานความร้อนประมาณ 12 - 18 เมกกะจูล (Mansaray 1998) ปัจจุบันจึงเริ่มมีการใช้แกลบเป็นแหล่งเชื้อเพลิงสำหรับการผลิตกระแสไฟฟ้าโดยโรงงานผลิตไฟฟ้ารายย่อยที่ได้รับการจัดซื้อจากการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย มีกำลังผลิตประมาณ 250 เมกกะวัตต์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (NEPO, 2002) ทำให้ปริมาณของแกลบเพิ่มขึ้นและโรงงานที่ใช้แกลบเป็นเชื้อเพลิงบางแห่งเริ่มประสบปัญหาในการจัดเก็บ

สิ่งที่เหลือจากการเผาไหม้ของแกลบ เรียกว่า “เถ้าแกลบ” (rice husk ash - RHA) มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบหลักสูงถึง 87-97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Chen, 1991) และมีลักษณะเป็นผลละเอียดที่ไม่ต้องนำไปผ่านกระบวนการบดย่อยต่อ ด้วยเหตุนี้ กลุ่มวิจัยจากหลายแห่งทั่วโลก โดยเฉพาะจากประเทศที่มีการผลิตข้าวในปริมาณมาก เช่น สเปน ตุรกี จีน อินเดีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย และแอฟริกาใต้ จึงได้ให้ความสนใจศึกษาหาทางใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่มจากซิลิกาจากแกลบในหลายแนวทางด้วยกัน เช่น การวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตซิลิกาความบริสุทธิ์สูงจากเถ้าแกลบ (Yalçin, 2001; Kalapathy, 2002) การเตรียมนาโนซิลิกา (Liou, 2004) การวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารประกอบของซิลิกอนประเภทต่าง ๆ จากเถ้าแกลบ (Padhi, 1995 ; Rahman, 1998; Krishnarao, 1998; Gorthy, 1999) และการพัฒนาคุณสมบัติของวัสดุผสมประเภทเซรามิก (Prasad, 2001) พอลิเมอร์ (Suwanprateep, 2002) และยาง (Mizuno, 2002) เป็นต้น โดยใช้เถ้าแกลบเป็นองค์ประกอบ ในส่วนของภาคเอกชนกับการศึกษาวิจัยซิลิกาอสังฐาน บริษัท Degussa ในประเทศเยอรมันนี้ มีการผลิตและจำหน่ายซิลิกาอสังฐานความบริสุทธิ์ร้อยละ 99 ซึ่งมีค่าพื้นที่ผิวจำเพาะสูง (ประมาณ 200 m²/g) (Degussa, 2002) สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารเติม (filler) เพื่อเพิ่มหรือปรับปรุงคุณสมบัติให้กับวัสดุผสมหลากหลายประเภท เช่น ยาสีฟัน พลาสติก ยางรถยนต์ กระจก คอนกรีต เป็นต้น สถาบันการศึกษาและหน่วยงานวิจัยของไทยหลายแห่ง ได้ศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับแกลบ เช่น การศึกษาวิธีการเตรียมซิลิกาความบริสุทธิ์สูงจากแกลบ (Juthamas, 2001) การศึกษาวิธีการสังเคราะห์ซิลิกอนคาร์ไบด์จากเถ้าแกลบ (Sanguansawang, 2001) เป็นต้น แต่จำนวนของงานวิจัยจากประเทศไทยที่มีปรากฏยังจัดว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับในหลายประเทศ

จากรายงานการศึกษาวิจัยการผลิตซิลิกาบริสุทธิ์จากแกลบที่ตีพิมพ์โดยกลุ่มวิจัยต่าง ๆ นั้น เกือบจะทุกกระบวนการผลิต ต้องผ่านขั้นตอนการเผาแบบใช้ออกซิเจนหรือไพโรไลซิส (Pyrolysis) ซึ่งให้ความร้อนแก่แกลบในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 600–1,000 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไอน้ำหรือสารในแกลบโดยเฉพาะเซลลูโลสซึ่งสูงถึงร้อยละ 80 โดยน้ำหนักสลายตัวเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กระบวนการดังกล่าวนอกจากจะเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานสูงแล้ว ยังเป็น

การเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศและอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้หากต้องมีการเผาถลุงเป็นจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ ซิลิกาที่เตรียมได้จากกระบวนการเผาแบบที่ใช้อุณหภูมิสูง จะมีสัดส่วนของซิลิกาชนิดผลึก (crystalline silica) สูง ซิลิกาแบบผลึกถูกจัดว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ตามมาตรฐานที่กำหนดโดย NIOSH ซึ่งเป็นหน่วยงานที่กำกับดูแลความปลอดภัยด้านสุขภาพของพนักงานทำงานในประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดปริมาณของอนุภาคซิลิกาชนิดผลึกในอากาศให้มีได้ไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (CDC, 1989) ส่วนซิลิกาอสัณฐานมีความอันตรายน้อยกว่า ตามมาตรฐานเดียวกันกำหนดปริมาณของอนุภาค ซิลิกาอสัณฐานในอากาศให้มีได้ไม่เกิน 6 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร หรือคิดเป็นปริมาณที่สูงกว่า 100 เท่าของซิลิกาแบบผลึก ทั้งนี้เพราะการหายใจเอาซิลิกาชนิดผลึกเข้าสู่ปอดในปริมาณมาก จะก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจที่เรียกว่า “โรคซิลิโคซิส” ซึ่งมีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ แต่ยังไม่มียารักษาของการเสียชีวิตอันมีสาเหตุมาจากซิลิกาอสัณฐาน

นอกจากจะมีอันตรายน้อยกว่าแล้ว ซิลิกาชนิดอสัณฐานยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ในการประยุกต์ใช้ซิลิกาจากถลุงเพื่อเป็นตัวเติมร่วมกับวัสดุอื่น เช่น ผสมในซีเมนต์สำหรับงานก่อสร้างที่ต้องการความแข็งแรงสูง ซิลิกาแบบอสัณฐานจะสามารถทำปฏิกิริยากับปูนขาว (lime) ได้ดีกว่าซิลิกาแบบผลึก (Cook, 1986) ถ้าที่ได้จากการเผาถลุงที่อุณหภูมิไม่เกิน 600 องศาเซลเซียส มีซิลิกาแบบอสัณฐานเป็นองค์ประกอบหลัก และอาจมีซิลิกาแบบผลึก เช่น คริสโตบาไลต์ (cristobalite) และ ไทรไคไมต์ (tridymite) เป็นองค์ประกอบย่อย

เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน ล้วนเป็นสารประกอบคาร์บอนที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์เชิงซ้อน ซึ่งนอกจากวิธีทางความร้อนแล้ว สารเหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายในธรรมชาติโดยเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย จากการทบทวนเอกสารยังไม่พบรายงานวิจัยตีพิมพ์ในระดับสากลที่กล่าวถึงการผลิตซิลิกาอสัณฐานจากถลุงหรือฟางข้าวโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายอินทรีย์สาร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเตรียมซิลิกา ชนิดอสัณฐาน โดยอาศัยกระบวนการย่อยสลายถลุงและฟางข้าว ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Trichoderma reesei* และเปรียบเทียบปริมาณและสมบัติของซิลิกาอสัณฐานที่ได้กับซิลิกาที่เตรียมตามวิธีที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิงซึ่งไม่ได้ผ่านขั้นตอนการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ การผสมผสานวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่เสนอนี้ น่าจะช่วยลดปริมาณสารประกอบคาร์บอนในถลุงลงได้ ทำให้สามารถลดอุณหภูมิและเวลาในการเผากำจัดสารคาร์บอนลงได้ต่ำกว่าที่มีรายงานในเอกสารอ้างอิง ซึ่งจะส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ซิลิกาอสัณฐานบริสุทธิ์ที่มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงเทียบเท่าหรือสูงกว่าผลิตภัณฑ์ซิลิกาอสัณฐานที่ผลิตจากต่างประเทศ และนอกจากจะเป็นกระบวนการผลิตซิลิกา ชนิดอสัณฐานที่จะให้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพโดยไม่ต้องใช้พลังงานในการผลิตมากแล้ว ยังจะได้ผลผลิตประเภทน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายของโมเลกุลเซลลูโลส ซึ่งอาจนำเข้าสู่กระบวนการหมัก

ต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมเช่น เอทานอล อันเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเฉพาะฟางข้าวที่มีมากมายแต่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่อีกทางหนึ่ง โดยไม่สร้างปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม

1.2 ทบทวนเอกสาร - งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 กระบวนการเตรียมซิลิกาจากแกลบและฟางข้าว

มีหลายวิธีด้วยกันได้แก่ วิธีทางเคมี (chemical extraction) วิธีทางความร้อน (pyrolysis) และวิธีที่ใช้เอนไซม์ช่วยย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolysis) เป็นต้น

▪ วิธีทางเคมี

Kalapathy และคณะ (Kalpathy, 2000; Kalapathy, 2002) เตรียมซิลิกาเจลที่ความบริสุทธิ์ร้อยละ 93 โดยละลายซิลิกาในน้ำแกลบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายโซเดียมซิลิเกต จากนั้นตกตะกอนซิลิกาโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ หรือกรดซัลฟิวริกหรือกรดออกซาลิกความเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อลด pH จนมีค่าเป็น 4 จะได้ตะกอนซิลิกาเจล จากนั้นจึงกรองแยกตะกอน และต้องผ่านการล้างอีกหลายขั้นตอนเพื่อกำจัดสารตกค้าง วิธีทางเคมีนี้มีข้อด้อยคือ มักจะเหลือเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นสารปนเปื้อนที่ถูกกักไว้ในโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุนของซิลิกาทำให้ชะล้างออกได้ยาก

▪ วิธีทางความร้อน

วิธีทางความร้อน คือเผาเพื่อให้เกิดการสลายตัวของอินทรีย์สารซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่เป็นส่วนประกอบหลักในแกลบและฟางข้าว จนเหลือเพียงเถ้าของซิลิกาที่ต้องการ Mansaray และ Ghaly (1998) ศึกษาการสลายตัวด้วยความร้อนของอินทรีย์สารในแกลบด้วยเทคนิค Thermo gravimetric Analysis (TGA) โดยทดลองเพิ่มอุณหภูมิที่ให้กับแกลบจนถึง 700 องศาเซลเซียสและบันทึกมวลที่ลดลง พบว่าเมื่อเผาในบรรยากาศของไนโตรเจนในช่วงอุณหภูมิ 180 – 380 องศาเซลเซียส แกลบจะสลายตัวเป็นสารที่ระเหยง่าย (volatile materials) ถึงประมาณร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ส่วนอินทรีย์สารที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 20 กลายเป็นคาร์บอน (char) ซึ่งจะสลายตัวให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หากเผาต่อไปในบรรยากาศของออกซิเจนที่อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส และสารอินทรีย์ที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนักคือเถ้า (ash)

อุณหภูมิและวิธีที่เผามีผลอย่างยิ่งต่อโครงสร้างและสมบัติของซิลิกาที่ได้ ซึ่ง Conradt และคณะ (Conradt, 1992) และ Real และคณะ (1996) ได้ศึกษาวิธีการเตรียมซิลิกาแบบอัดแน่นจากแกลบโดยกระบวนการให้ความร้อน จากผลการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของซิลิกาที่เตรียมขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และแบบส่องผ่าน (TEM) ร่วมกับเครื่อง

วิเคราะห์การเลี้ยวเบนด้วยรังสีเอกซ์ (XRD) พบว่า ลำดับขั้นตอนในการเตรียมและปริมาณของธาตุที่เป็นองค์ประกอบย่อยในตัวอย่างนั้น เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างยิ่งต่อพื้นที่ผิวจำเพาะและลักษณะความพรุนตัวของซิลิกาที่ได้

Hamdan และคณะ (1997) สังเคราะห์ซีโอไลต์จากซิลิกาที่ได้จากแกลบโดยทดลองเปรียบเทียบซิลิกาอสังฐานที่เตรียมต่างกันด้วยวิธีทางเคมีและวิธีทางความร้อน ซึ่งพบว่า ซิลิกาชนิด อสังฐานที่เตรียมโดยการละลายซิลิกาในแกลบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และทำให้เกิดตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก แม้ผลการสังเคราะห์จะได้ซิลิกาอสังฐาน แต่กลับมีความว่องไวในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ซีโอไลต์ต่ำกว่าซิลิกาอสังฐานที่ได้จากกระบวนการทางความร้อนที่เผาไล่คาร์บอนในอากาศที่อุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค ^{29}Si MAS NMR พบว่าซิลิกาอสังฐานที่เตรียมด้วยวิธีทางเคมีจะมีโครงสร้างที่ผิวที่ทำให้เกิดซิลิกอนไฮดรอกไซด์ (SiOH) ซึ่งมีผลให้ความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาของซิลิกาอสังฐานลดลง แต่กลับไม่พบซิลิกอนไฮดรอกไซด์ ในซิลิกาอสังฐานที่เตรียมด้วยวิธีทางความร้อน และหากเพิ่มอุณหภูมิที่เผาเป็น 1,000 องศาเซลเซียส หรือเผาในที่โล่งโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซิลิกาที่ได้จะอยู่ในรูปผลึกเช่น cristobalite และ tridymite ซึ่งเฉื่อยกว่าแบบอสังฐานและไม่สามารถใช้สังเคราะห์ซีโอไลต์ได้

ในปีถัดมา Real และคณะ (1997) พบว่าการต้มแกลบในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 นอร์มอล ก่อนแล้วจึงนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศออกซิเจนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้ได้ซิลิกาที่มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงถึง $260 \text{ m}^2/\text{g}$ ในขณะที่แกลบที่ไม่ได้ผ่านการต้มในกรด เมื่อเผาแบบเดียวกันจะได้ซิลิกาที่มีพื้นที่ผิวจำเพาะเพียง $1 \text{ m}^2/\text{g}$ ซึ่งต่อมา Krishnarao และคณะ (2001) ได้พิสูจน์ว่า โพแทสเซียมที่ปะปนอยู่ในแกลบเป็นตัวการที่ทำให้ซิลิกาเกิดการหลอมที่อุณหภูมิต่ำกว่า 600 องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลให้พื้นที่ผิวจำเพาะของซิลิกา ลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลให้คาร์บอนส่วนหนึ่งที่ยังไม่สลายตัวถูกกักไว้ภายในซิลิกาที่หลอมเหลว ดังนั้นถ้าที่ได้จึงปรากฏเป็นสีเทาหรือดำ แม้ว่าจะเผาต่อไปที่อุณหภูมิสูงกว่า 700 องศาเซลเซียส ก็ตาม ก็ไม่สามารถกำจัดคาร์บอนที่ถูกกักเอาไว้ได้ ดังนั้นการเตรียมซิลิกาสีขาวที่มีความบริสุทธิ์สูงด้วยวิธีทางความร้อน จะต้องกำจัดโพแทสเซียมในแกลบออกเสียก่อน โดยการต้มในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 นอร์มอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแกลบไปผ่านขั้นตอนการเผาเพื่อกำจัดคาร์บอนต่อไป

สอดคล้องกับรายงานของ Liou (2004) ที่พบว่า จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP-MS แกลบที่ผ่านการล้างด้วยน้ำขจัดไอออนซ้ำๆ หลายครั้งยังมีสารปนเปื้อนจำพวกโลหะหลายชนิด ได้แก่ Ca K Mg Na Mn Fe และ P (เรียงตามปริมาณที่มีอยู่) รวมกันสูงถึงร้อยละ 4.1 โดยน้ำหนัก แต่แกลบที่ผ่านการแช่ใน HCl ที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง มีปริมาณสารโลหะปนเปื้อนลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก และหลังเผาที่ 600 องศาเซลเซียสในอากาศปกติ ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำให้ได้

นาโนซิลิกาที่มีอนุภาคทรงกลมขนาดประมาณ 60 นาโนเมตร มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 235 m²/g มีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.7 และมีลักษณะเป็นผงที่ร่วนละเอียดหลังบดในโกร่ง

การเตรียมซิลิกาจากแกลบด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น อาจทำให้ได้ซิลิกาทั้งชนิด อสัณฐานและชนิดที่เป็นผลึกเกิดขึ้นร่วมกัน แต่ในการนำไปประยุกต์ใช้อาจต้องการเพียงซิลิกาอสัณฐานเท่านั้น จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตซิลิกาส่วนใหญ่จะทำการตรวจสอบชนิดของซิลิกาในผลิตภัณฑ์โดยพิจารณาจากลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิค XRD ว่ามีแนวโน้มเป็นแบบอสัณฐานหรือแบบผลึกเท่านั้น แต่ไม่ได้วิเคราะห์ในเชิงปริมาณถึงสัดส่วนของซิลิกาแบบผลึกต่อแบบอสัณฐาน จากรายงานวิจัยของ Payà และคณะ (Payà, 2000) กล่าวถึงวิธีการวิเคราะห์สัดส่วนปริมาณของซิลิกาชนิดอสัณฐานในตัวอย่างที่มีซิลิกาชนิดที่เป็นผลึกรวมอยู่ด้วย โดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายที่แตกต่างกันระหว่างซิลิกาแบบผลึกและแบบอสัณฐานในสารละลายที่เป็นเบส ซิลิกาแบบผลึก(ในรูปของควอตซ์) ละลายได้เพียง 4 % เมื่อต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ นาน 3 นาที่ แต่ในสภาวะเดียวกันซิลิกาอสัณฐานกลับถูกละลายได้อย่างสมบูรณ์ วิธีนี้จึงสามารถใช้สำหรับวิเคราะห์สัดส่วนของซิลิกาชนิดอสัณฐานในสารตัวอย่างได้

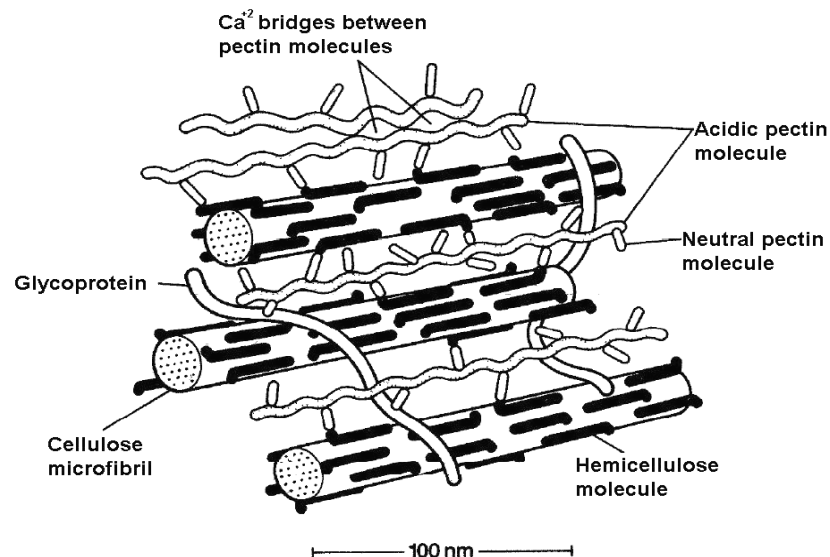
แม้ว่าจากการทบทวนและสืบค้นรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมซิลิกาอสัณฐานพบว่าเกือบทั้งหมดให้ความสนใจใช้แกลบเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ทั้งๆ ที่ในฟางข้าวก็มีซิลิกาเป็นองค์ประกอบเหมือนกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้ฟางข้าว จะได้ซิลิกาจากกระบวนการผลิต (yield) ต่ำกว่าของแกลบเมื่อใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นด้วยปริมาณที่เท่ากัน และอาจเป็นเพราะลักษณะของฟางที่เป็นเส้นยาว ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการสับย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ หรือต้องคัดสิ่งปนเปื้อนออก ในขณะที่แกลบซึ่งเกิดจากเครื่องสีข้าวมีความสะอาดกว่า และมีลักษณะที่เป็นชิ้นเล็กลงมาสม่ำเสมอ ทำให้สะดวกในการป้อนสู่กระบวนการผลิตจริงมากกว่า แต่ด้วยเหตุที่ปริมาณของฟางข้าวในประเทศไทย ที่ยังไม่ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์นั้นมีมากกว่าแกลบหลายเท่าตัว ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาโดยใช้ทั้งแกลบและฟางข้าวเป็นแหล่งวัตถุดิบเริ่มต้น

1.2.2 ลิกโนเซลลูโลส

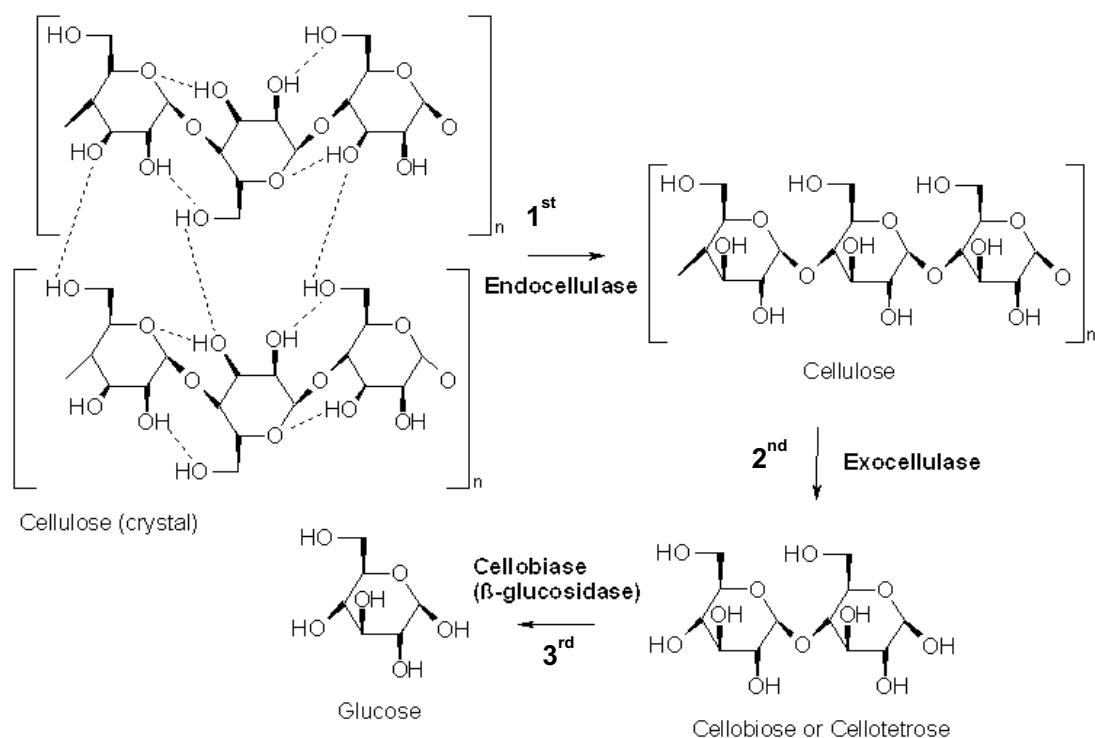
ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์ชีวมวลที่มีมากที่สุดในโลก โครงสร้างและผนังเซลล์ของพืชส่วนใหญ่รวมทั้งในแกลบและฟางข้าวประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลส มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบพอลิเมอร์เชิงซ้อนประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินดังแสดงในภาพ 1.1

เซลลูโลส คือน้ำตาลเชิงซ้อน (polysaccharide) เป็นองค์ประกอบหลักที่มีสัดส่วนสูงสุดในลิกโนเซลลูโลส เส้นใยเซลลูโลสอยู่รวมกันในลักษณะของมัดเส้นใยขนาดเล็กหรือไม่โครไฟบริล และทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักที่ให้ความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อพืช เนื่องจากประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน เส้นใยเซลลูโลสจึงมีความเป็นผลึกสูง การย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่

endoglucanase, exoglucanase, และ β -glucosidase (Knowles, 1987) ซึ่งมักจะถูกเรียกรวมกันว่า เอนไซม์เซลลูเลส สำหรับเฮมิเซลลูโลส เป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลเพนโตส (xylose และ arabinose) น้ำตาลเฮกโซส (galactose และ mannose) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสได้ดี คือ เอนไซม์ xylanase และ mannase เพราะ xylan เป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่พบในพืชส่วนใหญ่ (Biely, 1985) ตำแหน่งของเฮมิเซลลูโลสคือ มักจะกระจายอยู่บนผิวของไมโครไฟบริลของเซลลูโลส และองค์ประกอบสุดท้าย คือ ลิกนิน เป็นองค์ประกอบที่ทำหน้าที่เหมือนกาวยึดระหว่างเส้นใยไมโครไฟบริลของเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเข้าด้วยกัน และมีความทนทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มากที่สุด



รูปที่ 1.1: แบบจำลองโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของพอลิเมอร์ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชปฐมภูมิ (Eaglewood, 2006)

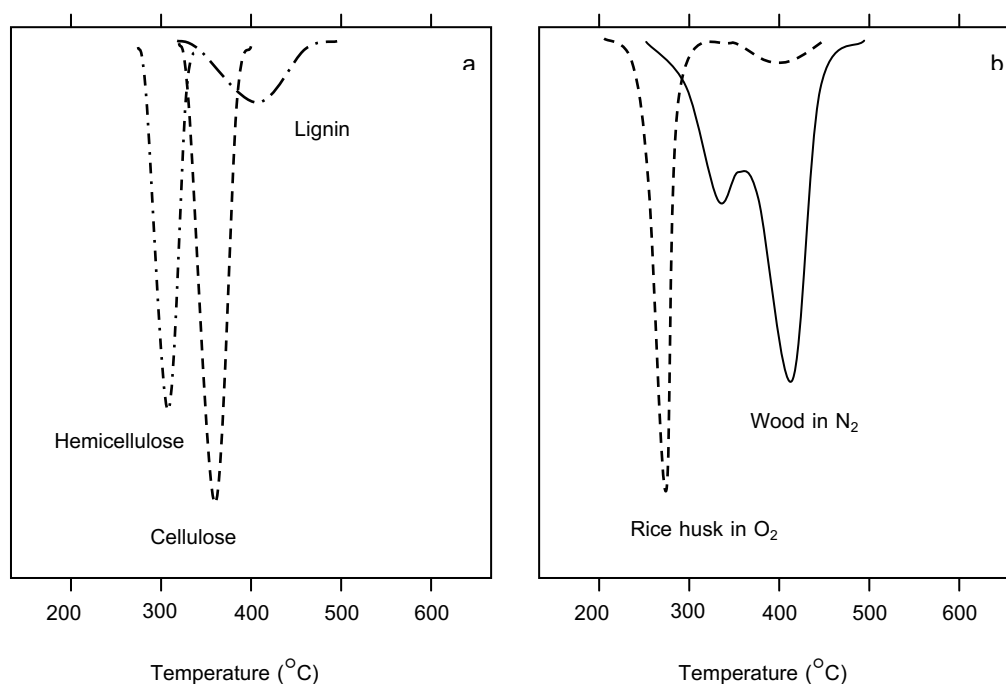


รูปที่ 1.2: กลไกของการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส (Houghton, 2007)

เมื่อลิกโนเซลลูโลสถูกนำไปให้ความร้อน หรือที่เรียกว่า “กระบวนการไพโรไลซิส” แต่ ละองค์ประกอบ ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนินจะมีการสลายตัวที่อุณหภูมิต่างกัน (Williams and Besler, 1996) จาก DTG curve ในรูปที่ 1.3 แสดงอัตราการสูญเสียมวลของ องค์ประกอบหลักทั้งสามเมื่อเผาในบรรยากาศของไนโตรเจน อันดับแรกเฮมิเซลลูโลสในรูปของ xylane เริ่มสูญเสียมวลที่อุณหภูมิประมาณ 250°C และมีอัตราการสูญเสียมวลสูงสุดที่อุณหภูมิ ประมาณ 285-325°C ในขณะที่เซลลูโลสในรูปของผลึกขนาดไมโครเมตร มีการสูญเสียมวลตั้งแต่ อุณหภูมิประมาณ 300°C และมีอัตราการสูญเสียมวลสูงสุดที่อุณหภูมิประมาณ 350-390°C สุดท้าย ลิกนิน มีการสูญเสียมวลเริ่มตั้งแต่ 300°C และมีอัตราการสูญเสียมวลสูงสุดที่ประมาณ 380-460°C และเมื่อนำลิกโนเซลลูโลสมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางความร้อน DTG curve ที่ได้คือผลลัพธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางความร้อนของแต่ละองค์ประกอบนั่นเอง รูป 1.3(b)

จากศึกษาปฏิกิริยาทางความร้อนในบรรยากาศออกซิเจนของแกลบจากข้าวหลาย สายพันธุ์ (Mansaray and Ghaly, 1999) พบว่า การสูญเสียมวลส่วนใหญ่ ประมาณกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนักเริ่มต้นเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิประมาณ 203-295°C (ดังรูปที่ 1.3(b)) และเกี่ยวข้องกับ

การสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส (volatilization) ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งในสภาพบรรยากาศที่มีและไม่มีออกซิเจน ส่วนการสูญเสียมวลในช่วงอุณหภูมิที่สูงขึ้นคือประมาณ 290 - 470°C สัมพันธ์กับการสลายตัวของลิกนิน นอกจากนี้ อัตราการให้ความร้อนและปริมาณกาซออกซิเจนที่ใช้ ล้วนมีผลต่อลักษณะของ DTG curve ดังนั้น ในการศึกษาปฏิกิริยาทางความร้อนของแกลบหรือฟาง จึงต้องระบุอัตราการให้ความร้อนและบรรยากาศที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเสมอ



ภาพที่ 1.3 Differential Thermo-Gravimetric (DTG) curve ของแต่ละองค์ประกอบหลักในลิกโนเซลลูโลสและ ผลจากการเผาในบรรยากาศที่แตกต่างกัน

1.2.3 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์

กลไกในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส มีอยู่สามขั้นตอน คือ 1) การทำลายพันธะชนิด non-covalent ด้วย **endocellulase** ซึ่งจะไปสลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดระหว่างมัดเส้นใยของเซลลูโลสไว้ด้วยกัน ดังนั้นเมื่อผ่านขั้นตอนแรก มัดเส้นใยไมโครไฟบริลจะเริ่มแยกออกเป็นเส้นใยเดี่ยวของเซลลูโลส 2) การตัดเส้นใยเดี่ยวของเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ด้วย **exocellulase** และ 3) การย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่เช่น disaccharides และ tetrasaccharides ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคส) ด้วย **beta-glucosidase** ดังแสดงในภาพที่ 1.2

เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จาก *Trichoderma reesei* ได้รับการยอมรับว่า เป็นเซลลูเลสที่ครบถ้วนที่สุด เพราะประกอบด้วย endocellulase, exo-cellulase และ beta-glucosidase ทำให้

มีประสิทธิภาพในการย่อยที่ดี *T. reesei* เป็นเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย สามารถผลิตเซลลูเลส และไซลานเนส (xylanases) ได้ในปริมาณมาก มีความปลอดภัยในการใช้งาน เพราะเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic) และไม่มีการสร้างสารที่เป็นพิษต่อมนุษย์ จึงนิยมใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์สัตว์ กระดาษ และสิ่งทอ (Nevalaine et al., 1994)

ปัจจัยภายนอก ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ อุณหภูมิและระดับ pH (Warawot, 1986) อุณหภูมิและระดับ pH ที่สูงหรือต่ำเกินไป มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ให้ลดต่ำลง เนื่องจากส่งผลต่อโครงสร้างโปรตีนในเอนไซม์ให้เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพที่มีความจำเพาะต่อเซลลูโลสมากที่สุด

Kaur et al. (1998) ได้เตรียม crude cellulase enzyme จากเชื้อ *Trichoderma reesei* โดยกระบวนการ solid state fermentation (SSF) ที่ใช้ฟางข้าวเป็น substrate และเติม fungal culture ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 ml แล้วเขย่านาน 30 นาที ส่วนใสที่กรองแยกคือ crude enzyme ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยฟางที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4% และผ่านการอบด้วยไอน้ำนาน 1 ชั่วโมง พบว่า crude enzyme ย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดถึง 268.5 mg g⁻¹ หรือเท่ากับประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ถึง 54.3% ในชุดการทดลองที่มี pH เป็น 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อ substrate เป็น 25 FPU g⁻¹ และใช้ substrate ในอัตราส่วน 4% (w/v)

นอกจากการชักนำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ขึ้น แล้วจึงนำเอนไซม์ที่ได้นั้นมาใช้อย่อยสลายเซลลูโลสแล้ว ยังมีรายงานถึงการใช้จุลินทรีย์เพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสโดยตรงอีกด้วย โดย Haruta et al. (2002) ได้พัฒนาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการหมักมูลสัตว์ชนิดต่างๆ และกากขี้เถ้ากับฟางข้าว แล้วคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูเลสได้ดี มาผ่านการ subculture ซ้ำหลายครั้งจนได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเสถียรและมีความสามารถในการย่อยสลายที่ดี สามารถย่อยสลายฟางข้าวได้ถึง 60% ของน้ำหนักเริ่มต้นในเวลาเพียง 4 วัน และการย่อยสลายยังคงเพิ่มขึ้นจนถึง 90% ในวันที่ 9 โดยฟางข้าวที่ใช้ก็ไม่จำเป็นต้องผ่านการฆ่าเชื้อโดยการอบด้วยไอน้ำหรือล้างด้วยด่างเสียก่อน จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR – DGGE พบว่าเชื้อที่ได้มีลักษณะเป็น microbial community หรือกลุ่มของแบคทีเรียหลายชนิดที่อยู่ร่วมกันแบบ symbiosis ได้แก่ *Clostridium thermosuccinogenes*, *Bordetella avium* และ *petrii*, *Brevibacillus sp.*, *Brevibacterium sp.* และ *Pseudoxanthomonas taiwanensis* แต่ไม่พบเชื้อรา นอกจากนี้ กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พัฒนาขึ้นยังมีความคงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างได้ดี สามารถเจริญได้ดีใน pH 5-9 และอุณหภูมิที่ให้ผลดีที่สุดคือ 50 องศาเซลเซียส

สำหรับในประเทศไทยโดย กลุ่มวิจัยและพัฒนาอินทรีย์วัตถุเพื่อการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน (2548) ก็ได้พัฒนาและส่งเสริมการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทาง

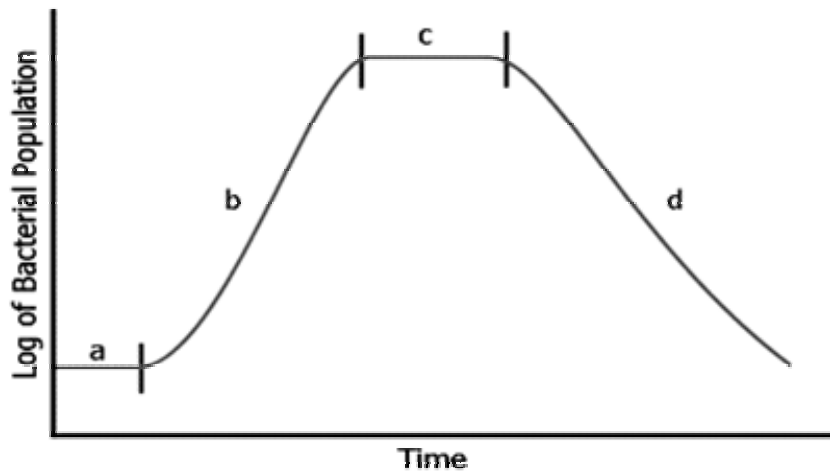
การเกษตรเพื่อลดการนำเข้าปุ๋ยและสารเคมีที่มีมูลค่าปีละกว่า 3 หมื่นล้านบาท โดยผลิตและแจกจ่ายผลิตภัณฑ์เชื้อจุลินทรีย์รวมให้แก่เกษตรกรที่ต้องการผลิตปุ๋ยหมัก ภายใต้ชื่อ พด.1 มีลักษณะเป็นผงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรีย (*Bacillus sp.*) แอคติโนมัยซีส (*Streptomyces sp.*) และรา (*Scopulariopsis sp.*, *Helicomyces sp.*, *Chaetomium sp.* และ *Trichoderma sp.*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลล์เพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีอากาศ และแสงสว่าง อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 45 องศาเซลเซียส จากเอกสารแนะนำวิธีใช้ ระบุว่าในการใช้งานต้องผสมเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น หญ้าแห้งหรือฟางข้าวกับมูลสัตว์และยูเรีย กองเป็นชั้นแล้วจึงเติมเชื้อ พด.1 หมักในสภาพที่มีความชื้นมากกว่า 50% (SSF) เป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 45 วัน แต่สำหรับโครงการวิจัยนี้ จะทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ พด. 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการย่อยสลายของ substrate มากที่สุด

1.2.4 การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ (Microorganism growth)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มีความหมายในลักษณะของการเพิ่มจำนวนมากกว่าในแง่ของการมีขนาดเซลล์ที่ใหญ่ขึ้น กระบวนการที่จุลินทรีย์แบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเรียกว่า “binary transverse fission” และระยะเวลาตั้งแต่ที่จุลินทรีย์ได้เกิดขึ้นจนถึงขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์เรียกว่า “generation time” ซึ่งเท่ากับระยะเวลาที่จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าโดยวิธีการนับจำนวน กราฟในภาพที่ 1.4 แสดงถึงลักษณะการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่มของแบคทีเรีย นับตั้งแต่เริ่มต้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากกราฟการเจริญเติบโต สามารถแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ดังนี้

(a) **ระยะปรับตัว หรือ Lag phase:** เป็นระยะแรกที่เชื้อที่เพิ่งถูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ และกำลังผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จึงมักจะไม่นับว่ามีจำนวนเพิ่มจำนวนในระยะนี้

(b) **ระยะทวีคูณ หรือ Log phase:** ระยะที่สอง เป็นช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้แล้ว และมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเป็นทวีคูณตลอดเวลา เมื่อนับจำนวนของเซลล์และทำการแสดงค่า log ของจำนวนที่นับได้ที่ช่วงห่างของเวลาที่เท่ากัน จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังนั้น จึงเรียกระยะนี้ว่า log phase เป็นช่วงที่เซลล์แต่ละเซลล์ มีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการผลิตสารชีวเคมีสูงสุด หากต้องการรักษาระดับกิจกรรมของเซลล์ให้มีการผลิตสารชีวเคมีในอัตราที่สูงสุดอยู่ตลอดเวลา ต้องทำการถ่ายเชื้อบางส่วนไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เป็นระยะๆ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีทำงานอย่างเต็มที่ และเริ่มต้นระยะ log phase ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่อีกครั้งต่อไป



ภาพที่ 1.3 กราฟแสดงระยะต่างๆ ในการเจริญเติบโต ของเชื้อแบคทีเรีย

(c) **ระยะสมดุล หรือ Stationary phase:** ระยะถัดมา เป็นช่วงที่อาหารของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มลดน้อยลง หรือปริมาณของเสียที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมีจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ และเริ่มมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ใหม่ๆ ในขณะเดียวกัน เซลล์ที่เกิดขึ้นก่อนก็เริ่มตายไป ทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ใหม่และอัตราการตายของเซลล์เท่ากัน ส่งผลให้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มสมดุลหรือคงตัวในระยะนี้

(d) **ระยะสิ้นสุด หรือ Death phase:** เป็นระยะสุดท้าย เนื่องจากสภาวะขาดแคลนอาหาร และสภาพแวดล้อมมีระดับของเสียที่สูงเกินไป ทำให้การแบ่งเซลล์หยุดชะงัก และเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เริ่มตายไปเรื่อยๆ ทำให้จำนวนจุลินทรีย์โดยรวมในระบบลดลงอย่างรวดเร็ว

ปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ที่สำคัญและมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลล์ูลูเลส ได้แก่ อุณหภูมิ และระดับความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมักจะแตกต่างกัน จึงสามารถจัดประเภทของจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต เช่น กลุ่มที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงหรือ thermophile ได้แก่ *C. thermophilum* CT2 เจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ cellobiohydrolase ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส *Streptomyces* สายพันธุ์ EC22 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 องศาเซลเซียส (Ball et al, 1991) ส่วนเชื้อรา *T. reesei* สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์เซลล์ูลูเลสได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จัดเป็นประเภท mesophile (Muthuvelayudham, 2006) นอกจากนี้ จุลินทรีย์แต่ละชนิดยังตอบสนองต่อระดับความเป็นกรดต่างแตกต่างกัน เช่น จุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย ได้แก่ *C. thermophilum* CT2 ที่ผลิตเอนไซม์ cellobiohydrolase ได้ดีที่ pH 5.0 (Li et al., 2006) และ *T. reesei* สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 5.5 (Wang et al., 2005) ส่วนเชื้อที่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อย ได้แก่ *Streptomyces* สายพันธุ์ EC22 ที่เจริญได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ 6.0 ถึง 8.0 (Ball et al., 1991)

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ (เกลบและฟางข้าว)

■ การเตรียมเกลบ

นำเกลบจากโรงสี ซึ่งไม่ได้แยกว่าเป็นเกลบจากข้าวพันธุ์ใด ใส่ภาชนะที่สะอาด และมีฝาปิด เติมน้ำจัดโอออนจนท่วม แล้วเขย่าเพื่อให้สิ่งสกปรกหลุดออกจากผิวเกลบ กรองด้วยกระชอนขนาดความละเอียดประมาณ 30 เมช นำไปล้างซ้ำด้วยวิธีการเดิม ทำเช่นนี้สามครั้ง แล้วนำเกลบไปอบแห้งในเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้ในภาชนะดูความชื้นทันทีที่ออกจากเตาอบ

■ การเตรียมฟางข้าว

นำฟางข้าวแห้งที่ได้จากการเก็บเกี่ยวข้าว มาตัดส่วนปลายออกให้เหลือเฉพาะส่วนโคนยาวประมาณ 30 cm ตัดให้เป็นท่อนสั้นๆ ยาวประมาณท่อนละ 3 - 4 cm นำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำจัดโอออน และอบให้แห้งด้วยวิธีเช่นเดียวกันกับการเตรียมเกลบ เก็บในภาชนะดูความชื้น ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง นำฟางข้าวที่ทำความสะอาดแล้วไปนึ่งให้ปลอดเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที

2.2 การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส

การทดลองในส่วนนี้ เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ซึ่งผลิตจากเชื้อ *T. reesei* ในการย่อยสลาย substrate (เกลบและกระต่ายกรอง) การวัดประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ใช้วิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไฮโดรไลซิส น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น มีทั้งที่เป็น mono- di- และ oligosaccharides ซึ่งสามารถรีดิวซ์ DNS reagent ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นแปรผันโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายอยู่ในแต่ละหลอดทดลอง และเมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม (540 nm) และเทียบกับกราฟของการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก็จะทราบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้ แม้ว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้นั้น อาจไม่ใช่ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์บางส่วนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาจถูกใช้ไปโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ขึ้นมากก็ตาม การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบ ช่วยทำให้ทราบว่าชุดการทดลองใดที่มีการย่อยสลายเกิดขึ้นมากกว่า ซึ่งต้องพิจารณาพร้อมกับกราฟแสดงน้ำหนักของ substrate ที่หายไปเนื่องจากการย่อยสลาย

สำหรับรายละเอียดของการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลาย ของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ระดับ pH และระยะเวลาในการย่อย มีดังนี้

2.2.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลา ที่มีผลต่อการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่มีต่ออัตราการย่อยสลาย substrate โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์แบบผง (Lyophilized Cellulase C8546, Sigma) จากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมกับการย่อยสลายเป็นลำดับต่อไป โดยเริ่มจากการละลายเซลลูเลสบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml เพื่อใช้เป็น cellulase stock solution เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อทำให้ความเข้มข้น 0.05 M ปริมาณ 1 ml ลงไปในหลอดทดลองขนาด 10 ml ที่มีเกลบหรือกระดาษกรองเป็นตัวถ่วงย่อยสลาย (substrate) ปริมาณ 100 มิลลิกรัม บรรจุอยู่ นำ stock cellulase solution ปริมาณต่างกัน ตั้งแต่ 0.1 - 1.0 ml เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อให้แต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 2.0 ml และค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.1, 0.3, 0.5, และ 1.0 mg/ml ค่าปริมาตรสารที่ใช้ แสดงในตารางที่ 2.1

สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับสอบเทียบค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ใช้สารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 1.0 mg/ml เป็น glucose stock solution เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองขนาด 10 ml ในปริมาณหลอดละ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ml ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นโดยการเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อทำให้แต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 2.0 ml ทุกหลอดทดลอง สำหรับชุดทดลองซึ่งไม่เติมน้ำกลั่นลงไป (blank) ความเข้มข้น 0.0 mg/ml) เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อทำให้แต่ละหลอดมีปริมาตรรวมเป็น 2.0 ml

นำหลอดทดลองทั้งหมด จุ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตามอุณหภูมิที่กำหนด (40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ DNS method จากนั้น เลือกอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อทำการทดลองซ้ำที่เวลาในการย่อยเป็น 2, 4, 8, 16, 24, และ 96 ชั่วโมง

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำชุดการทดลองทั้งหมดขึ้นจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ทำการวัดปริมาณน้ำตาล (reducing sugar) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยเอนไซม์ในแต่ละชุดการทดลอง โดยเติม DNS reagent (วิธีการเตรียมในภาพผนวก 2) ปริมาตร 3.0 ml เติมน้ำกลั่นลงไปให้หลอดทดลองทุกหลอดเพื่อหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้น ย้ายหลอดทดลองทั้งหมดไปจุ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNS reagent ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์และให้สี เมื่อครบ 5 นาที ย้ายหลอดทดลองทั้งหมดมาจุ่มลงในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยาการเกิดสี จากนั้นถ่ายสารละลายส่วนใสจาก

ในหลอดทดลอง ลงใน cuvette วัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ () ใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายบัฟเฟอร์ในหลอดที่ 0 เป็น blank เพื่อตั้งค่า 100% T หากสารละลายตัวอย่างมีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงเกินไป ให้เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ตามสัดส่วนที่เหมาะสม แล้วเทียบหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างจากกราฟค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (หลอดที่ 3-7) และสุดท้ายเมื่อหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากเอนไซม์และ substrate (ชุดควบคุม หลอดที่ 1 และ 2) จะได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ และการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

หลอดทดลองที่	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dry substrate (mg)	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Cellulase solution (ml)	-	1.0	-	-	-	-	-	-	0.1	0.3	0.5	1.0
Glucose solution (ml)	-	-	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-	-	-	-
Buffer solution (ml)	2.0	1.0	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	1.9	1.7	1.5	1.0
Total volume (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
DNS reagent (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

หมายเหตุ : หลอดที่ 0 คือ blank, 1 และ 2 คือ control, 3 - 7 คือ สารละลายกลูโคสมาตรฐาน สำหรับ Calibration curve, 8 - 11 คือ เอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.3 การย่อยสลาย substrate โดยใช้จุลินทรีย์

เทคโนโลยีการผลิตเอนไซม์ ในทางปฏิบัตินั้น อาจเริ่มจากการคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ชนิดที่ต้องการได้มากและมีประสิทธิภาพสูง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ดิบ (crude enzyme) ที่มากที่สุด ทำให้เอนไซม์ดิบมีความเข้มข้นหรือบริสุทธิ์มากขึ้น วัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ได้ แล้วจึงนำเอนไซม์นั้นไปใช้งานต่อไป

แต่วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ มุ่งเน้นที่การย่อยสลาย substrate ให้ได้สูงสุดเป็นอันดับแรก ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ในส่วนของการทดลองย่อยสลายโดยใช้จุลินทรีย์ จึงลดขั้นตอนที่ต้องเตรียมเป็นเอนไซม์ดิบก่อนแล้วจึงนำมาย่อย โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทำหน้าที่ย่อยฟางข้าวโดยตรง และจะทำการเปรียบเทียบผลการย่อยระหว่างการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียว (*T. reesei*) กับการใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม (mixed culture) ในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน (pH, และ อุณหภูมิ) โดยมีรายละเอียดของการทดลองดังนี้

2.3.1 การเตรียมเชื้อ *Trichoderma reesei* (TISTR-3080)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว potato dextrose broth (PDB) ตามวิธีที่ระบุในภาคผนวก 1 ตวงมา 50 ml ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อรูปชมพู่ขนาด 250 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้เย็น นำผงสปอร์ของ *T. reesei* (TISTR 3080, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) ใส่ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บไว้เป็น stock culture จากนั้น ต่เชื้อจาก stock culture โดยใช้อัตราส่วน stock culture 0.1 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (PDB) 50 ml ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 ml แล้ว นำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเชื้อที่พร้อมสำหรับใช้ทดสอบการย่อยสลาย substrate ในขั้นตอนต่อไป

2.3.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์รวม (พด. 1)

ละลายผงเชื้อจุลินทรีย์รวม (พด.1) ปริมาณ 10 กรัม ด้วยน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 90 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เขย่าจนได้ของเหลวไม่มีตะกอน เก็บเป็น stock culture จากนั้น ต่เชื้อจาก stock culture โดยใช้อัตราส่วน stock culture 0.1 ml ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase soy broth (TSB) 50 ml (วิธีการเตรียมในภาคผนวก 3) ใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 250 ml แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการหมุน 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเชื้อที่พร้อมสำหรับใช้ทดสอบการย่อยสลาย substrate ในขั้นตอนต่อไป

2.3.3 การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Basal media) ตามรายละเอียดในภาคผนวก 2 ปรับให้มีระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ กัน ตั้งแต่ pH 4 - 10 ด้วย 0.1 M HCl หรือ 0.1 M NaOH นำมาใส่ในขวดเลี้ยงเชื้อรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 1 ลิตร ขวดละ 350 ml พร้อมกับการนำฟางข้าวที่ผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแล้ว (หัวข้อ 2.1) น้ำหนัก 5.0 กรัม ใส่ลงในแต่ละขวด ใช้สาลี่ดูดปากขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ปลอ่ยให้เย็น

ถ่ายเชื้อ *T. reesei* หรือเชื้อ พด. 1 ที่เตรียมไว้ตามหัวข้อ 2.3.1 - 2.3.2 ปริมาณ 5 ml ลงในแต่ละขวดที่มี Basal media ที่ปรับให้มีค่า pH ต่างๆ แล้ว สำหรับชุดควบคุม เติม PDB (กรณีที่ใช้เชื้อ *T. reesei*) หรือ TSB (กรณีที่ใช้เชื้อ พด.1) ปริมาตร 5 ml แทน จากนั้นนำชุดทดลองทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที พบครบกำหนด 3 วัน ทั้งให้ตกตะกอน นำส่วนใสจากแต่ละชุดทดลอง เจือจางด้วย 0.05 M Citrate buffer solution ให้ได้ค่าความเข้มข้นสามระดับตามตารางที่ 2.2 แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการในหัวข้อ 2.2.2 ส่วน substrate ที่คงเหลือจากการย่อย ทำการกรองแยกด้วยตะแกรงขนาด 60 เมช ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้ง ทำการชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่ลดลงของ substrate อันเนื่องมาจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เลือกค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal media ที่ทำให้เกิดการย่อยสลายมากที่สุด สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3.4 การทดลองเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Basal media) ให้มีระดับความเป็นกรด-ด่างที่ให้ผลดีที่สุดตามหัวข้อที่ผ่านมา แล้วนำมาเติมในขวดเลี้ยงเชื้อรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ขวดละ 350 ml นำฟางข้าวที่ผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแล้ว (หัวข้อ 2.1) น้ำหนัก 5.0 กรัม ใส่ลงในแต่ละขวด ใช้สาลี่อุดปากขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วพักให้เย็น

ถ่ายเชื้อ *T. reesei* หรือเชื้อ พด. 1 ที่เตรียมไว้ตามหัวข้อ 2.3.1 - 2.3.2 ปริมาณ 5 ml ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ สำหรับชุดควบคุม เติม PDB (กรณีที่ใช้เชื้อ *T. reesei*) หรือ TSB (กรณีที่ใช้เชื้อ พด.1) ปริมาตร 5 ml แทน จากนั้นนำชุดทดลองทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 40, 50, และ 60°C ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เมื่อครบกำหนด 3 วัน ทั้งให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนใสจากแต่ละชุดทดลอง เจือจางด้วย 0.05 M citrate buffer solution ให้ได้ค่าความเข้มข้นสามระดับตามตารางที่ 2.2 แล้วนำไปตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการในหัวข้อ 2.2.2 ส่วน substrate ที่คงเหลือจากการย่อย ทำการกรองแยกด้วยตะแกรงขนาด 60 เมช ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้ง ทำการชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่ลดลงของ substrate อันเนื่องมาจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เลือกอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการย่อยสลายมากที่สุด

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

หลอดทดลองที่	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Supernatant (ml)	-	-	-	-	-	-	0.1	0.2	0.4
Glucose solution (ml)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-	-	-
Buffer solution (ml)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	1.9	1.8	1.6
Total volume (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
DNS reagent (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

หมายเหตุ : หลอดทดลองที่ 0 คือ blank, หลอดที่ 1 - 5 คือ สารละลายกลูโคสมาตรฐานสำหรับ Calibration curve, หลอดที่ 6 - 8 คือ ตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการเจือจางที่สามระดับ แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปรียบเทียบกันเพื่อยืนยันความถูกต้อง

2.4 การวิเคราะห์น้ำหนักที่หายไปของ substrate เนื่องจากการย่อยสลาย

เนื่องจากน้ำหนักเริ่มต้นของฟางข้าวที่ใช้เป็น substrate คือ 5.0 กรัม หลังจากถูกย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน กรอง substrate ที่ยังเหลืออยู่ด้วยตะแกรงร่อนขนาด 120 เมช นำกากที่ได้มาล้างซ้ำๆ ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น นำไปอบในเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนแห้งสนิท แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของ substrate ที่เหลือ และคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักที่หายไปจากการย่อย จากสมการ

$$\% \text{ Weight loss} = \frac{(\text{Initial weight} - \text{Final weight}) \times 100}{\text{Final weight}}$$

2.5 การตรวจสอบลักษณะทางจุลภาคของ substrate

ตรวจสอบลักษณะทางจุลภาคของ substrate ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM : LEO VP1450) ที่เร่งด้วยศักย์ไฟฟ้า 10 kV โดยตรวจสอบลักษณะผิวบริเวณด้านนอกและด้านในของฟางข้าว เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างฟางที่ยังไม่ถูกย่อย และฟางที่ถูกย่อยแล้วด้วยจุลินทรีย์เป็นเวลา 3 วัน ตัวอย่างทุกชิ้นผ่านล้างทำความสะอาด อบแห้ง และเคลือบด้วยทองเพื่อให้นำไฟฟ้า ด้วยเทคนิค sputtering ก่อนการตรวจสอบด้วย SEM

2.6 การวิเคราะห์สัดส่วนปริมาณของแข็งด้วยเทคนิคทางความร้อน

ล้าง substrate ที่เหลือจากการถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ ด้วย deionized water อบจนแห้ง แล้วเล็ด้วยกรรไกรให้ได้เป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 1 mm^2 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง thermogravimetric analyzer (TGA) และ simulated differential thermal analyzer (SDTA) โดยให้ความร้อนด้วยอัตราคงที่ 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส เพื่อให้อินทรีย์สารสลายตัวไปอย่างสมบูรณ์ ทำการทดลองทั้งในบรรยากาศของออกซิเจน (O_2) และในอากาศ (air) จากผลที่ได้ทำการคำนวณหาอัตราส่วนร้อยละโดยมวลของอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารต่อมวลของของแข็งทั้งหมด เปรียบเทียบการสลายตัวโดยความร้อน ระหว่าง substrate ที่ไม่ได้ผ่านการย่อย และ substrate ที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

2.7 การเตรียมและการวิเคราะห์ซิลิกาจาก substrate

2.7.1 การเตรียมซิลิกาโดยการเผา substrate

การเตรียมซิลิกา เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง substrate ที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ทำโดยนำ substrate ที่เหลือจากการทดลองย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์เป็นเวลา 3 วัน ที่ได้ผ่านการล้างทำความสะอาดและอบแห้งแล้ว ใส่ลงในถ้วยพอร์ซเลน (porcelain crucible) และนำไปเผาในเตาไฟฟ้า โดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ทางความร้อนว่าปฏิกิริยาการสลายตัวทางความร้อนได้สิ้นสุดลงที่อุณหภูมิต่ำที่สุดเท่าใด ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกอุณหภูมิการเผาเป็น 500 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ที่ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงในเตาจนถึงอุณหภูมิห้อง ถ่ายเอ้าที่ได้จากการเผาใส่ในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกได้ และเก็บในภาชนะดูความชื้น

2.7.2 การวิเคราะห์ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของซิลิกา

วิเคราะห์ความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาการสลายตัวของอินทรีย์สารในเอ้าที่เกิดขึ้นจากการนำตัวอย่างฟางแต่ละชุดมาเผาที่ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค FT-IR จากนั้นตรวจสอบลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเอ้าด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกาว (SEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเอ้าที่เตรียมขึ้น ใช้เทคนิค X-ray Fluorescence Spectroscopy (XRF) และวิเคราะห์ความเป็นผลึกด้วยเทคนิค X-ray Powder Diffraction (XRD)

บทที่ 3

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

3.1 ผลการทดสอบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์

3.1.1 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส

กราฟในภาพที่ 3.1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในชุดทดลองการย่อยสลายกลีบด้วยเซลลูเลสที่มีความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างกัน ทดลองที่อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากกราฟแสดงให้เห็นว่า ชุดควบคุมซึ่งไม่ได้มีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส กลับมีน้ำตาลรีดิวซ์ 0.25 mg/ml ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในชุดทดลองอื่นๆ แสดงว่า ในกลีบที่ผ่านการล้างแล้ว ยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์ที่ละลายน้ำได้เหลืออยู่ น้ำตาลรีดิวซ์เหล่านี้ อาจเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้กลีบเป็น substrate

ส่วนในภาพที่ 3.2 เป็นผลการทดลองเดียวกัน แต่แสดงเฉพาะปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากการปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยได้หักปริมาณน้ำตาลที่ละลายจากกลีบออกแล้ว จากกราฟในภาพที่ 3.2(a) เมื่อใช้กลีบไม่บดเป็น substrate ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลลูเลส จนถึงระดับสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.5 mg/ml และหากใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1 mg/ml ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบกลับลดลง ยกเว้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนอกจากนี้ พบว่ายิ่งเพิ่มอุณหภูมิในการทดลองขึ้น น้ำตาลรีดิวซ์ก็ยิ่งพบมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองใช้กลีบบดเป็น substrate ดังภาพที่ 3.2(b) พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่พบ มีค่าต่ำกว่ากรณีที่ใช้กลีบไม่บดเล็กน้อย และ สภาวะที่พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5 mg/ml อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และกลับลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น ที่อุณหภูมิสูงขึ้นกว่านั้น มีแนวโน้มว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์ตลอดช่วงที่ทำการทดลอง

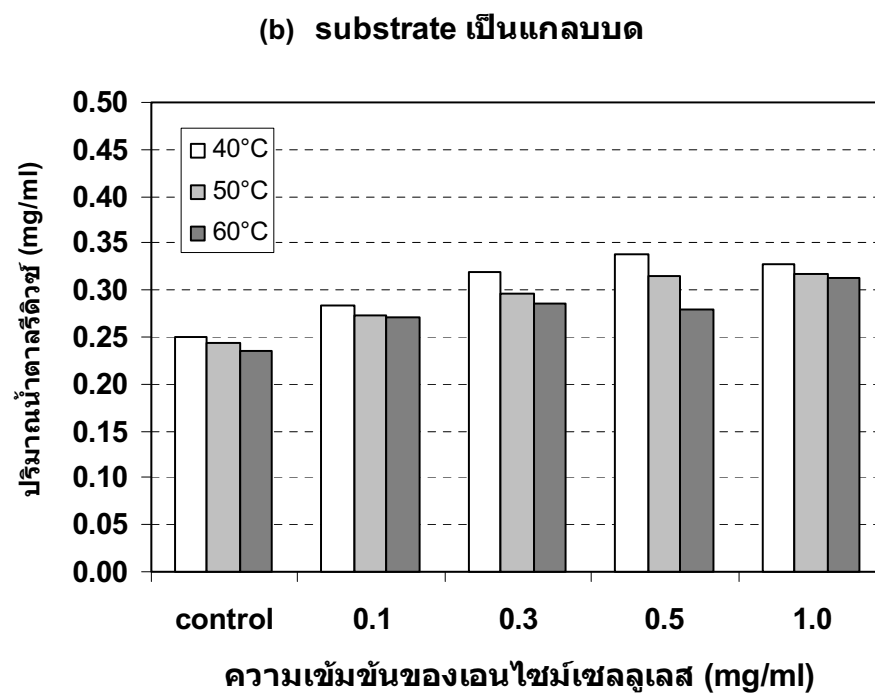
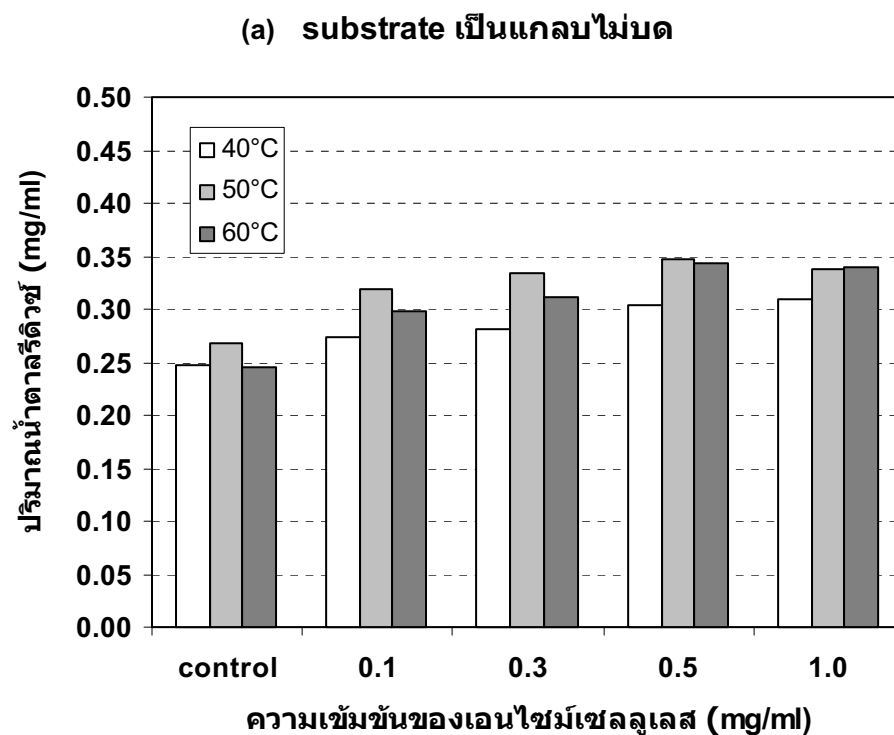
อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ มีผลต่อการเพิ่มพลังงานในการสั่นของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งอาจทำให้การเข้าจับกับ Active sites เกิดได้รวดเร็วขึ้น แต่หากอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจนพลังงานที่โมเลกุลได้รับเพิ่มมากเกินไป การสั่นที่รุนแรงของโมเลกุลอาจมีผลทำให้พันธะบางส่วนที่ยึดเหนี่ยวโครงสร้างสามมิติของโปรตีน ไม่สามารถจะยึดเหนี่ยวต่อไปได้ โปรตีนอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างแบบสามมิติไปจากเดิม จนไม่สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเป้าหมายบน substrate ได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายลดลง

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น มีแนวโน้มให้เกิดการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้นที่ต่ำ เนื่องจากมีจำนวนครั้งที่เอนไซม์สามารถเข้าจับกับตำแหน่งเป้าหมายบน

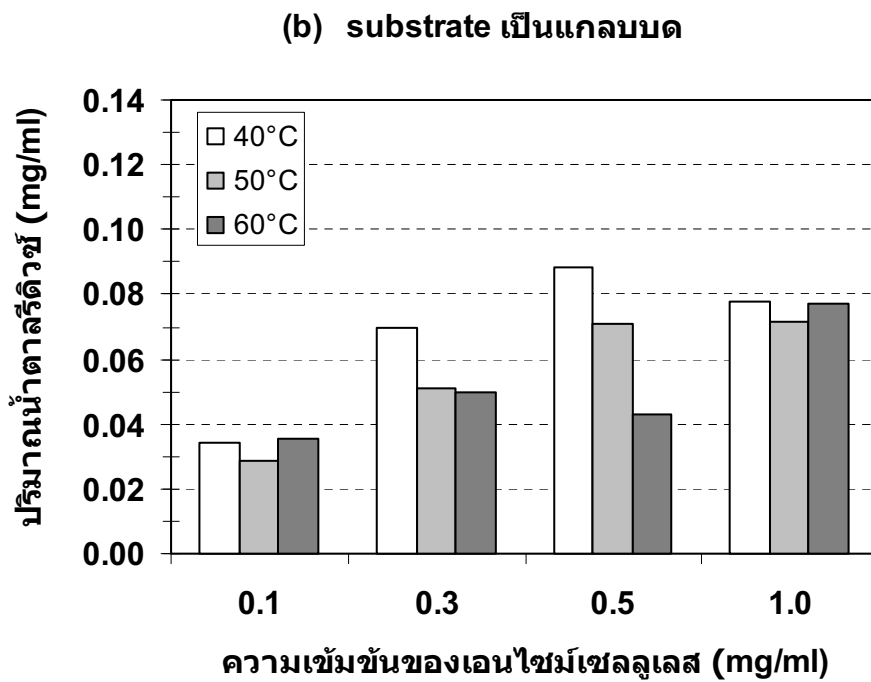
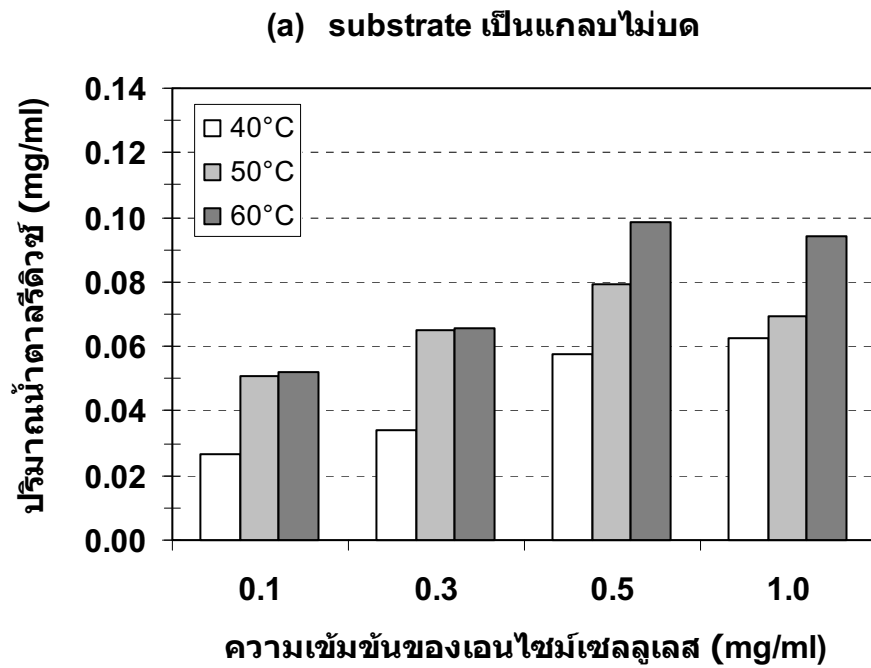
substrate ได้บ่อยครั้งขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นถึงระดับหนึ่ง ตำแหน่งเป้าหมายบน substrate เริ่มไม่เพียงพอต่อปริมาณโมเลกุลของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น การเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเกินกว่าระดับที่เหมาะสม มีผลให้เอนไซม์ส่วนเกินที่ไม่สามารถเข้าถึงตำแหน่งเป้าหมาย มีจำนวนมากขึ้นเท่านั้นเอง

การ बदแปลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวจำเพาะให้แก่ substrate หากตำแหน่งเป้าหมายของเอนไซม์อยู่ภายในหรือลึกลงไป substrate การ बदก็หน้าจะมีส่วนช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น เนื่องจากมีตำแหน่งเป้าหมายที่เอนไซม์สามารถเข้าทำการย่อยได้มากขึ้น การใช้เอนไซม์ในปริมาณ (หรือความเข้มข้น) ที่เพิ่มขึ้น จึงยังมีตำแหน่งเป้าหมายบนผิวของ substrate ที่เอนไซม์สามารถเข้าถึงได้ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มตามไปด้วย แต่หากตำแหน่งเป้าหมายอยู่ที่ผิวนอกของ substrate อยู่แล้ว การ बदย่อยกลับอาจไม่ให้เกิดการย่อยที่แตกต่างกัน ขณะเดียวกัน การ बदกลับยังมีผลทำให้ชั้นผิวนอกซึ่งเป็นชั้นของซิลิกาแตกออกเป็นอนุภาคซิลิกาขนาดเล็ก และอาจปลดปล่อยโลหะอัลคาไลน์ที่ปะปนอยู่ภายใน เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ออกมาได้มากขึ้น ไฮดรอกไซด์ของโลหะเหล่านี้ สามารถจับตัวและขัดขวางการทำงานของเซลล์เลส และมีส่วนทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสลายลดต่ำลง ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากหลอดทดลองที่ใช้ बदกลับจึงใกล้เคียงหรือต่ำกว่ากรณีที่ใช้ बदไม่ बद

แต่ไม่ว่าจะใช้ बदที่ बदหรือไม่ बद ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือ **0.1 mg/ml** เป็นปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้กระดาษกรองเป็น substrate ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดถึง **3.2 mg/ml** ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 mg/ml ดังกราฟในภาพที่ 3.3

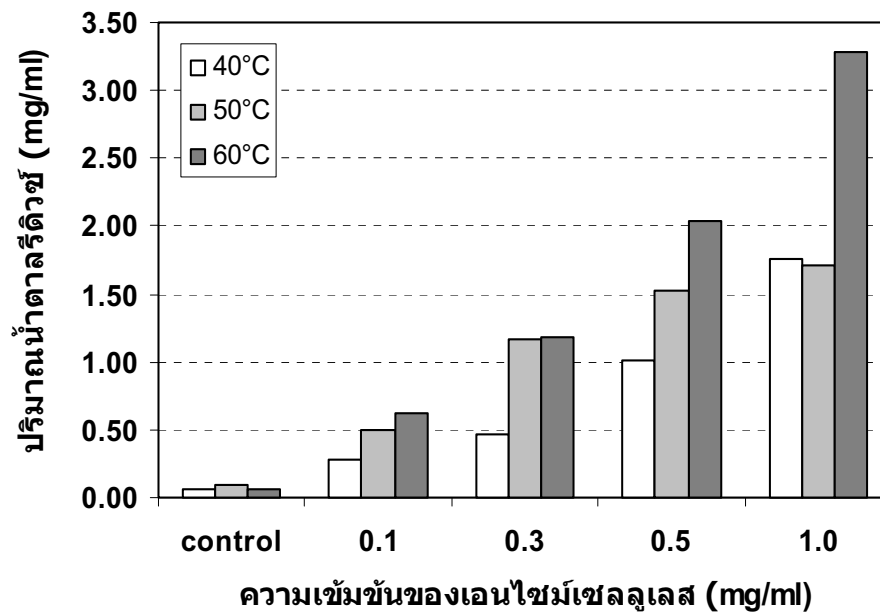


ภาพที่ 3.1 ปริมาณน้ำตาลที่วัดได้ หลังจากการทดลองใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้น และที่อุณหภูมิของการไฮโดรไลซิสต่างกัน ในการย่อยเกลือบเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ในภาพ (a) substrate เป็นเกลือบด (b) substrate เป็นเกลือบไม้บด



ภาพที่ 3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายเกลบด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อใช้ความเข้มข้น และอุณหภูมิของการไฮโดรไลซิสต่างๆ กัน ในภาพ (a) substrate เป็นเกลบบด (b) substrate เป็นเกลบไม้บด

substrate เป็นกระดาษกรอง

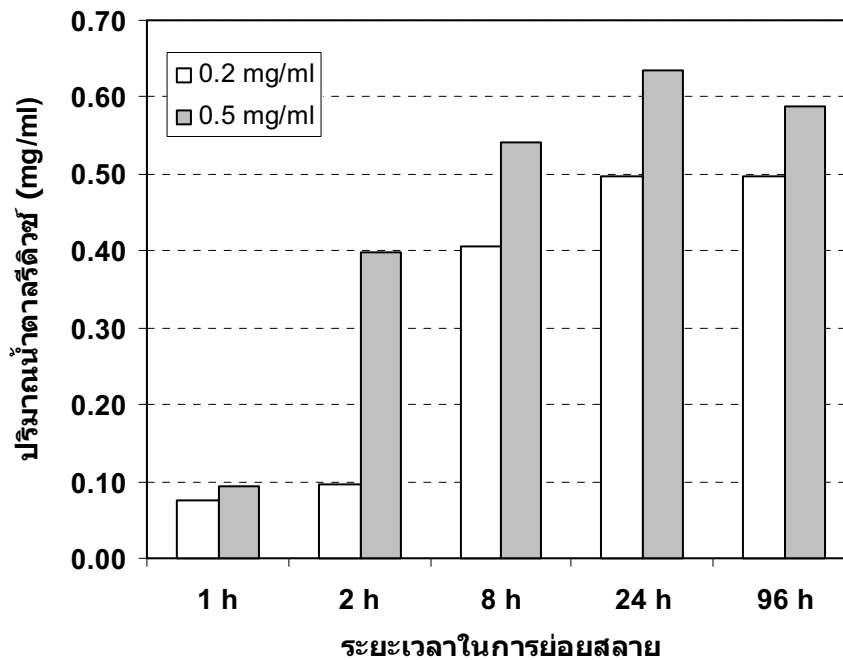


ภาพที่ 3.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ และอุณหภูมิของการไฮโดรไลซิสที่ต่างกัน

3.1.2 ผลของระยะเวลาในการย่อยสลาย

จากการทดลองใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายแอลบไมด์ ในสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.2 และ 0.5 mg/ml เป็นระยะเวลา ตั้งแต่ 1 ชั่วโมงไปจนถึง 96 ชั่วโมง (4 วัน) แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมงแรก และเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 3.4 จากนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กลับมีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเล็กน้อย และการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ทุกช่วงเวลาที่ทดลอง

โดยภาพรวม เมื่อใช้แอลบไมด์เป็น substrate ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย คือ 0.63 mg/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งยังต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (2.0 mg/ml) ที่เกิดจากการย่อยสลายกระดาษกรองด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดจากการย่อยสลายกลีบด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส เมื่อระยะเวลาในการทดลองเพิ่มขึ้นจาก 1 ชั่วโมง ไปจนถึง 96 ชั่วโมง แท่งสีขาวและ แท่งสีเข้ม คือผลจากการใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 0.2 mg/ml และ 0.5 mg/ml ตามลำดับ

ดังนั้น การใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยสลาย substrate ประเภทเส้นใย เซลลูโลสอย่างเช่นกระดาษกรองได้เป็นอย่างดีนั้น กลับไม่สามารถย่อยสลายกลีบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อคำนึงถึงต้นทุนราคาของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่สูงมาก จึงทำให้ไม่เห็นถึงความเป็นไปได้ในเชิงธุรกิจ ของการผลิตซิลิกาอสังฐานจากกลีบโดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์

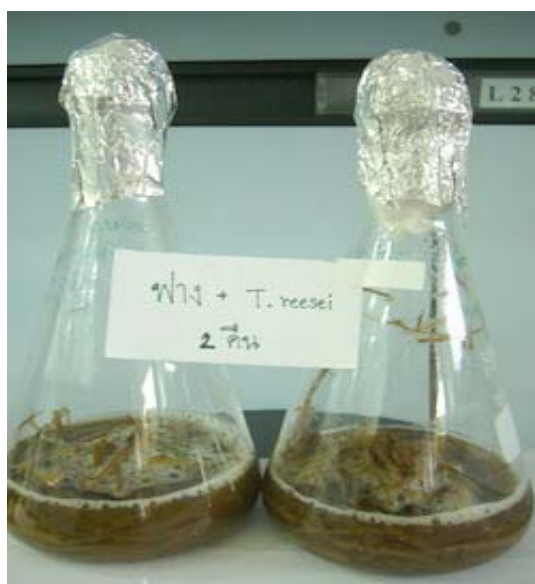
อีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ในการเตรียมซิลิกาอสังฐาน คือการเปลี่ยน substrate จากกลีบซึ่งย่อยสลายได้ยากไปเป็นฟางข้าว ถึงแม้ในฟางข้าว จะมีปริมาณซิลิกาโดยน้ำหนักต่ำกว่าในกลีบ แต่มีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้ง่ายกว่า ซึ่ง Haruta และคณะ (Haruta 2002) ได้รายงานการใช้จุลินทรีย์รวมเพื่อย่อยฟางข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ฟางข้าวยังเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากกว่ากลีบข้าวหลายเท่าตัว (วิไล สันติโสภาคี และคณะ, 2546) ดังนั้น การใช้วิธีการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเชื้อจุลินทรีย์แทนการใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ เพื่อลดขั้นตอนและเพื่อให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งผลการศึกษาตามแนวคิดนี้ ได้แสดงไว้ในหัวข้อถัดไป

3.2 ผลการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

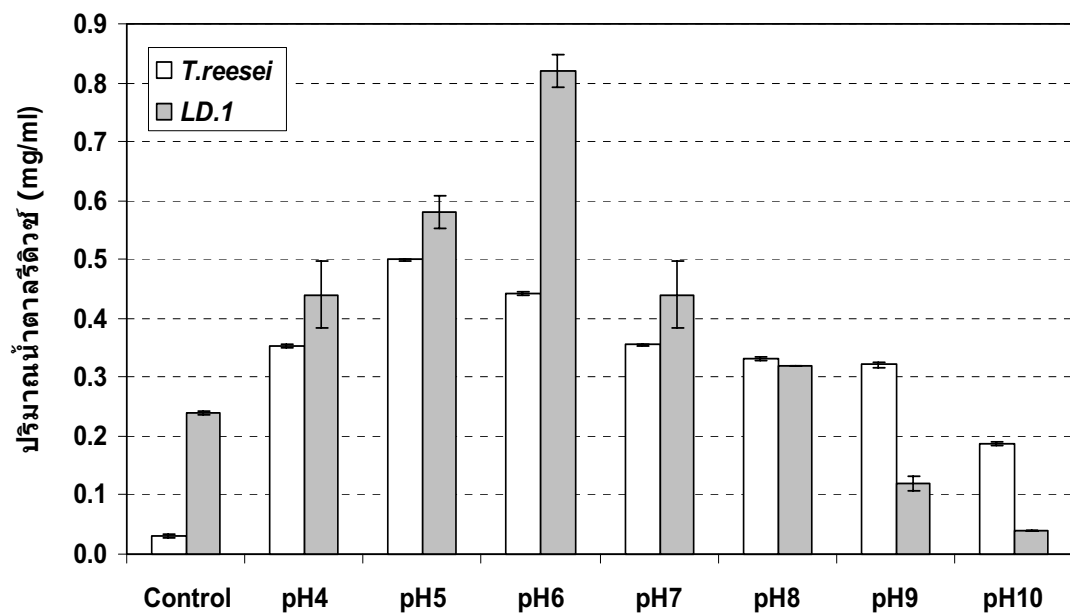
3.2.1 ผลของค่าความเป็นกรดต่าง ต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ *T. reesei* สายพันธุ์ TISTR 3080 และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ถูกทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายที่สภาวะความเป็นกรดต่างตั้งแต่ pH 4 - 10 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อแต่ละประเภท ตามรายละเอียดในหัวข้อที่ 2.3 ในแต่ละชุดทดลอง ใช้ฟางข้าวที่ผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแล้ว ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อรูปชมพู่ ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ (Basal media) ขวดละ 350 ml ดังแสดงในภาพที่ 3.5 จากนั้น นำไปใส่ในตูบ่มเชื้อแบบเขย่าและควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากแต่ละชุดทดลอง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 3.6

หลังการทดลองเป็นเวลา 3 วัน พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองประเภทตอบสนองได้ดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย คือ pH 5 - 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่วัดได้ คือประมาณ 0.6 mg/ml ในชุดทดลองที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ที่ค่า pH 6 ส่วนชุดทดลองที่ใช้เชื้อ *T. reesei* พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ pH 5 แต่ค่าที่วัดได้ต่ำกว่ากรณีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 อย่างไรก็ตาม เชื้อ *T. reesei* สามารถทำงานได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ในช่วง pH 9-10 ดังนั้น ในการศึกษาหัวข้อถัดไป จะควบคุมสภาวะในการเลี้ยงเชื้อให้มี pH เป็น 5 และ 6



ภาพที่ 3.5: การทดลองการย่อยสลายฟางโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเริ่มต้น (ภาพบน) หลังการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* (ซ้าย) และ หลังย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 (ขวา) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.6 ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเชื้อ *T. reesei* และเชื้อรวม พด.1

โดยทั่วไปแล้ว เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมค่าหนึ่ง ซึ่งมักจะแตกต่างกันไปสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด สภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่างที่ไม่เหมาะสม มีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจาก ค่าความเป็นกรดต่าง มีผลต่อสถานะในการแตกตัวเป็นประจุ (state of ionization) ของกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรดและชนิดที่เป็นด่างแตกต่างกัน กรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรดมี carboxyl functional groups (COOH) อยู่ที่ side chains ส่วน กรดอะมิโนชนิดที่เป็นด่าง มี amine functional groups (NH₂) อยู่ที่ side chains เมื่อ pH เปลี่ยนแปลง ส่งผลให้การแตกตัวเป็นประจุของกรดอะมิโนในโปรตีนหรือเอนไซม์ รวมถึงพันธะไฮโดรเจนซึ่งควบคุมโครงสร้างสามมิติของโปรตีนนั้นๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลงได้ นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรดต่างยังอาจมีผลต่อรูปร่างหรือค่าประจุไฟฟ้าของ substrate ได้อีกด้วย ซึ่งรูปร่างหรือประจุของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้ายึดเกาะบริเวณที่เป็น active site ได้ และส่งผลให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลงได้เช่นกัน

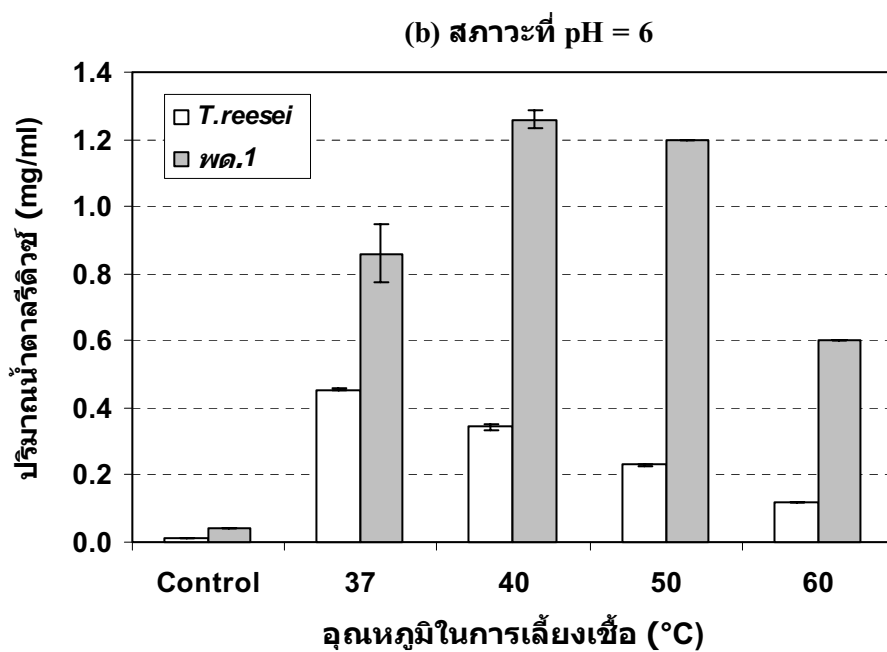
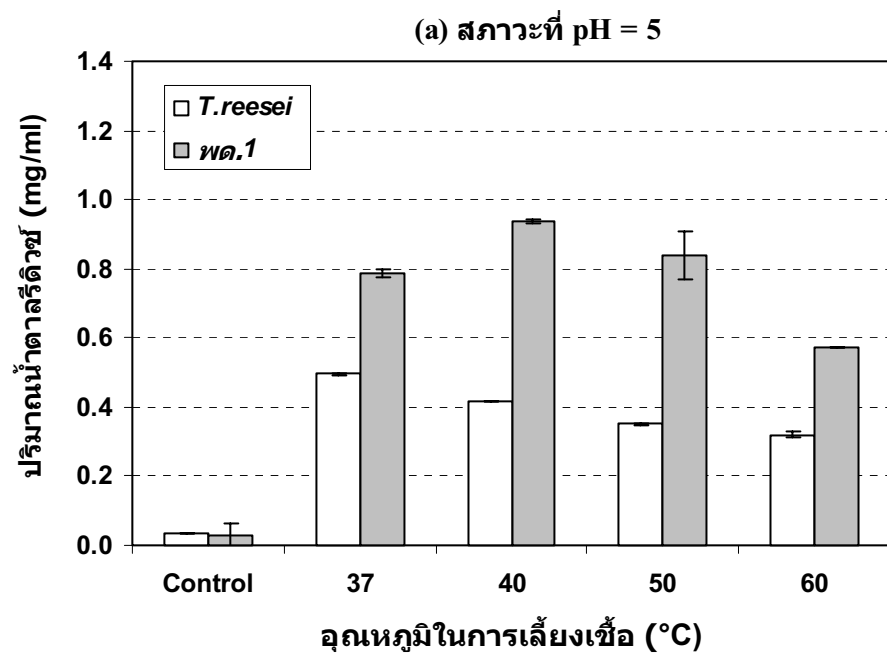
3.2.2 ผลของอุณหภูมิ ต่อการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยใช้ฟางข้าวเป็น substrate ในสภาวะที่อุณหภูมิ 37 – 60 องศาเซลเซียส ผลการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยเชื้อแต่ละชนิด แสดงในภาพที่ 3.7 (a) และ (b)

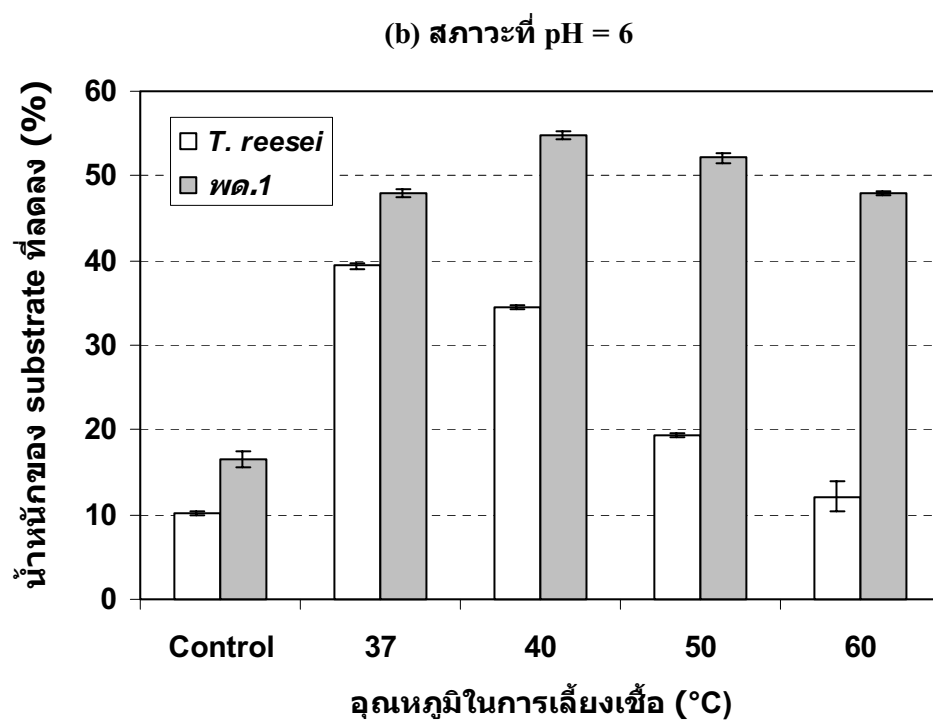
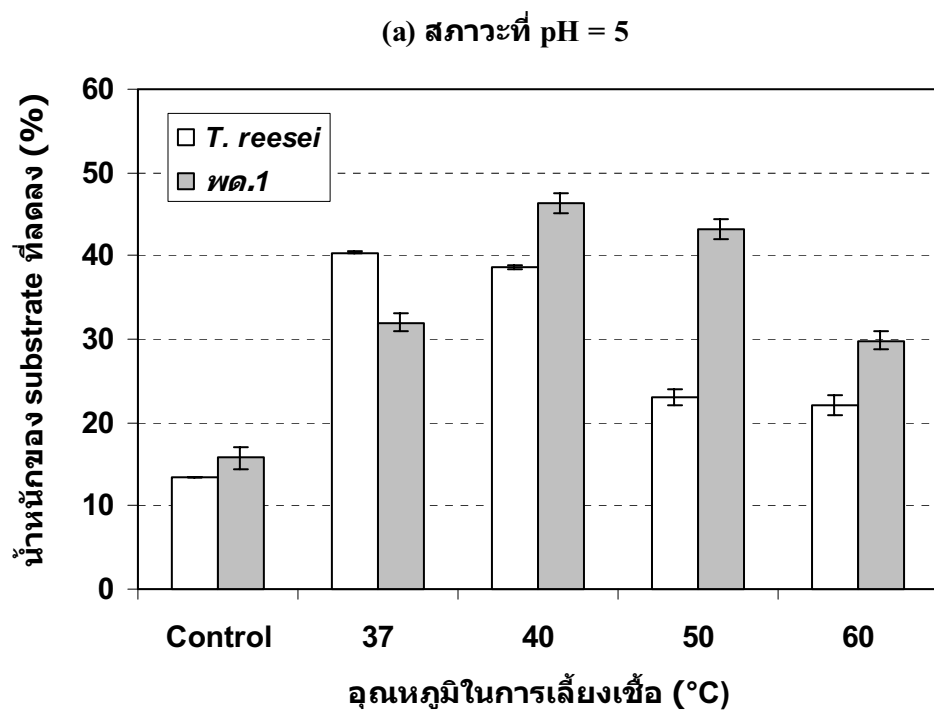
ถึงแม้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ *T. reesei* อยู่ที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 3.1.1) แต่จากกราฟในภาพที่ 3.7(a) และ (b) ระบุว่า ภายหลังจากการย่อยฟางข้าว เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในชุดทดลองที่ใช้เชื้อ *T. reesei* ตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็น **0.50 mg/ml** ที่ pH 5 และอุณหภูมิในการทดลองเป็น 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กลับมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่ออุณหภูมิในการทดลองเพิ่มขึ้นเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ไม่ใช่อุณหภูมิที่เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุด แต่น่าจะใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *T. reesei* มากกว่า คือ ประมาณ 30 - 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นๆ (Amany, 1999) (Muthuvelayudham, 2006)

ในชุดทดลองที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดถึง **1.26 mg/ml** ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 6 และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 40 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นถึงความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงและ ความสามารถในการย่อยสลาย substrate ของเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1

ในภาพที่ 3.8 เปรียบเทียบน้ำหนักที่ลดลงของ substrate เมื่อถูกย่อยสลายเป็นระยะเวลาสามวัน ในสภาวะที่มีอุณหภูมิระหว่าง 37 – 60 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด. 1 เห็นได้ชัดว่า การใช้เชื้อจุลินทรีย์รวมนั้น ทำให้ substrate มีการย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าการใช้เชื้อ *T. reesei* เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6 ทำให้น้ำหนักของ substrate ลดลงสูงสุดถึงร้อยละ 55 ของน้ำหนักเริ่มต้น ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกันที่ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด สำหรับการใช้ *T. reesei* ในการย่อยสลาย น้ำหนักของ substrate ลดลงได้มากที่สุด คือ ร้อยละ 40 ของน้ำหนักเริ่มต้นเมื่ออุณหภูมิในการทดลองเป็น 40 องศาเซลเซียส pH เป็น 5 ซึ่งเป็นสภาวะที่ตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเช่นเดียวกัน แนวโน้มของน้ำหนัก substrate ที่ลดลง กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ มีลักษณะที่สัมพันธ์สอดคล้องกันอย่างยิ่ง ซึ่งจะได้อธิบายและกล่าวถึงต่อไปในหัวข้อที่ 3.5



ภาพที่ 3.7 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ระยะเวลาในการทดลอง 3 วันที่ (a) pH = 5 และ (b) pH = 6



ภาพที่ 3.8 ผลของอุณหภูมิต่อน้ำหนักที่ลดลงของ substrate เนื่องจากการย่อยสลายโดยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ระยะเวลาในการทดลอง 3 วัน ที่ (a) pH = 5 และ (b) pH = 6

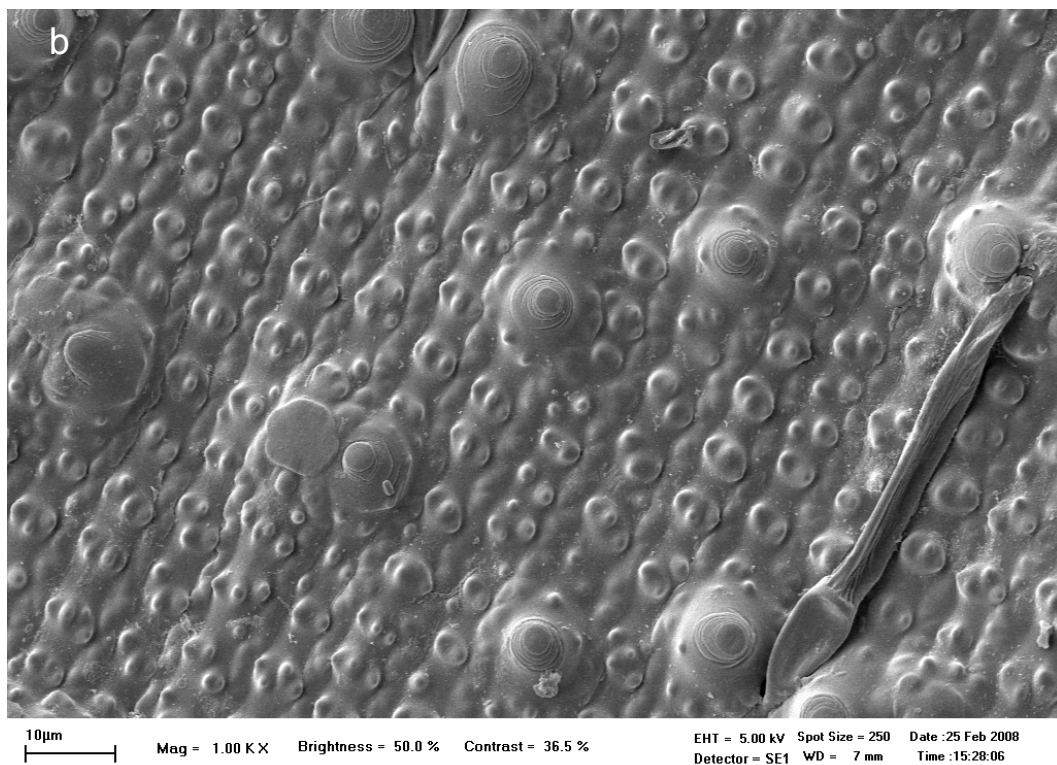
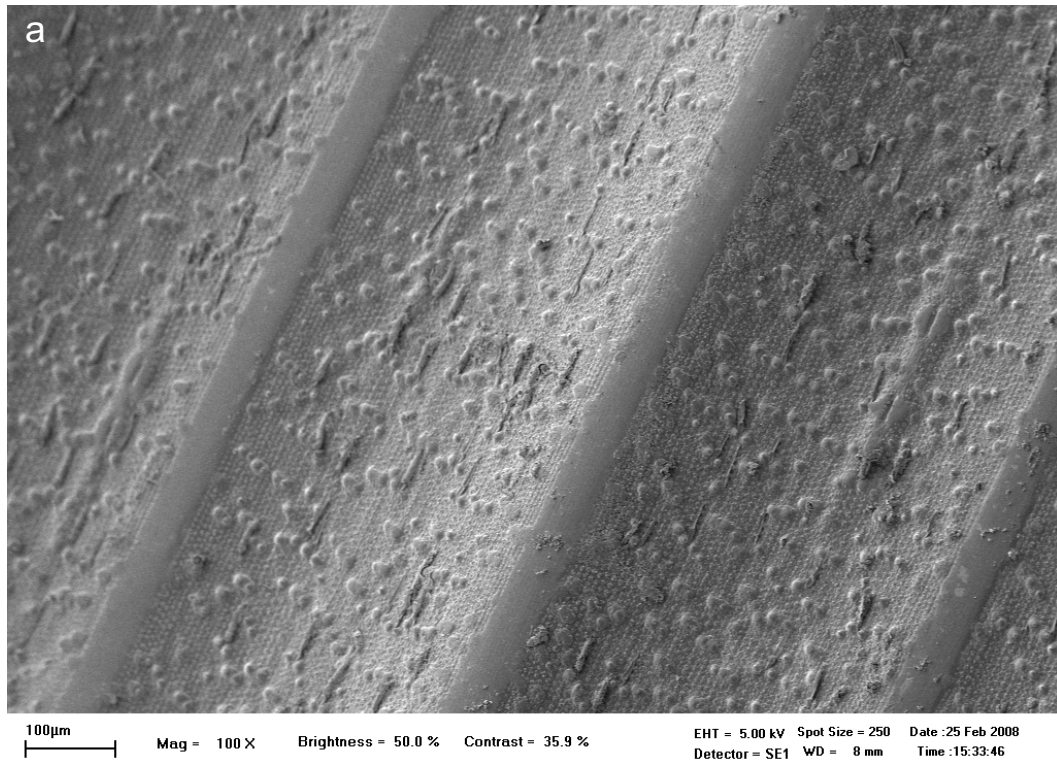
3.3 การตรวจสอบลักษณะทางจุลภาคของ substrate

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 3.2 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่เป็นเชื้อรา คือ *T. reesei* และการใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม คือ พด. 1 ที่ประกอบด้วยเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิด สามารถย่อยสลายฟางได้ โดยการปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสที่เปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสในฟางให้กลายเป็นสารประเภทน้ำตาล จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และการวัดน้ำหนักของฟางที่ลดลงพบว่า โดยภาพรวมแล้ว เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 สามารถย่อยสลายฟางได้รวดเร็วกว่า และมีน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นมากกว่าการใช้เฉพาะเชื้อ *T. reesei* เพียงอย่างเดียว เพื่อให้เข้าใจถึงสาเหตุของความแตกต่างที่เกิดขึ้น และผลจากการย่อยสลายที่มีต่อโครงสร้างของ substrate ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจสอบลักษณะจุลภาคของเศษฟางที่เหลือจากการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองประเภท หลังจากถูกย่อยในสภาวะที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยผลการตรวจสอบมีดังนี้

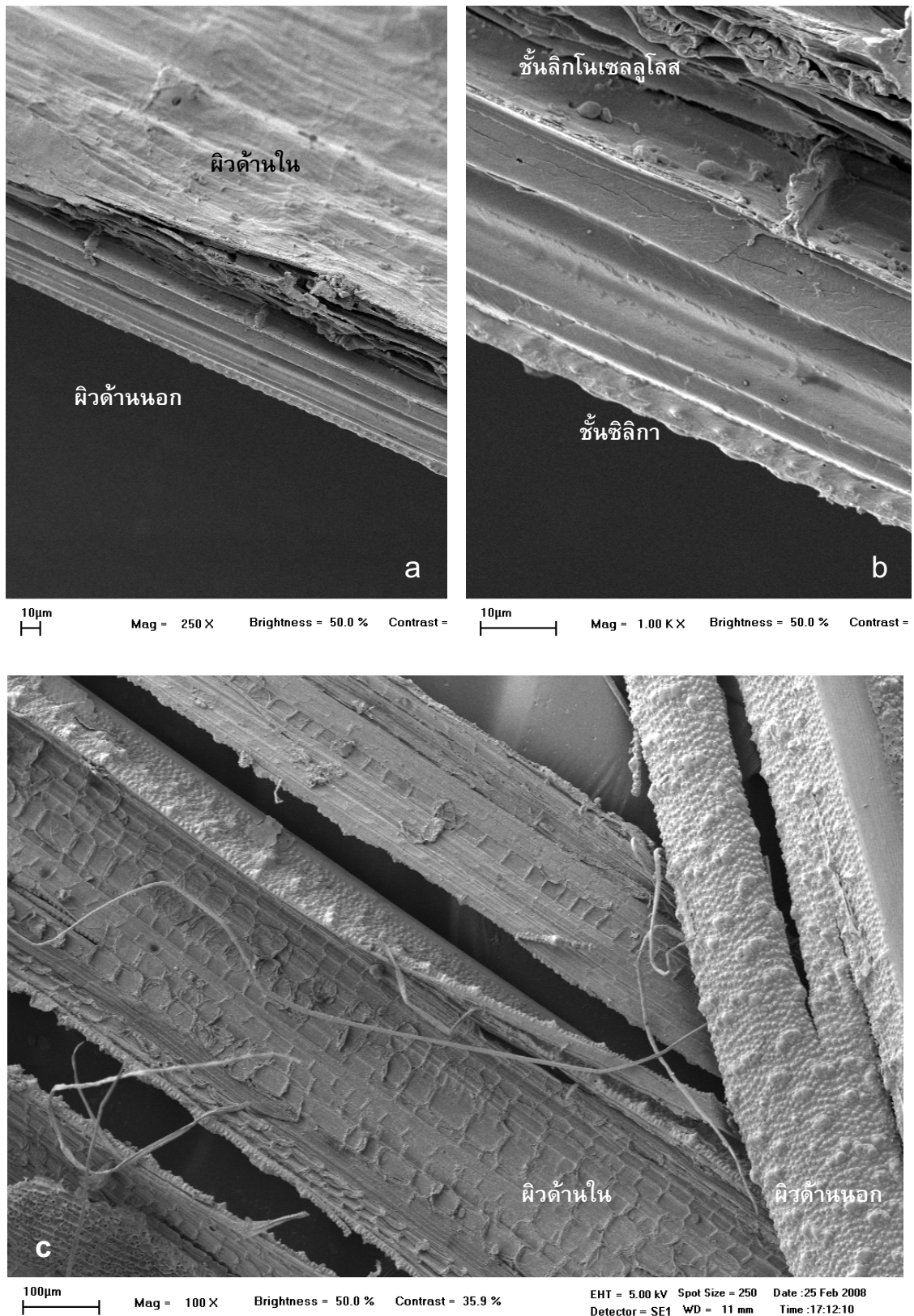
ภาพที่ 3.9 แสดงลักษณะทางจุลภาคของผิวด้านนอกของฟางก่อนถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ สังเกตเห็นซิลิกาที่มีลักษณะเป็นเม็ดเรียงกันเป็นระเบียบ ไม่มีรูพรุน ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับผิวนอกของกลบเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง และจากภาพตัดขวางของฟางข้าว (ภาพที่ 3.10 (b)) พบว่า ชั้นซิลิกาที่ผิวด้านนอกมีความหนาประมาณ 5 -10 ไมโครเมตร ส่วนผิวด้านในเป็นชั้นบางๆ จำนวนมากซ้อนทับกันโดยมีรูพรุนอยู่ระหว่างชั้น (ภาพที่ 3.10 (a)) ซึ่งคาดว่าชั้นด้านในเหล่านี้ คือ ลิกโนเซลลูโลสนั่นเอง ส่วนในภาพที่ 3.10(c) เป็นภาพของเศษฟางที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นเวลา 3 วันโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ซึ่งจะเห็นว่า ผิวด้านนอกยังคงมีลักษณะเป็นชั้นอยู่เช่นเดิม แต่ผิวด้านในมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน โดยมีความหนาลดลงเนื่องจากถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

ในภาพที่ 3.11(a) และ 3.11(b) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผิวด้านในของฟางก่อนถูกย่อยและหลังย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ตามลำดับ จะเห็นว่า ชั้นบางๆ ที่อยู่บนสุดของผิวด้านในถูกย่อยสลายหรืออาจหลุดออกไป ทำให้ชั้นลิกโนเซลลูโลสอื่นๆ ด้านล่างปรากฏขึ้น ชั้นด้านล่างมีลักษณะพรุนและมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูง ส่งผลให้เอนไซม์ประเภทต่างๆ ที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมา สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเป้าหมายในระหว่างการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ในภาพที่ 3.11(b) ยังแสดงให้เห็นกลุ่มเส้นใยไมโครไฟบริลที่เริ่มแยกออกจากกันเป็นเส้นใยเดี่ยวๆ เนื่องจากพันธะที่ยึดเส้นใยเซลลูโลสไว้ด้วยกันถูกทำลายด้วยเอนไซม์ endocellulase

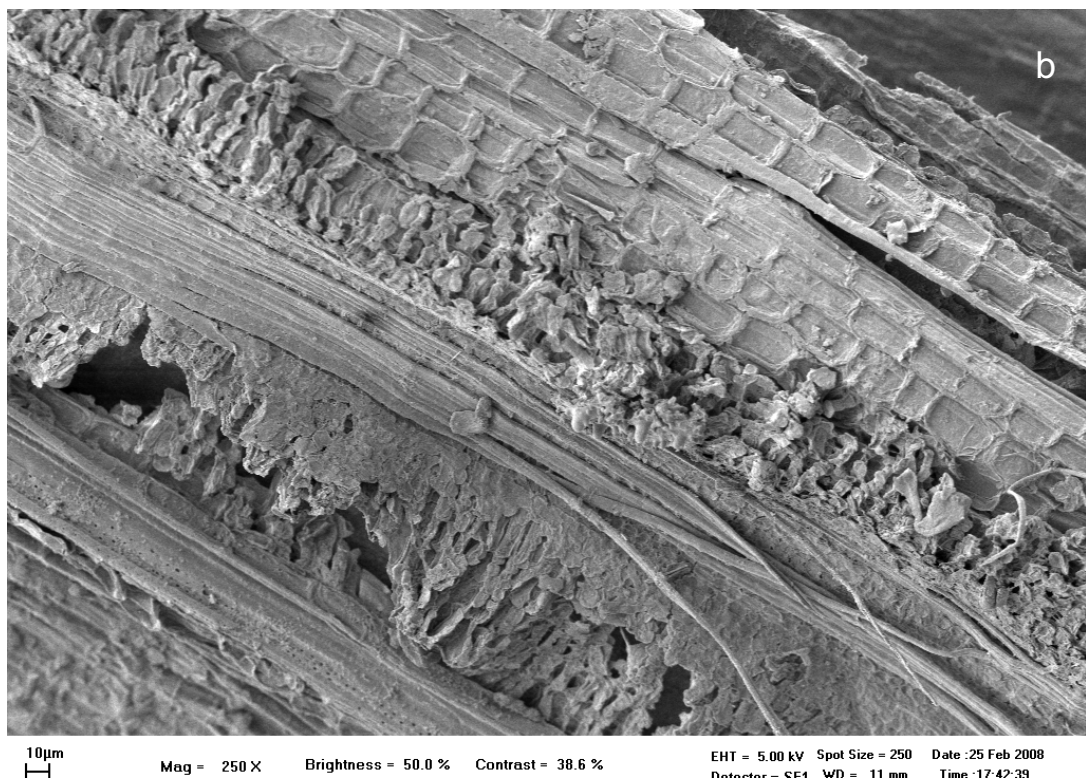
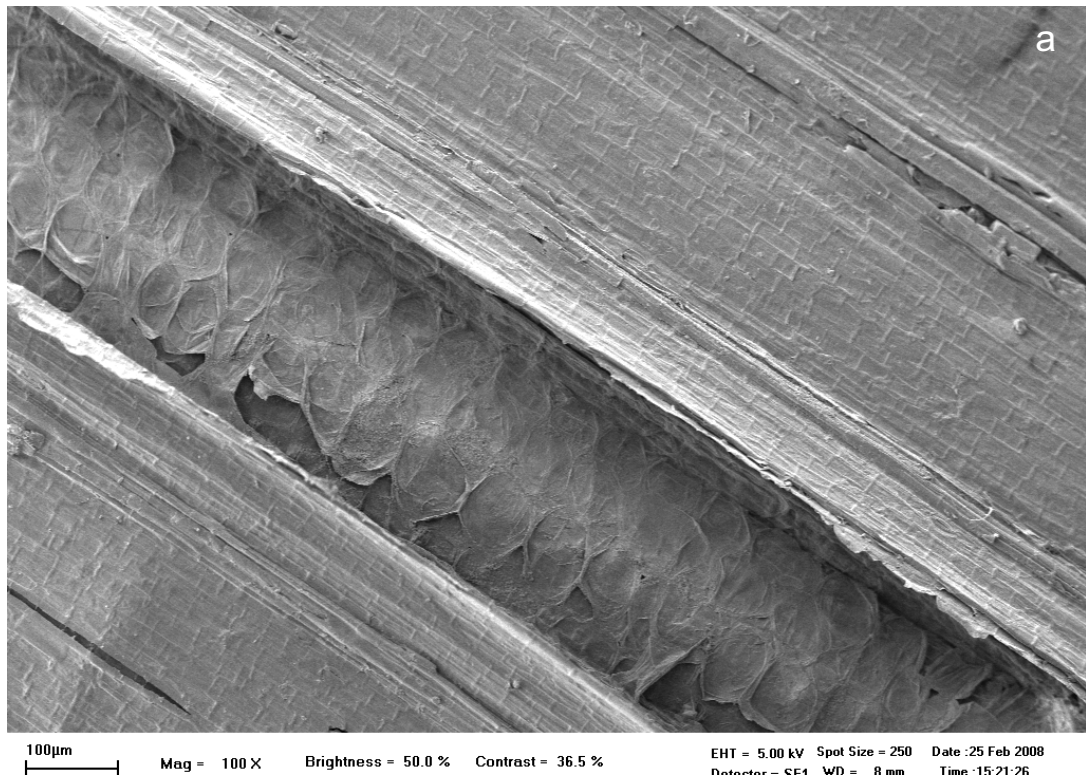
ในภาพที่ 3.12 เป็นภาพถ่ายที่กำลังขยายสูง ที่เปรียบเทียบลักษณะจุลภาคผิวด้านในของฟางที่ถูกย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองประเภทเป็นเวลา 3 วัน ลักษณะของผิวด้านในเมื่อถูกย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* (ภาพที่ 3.12 (b)) ยังคล้ายกับลักษณะผิวของฟางที่ไม่ถูกย่อย ในขณะที่การใช้เชื้อรวม พด.1 ให้ผลที่แตกต่างอย่างชัดเจน คือชั้นบางๆ ที่เป็นผิวด้านบนหายไป และทำให้ชั้นที่เคยอยู่ด้านล่างปรากฏขึ้น (ภาพที่ 3.12 (c))



ภาพที่ 3.9 ลักษณะจุลภาคของผิวหนังนอกของฟางข้าวก่อนถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ บันทึกลงด้วยกล้อง SEM ที่ (a) กำลังขยายประมาณ 100 เท่า และ (b) 1000 เท่าตามลำดับ



ภาพที่ 3.10 ภาพตัดขวางของฟางข้าวเปรียบเทียบระหว่าง (a) – (b) ลักษณะจุลภาคของฟาง ก่อนถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ กำลังขยาย 250 และ 1000 เท่าตามลำดับ แสดงลักษณะ โครงสร้างที่จัดเรียงเป็นชั้นบางๆ หลายชั้นซ้อนทับกัน (c) ฟางที่ถูกย่อยสลายเป็นเวลา 3 วัน ด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1



ภาพที่ 3.11 ลักษณะจุลภาคของผิวด้านในของฟางข้าว (a) ก่อนถูกย่อยสลาย และ (b) หลังการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 เป็นเวลา 3 วัน แสดงให้เห็นลักษณะโครงสร้างภายใต้ผิวด้านใน