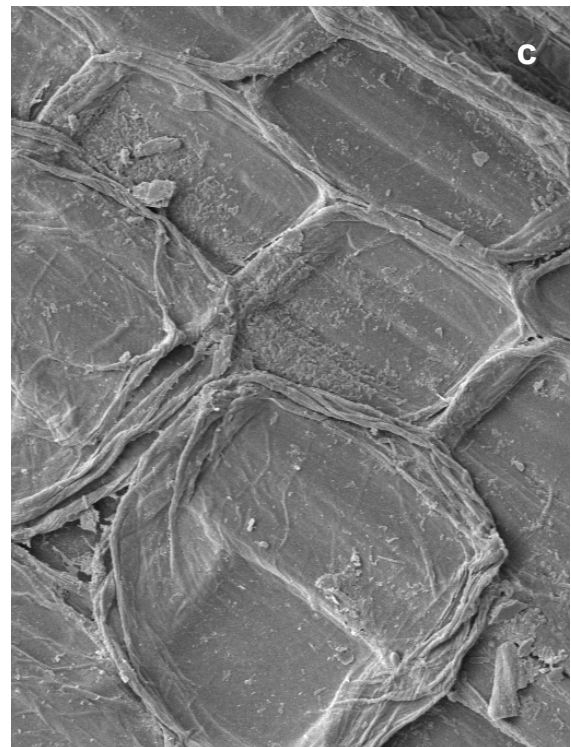
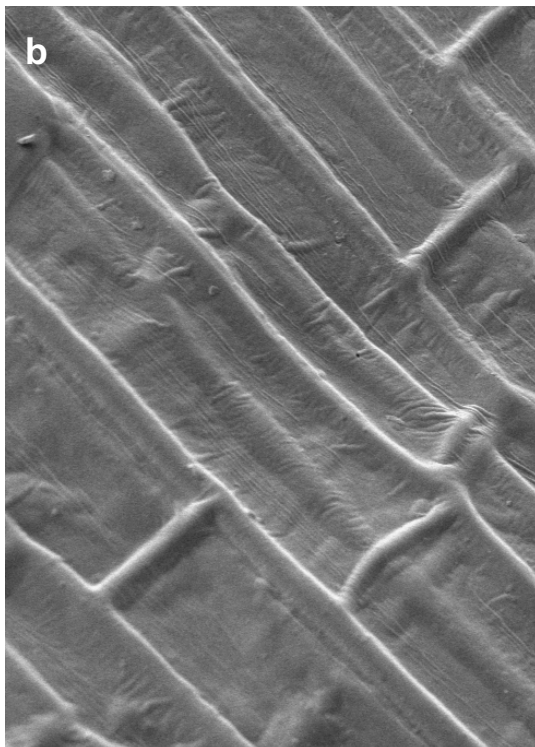
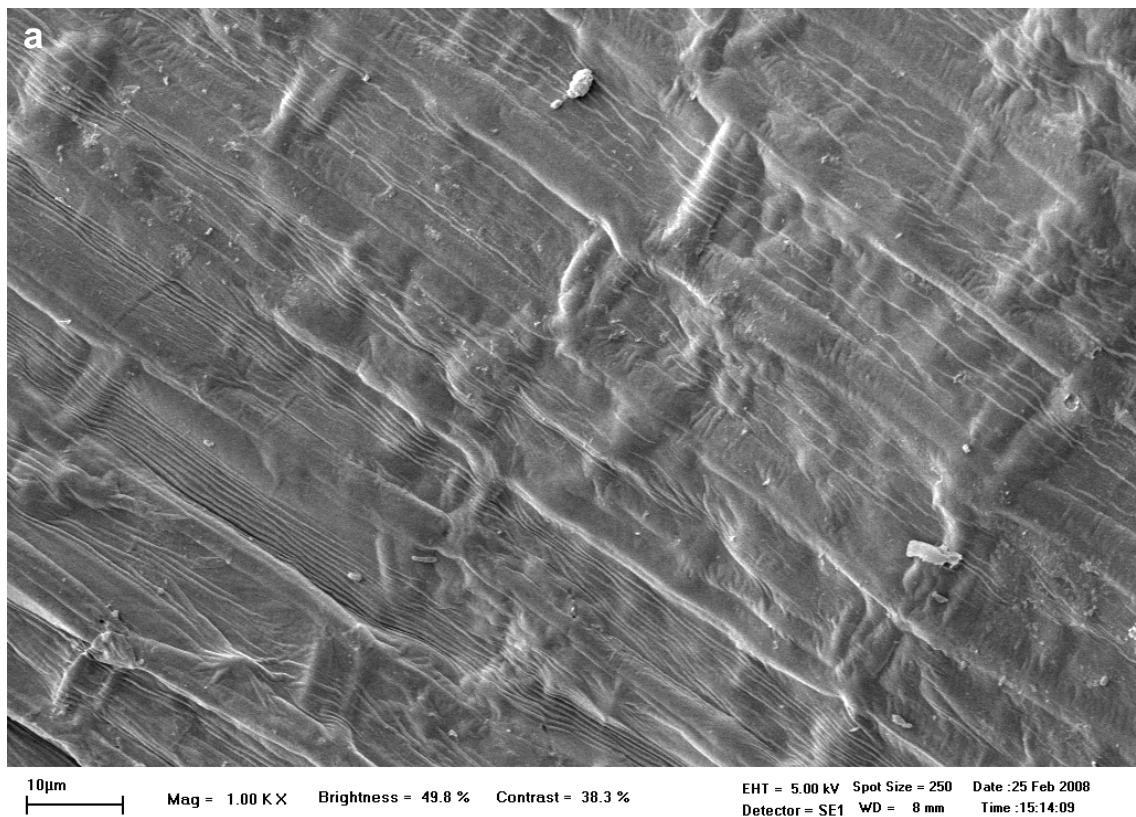




ภาพที่ 3.12 ลักษณะจุลภาคของผิวหนังของฟางข้าว (a) ก่อนถูกย่อยสลาย (b) หลังการย่อยสลายด้วยเชื้อ *T. reesei* และ (c) เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 เป็นเวลา 3 วัน ทุกภาพบันทึกโดยใช้กำลังขยายเท่ากันที่ 1000 เท่า

3.4 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักที่ลดลงของ substrate เนื่องจากการย่อยสลาย

กราฟในภาพที่ 3.8 แสดงค่าการลดลงของน้ำหนัก substrate (ฟางข้าว) หลังจากถูกย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน โดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักเริ่มต้น ในภาพที่ 3.8(a) และ (b) แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อน้ำหนักที่ลดลงของ substrate อันเนื่องมาจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ในสภาวะที่ pH เป็น 5 และ 6 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟที่แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงเดียวกัน (ภาพที่ 3.7) จะเห็นว่า สภาวะที่มีผลให้น้ำหนักของ substrate ลดลงมากที่สุด สำหรับทั้งเชื้อ *T. reesei* และเชื้อรวม พด.1 จะเป็นสภาวะเดียวกันกับที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากที่สุด คือที่ pH 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อรา *T. reesei* และที่ pH 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 นอกจากนี้ แนวโน้มการลดลงของน้ำหนัก substrate ที่สภาวะในการทดลองอื่นๆ ก็มีลักษณะที่สัมพันธ์กันกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ กล่าวคือ ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ เชื้อจุลินทรีย์สามารถทำการย่อยสลาย substrate ได้ดี จะพบว่าน้ำหนักของ substrate มีการลดลงมาก และเกิดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือ น้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นในระดับที่สูงด้วย

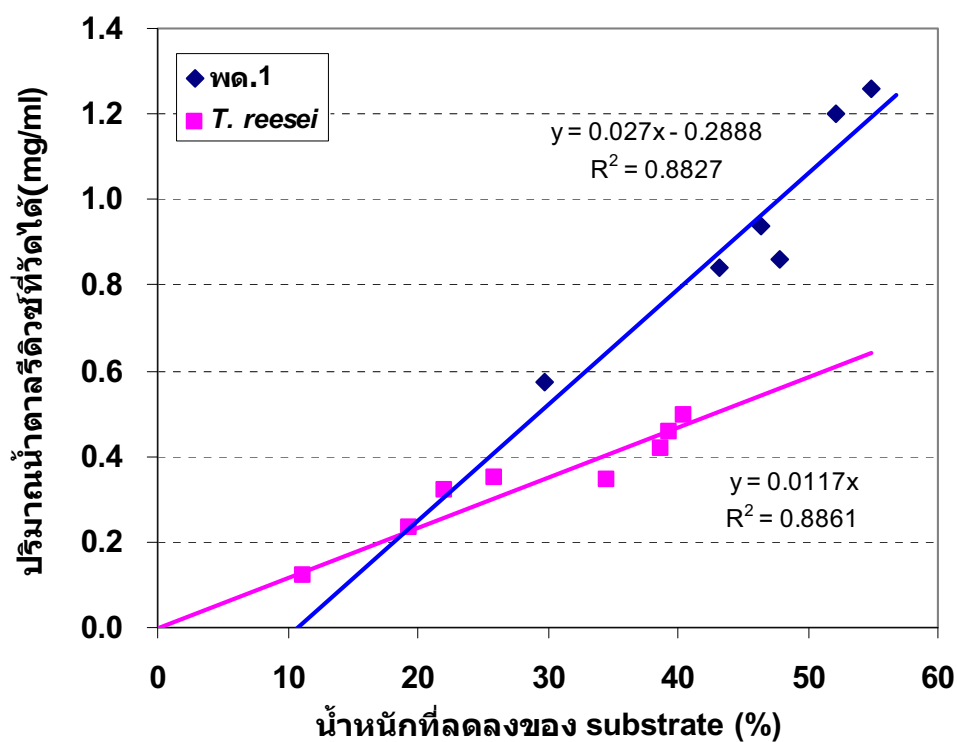
กราฟในภาพที่ 3.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนัก substrate ที่ลดลง กับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเชื้อทั้งสองประเภทในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน กรณีที่ใช้เชื้อ *T. reesei* นั้น ความสัมพันธ์มีลักษณะแบบเชิงเส้นที่ผ่านจุดกำเนิด แต่กรณีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พบความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นที่ไม่ผ่านจุดกำเนิด และมีอัตราส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักที่ลดลงของ substrate สูงกว่าการใช้เชื้อ *T. reesei* เพียงอย่างเดียว

ความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นที่ผ่านจุดกำเนิด ในกรณีของการใช้เชื้อรา *T. reesei* เพียงอย่างเดียวในการย่อยสลาย บ่งชี้ว่ามีกลไกหรือปฏิกิริยาของการย่อยสลายเกิดขึ้นเพียงแบบเดียว กล่าวคือ เป็นปฏิกิริยาชีวเคมีที่มีการใช้สารเริ่มต้น มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย และมี product หรือน้ำตาลรีดิวซ์ แบบเดียวกัน เกิดขึ้นในทุกๆ สภาวะที่ทดลอง แม้ว่าในบางสภาวะจะมี product เกิดขึ้นมากกว่าสภาวะอื่นๆ ก็ตาม แต่จากผลที่ได้ ยังคงไม่สามารถระบุได้ว่า น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นน้ำตาลชนิดใด

สำหรับกรณีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 นั้น จากกราฟบ่งชี้ว่า substrate น่าจะถูกย่อยให้มีขนาดที่เล็กลงก่อนในระยะแรก ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในระยะต่อไป และการที่อนุภาคของ substrate มีขนาดเล็กลงนั้น อาจเป็นสาเหตุให้การเปลี่ยนกลีโคเจนเป็นน้ำตาลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะที่สอง เนื่องจากเชื้อ พด.1 ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย เช่น *Bacillus sp.* แอคติโนมัยซีส (*Streptomyces sp.*) และรา *Scopulariopsis sp.*, *Helicomyces sp.*, *Chaetomium sp.* และ *Trichoderma sp.* ดังนั้น เป็นไปได้ที่ในระยะแรก เชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Bacillus sp.* หรือแอคติโนมัยซีส (*Streptomyces sp.*) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์

ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายผู้พังของสารอินทรีย์ในธรรมชาติ จะทำหน้าที่ลดขนาดของ substrate ลงให้กลายเป็นอนุภาคที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และสร้างหรือเปิดพื้นที่ผิวใหม่ที่มียอดประกอบแตกต่างจากกลไกโนเชลลูโลสที่บริเวณผิวของ substrate ดังจะเห็นได้จากกราฟช่วงแรกที่ substrate มีน้ำหนักลดลง แต่ยังไม่มือน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น จากนั้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เข้าทำการย่อยสลายอนุภาคขนาดเล็กหรือพื้นที่เป้าหมายใหม่ที่เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงส่งผลให้น้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ดังนั้นด้วยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด เชื้อรวม พด.1 จึงสามารถทำให้การลดลงของน้ำหนัก substrate เป็นไปอย่างรวดเร็วและสร้างน้ำตาลรีดิวซ์ได้เป็นปริมาณที่สูงกว่าการใช้เชื้อรา *T. reesei* เพียงอย่างเดียว

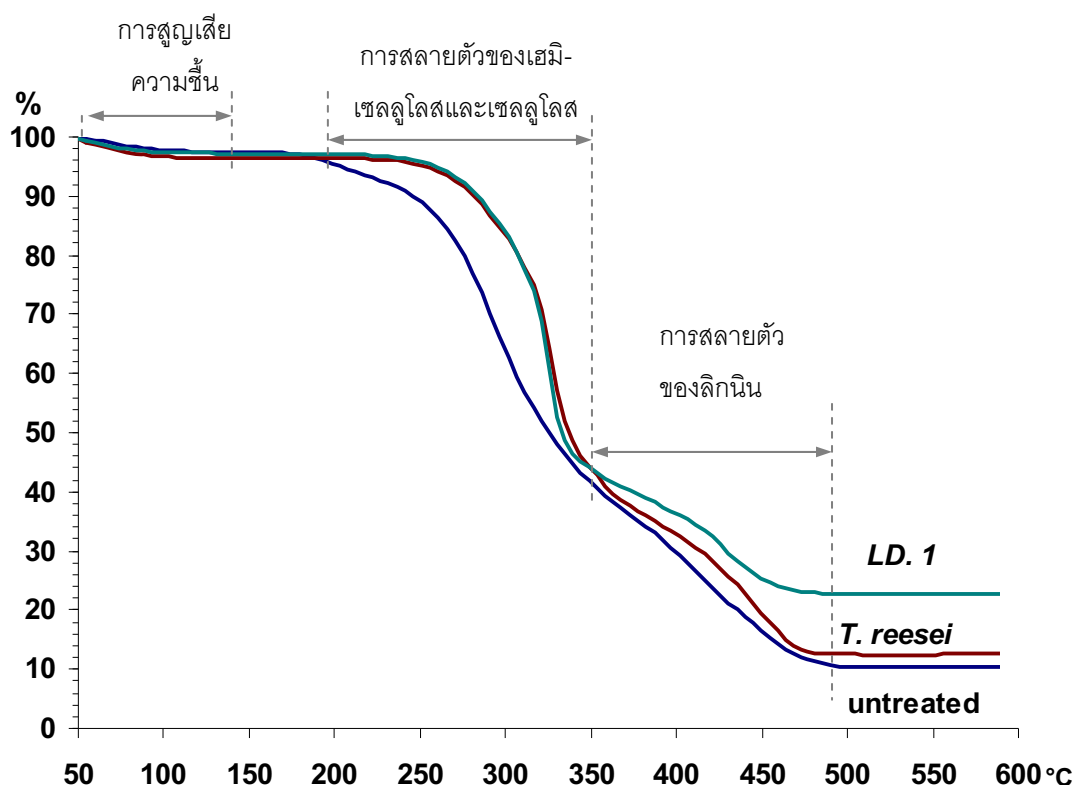


ภาพที่ 3.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น และน้ำหนักที่ลดลงของ substrate เนื่องจากการย่อยสลายเป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1

3.5 ผลการวิเคราะห์กาก substrate ด้วยเทคนิคทางความร้อน

จากผลการวิเคราะห์ทางความร้อน กราฟ TGA ในภาพที่ 3.14 ในช่วงอุณหภูมิ 50-130 องศาเซลเซียส ทุกตัวอย่างที่ทดสอบมีการสูญเสียความชื้นประมาณร้อยละ 2.5 ถึงร้อยละ 3.5 จากนั้น ตั้งแต่อุณหภูมิประมาณ 200 องศาเซลเซียส ฟางข้าวที่ไม่ผ่านการย่อย เริ่มมีการสูญเสียมวลก่อน ในขณะที่ฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* และ เชื้อรวม พด.1 นั้น เริ่มมีการสูญเสียมวลที่ประมาณ 230 องศาเซลเซียส และสิ้นสุดที่ประมาณ 340 องศาเซลเซียส การสูญเสียมวลที่เกิดขึ้นในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 200 – 340 องศาเซลเซียส เป็นการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส (Mansaray and Ghaly 1999) ซึ่งมีผลให้มวลถึงประมาณร้อยละ 50 สูญหายไป สำหรับการสูญเสียมวลในช่วงต่อมาคือตั้งแต่ 350 -470 องศาเซลเซียส เป็นการสลายตัวของลิกนิน มีผลให้เกิดการสูญเสียมวลประมาณร้อยละ 20-30

หลังการเผา ฟางที่ไม่ผ่านการย่อย มีเถ้าเหลือเพียงร้อยละ 10 ของน้ำหนักเริ่มต้น ในขณะที่ฟางที่ถูกย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อรวม พด.1 มีปริมาณเถ้าที่เหลือร้อยละ 12 และร้อยละ 23 ของน้ำหนักเริ่มต้นตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า หลังการย่อยสลายด้วยเชื้อรวม พด.1 เป็นเวลา 3 วัน ปริมาณลิกโนเซลลูโลสในฟางลดลง และลดลงมากกว่าการย่อยด้วยเชื้อรา *T. reesei* ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และลักษณะทางจุลภาคที่ได้กล่าวถึงแล้ว



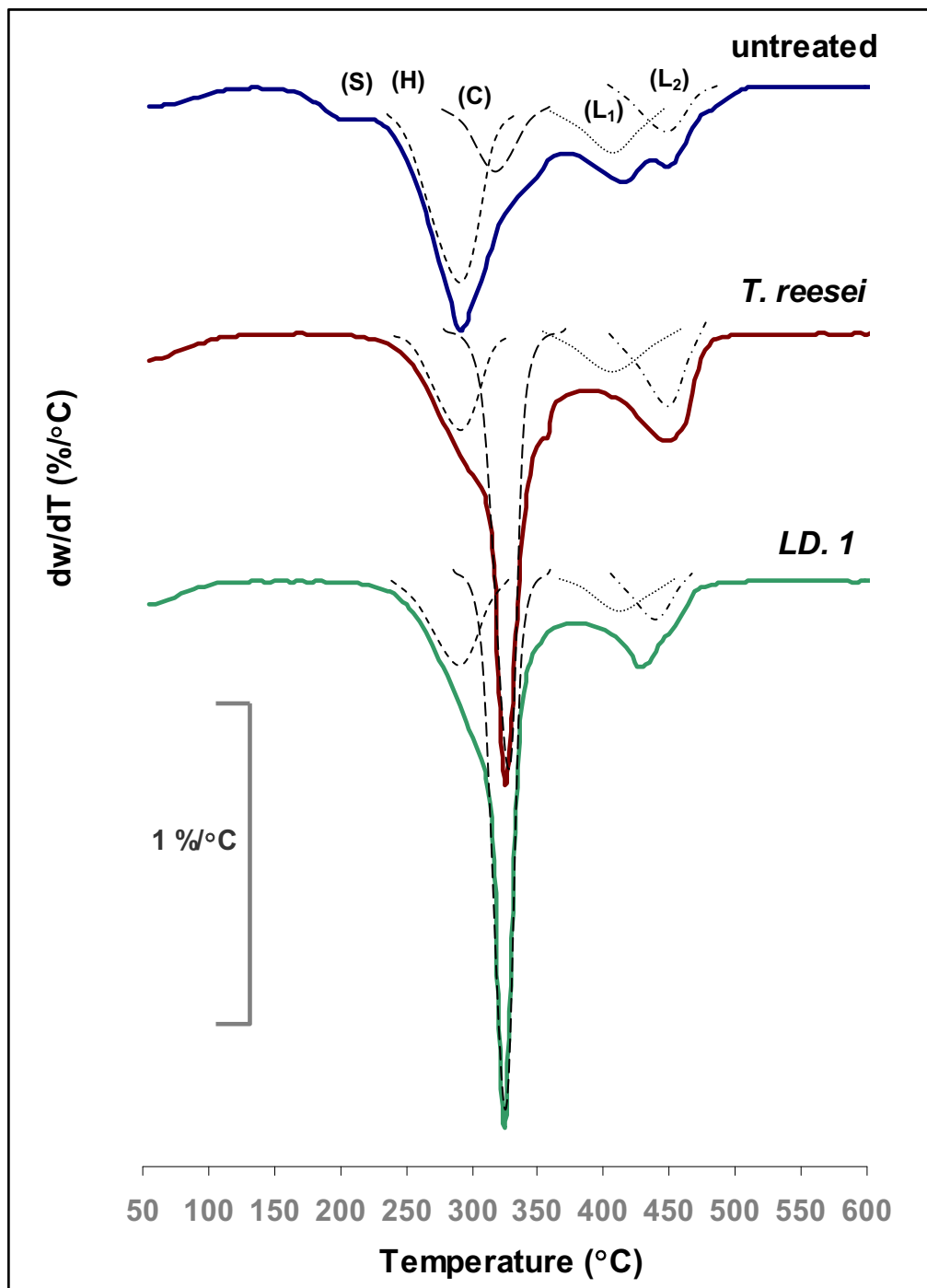
ภาพที่ 3.14 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางความร้อนในบรรยากาศออกซิเจน ของฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์ พด.1 เปรียบเทียบกับฟางที่ไม่ผ่านการย่อย

ในภาพที่ 3.15 เป็น DTG curve หรือ เป็นอัตราการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก (จากข้อมูล TGA) เทียบกับอุณหภูมิ ซึ่งสามารถแสดงถึงรายละเอียดของกระบวนการการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนได้ชัดเจนขึ้น จะเห็นได้ว่า ในฟางที่ไม่ผ่านการย่อย เริ่มมีการสูญเสียมวลก่อนที่จะอุณหภูมิประมาณ 200 องศาเซลเซียส พีก (S) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นการสลายตัวขององค์ประกอบที่สามารถละลายน้ำได้จำพวกน้ำตาล จึงไม่พบในตัวอย่างอื่นเพราะถูกละลายไปเมื่อแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้ว

ด้วยเหตุที่ Thermogram ที่ได้จากตัวอย่างประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น เป็นผลมาจากปฏิกิริยาการสลายตัวทางความร้อนขององค์ประกอบแต่ละประเภท ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส และลิกนิน (Williams and Besler 1996) ดังนั้น ในภาพที่ 3.15 ผู้วิจัยจึงได้แสดงกราฟที่จำลอง DTG ของแต่ละองค์ประกอบด้วยเส้นประแบบต่าง ๆ เอาไว้ด้วย เพื่ออธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับฟางที่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ กล่าวคือ ตั้งแต่อุณหภูมิประมาณ 240 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป เป็นช่วงของการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส (H) ซึ่งสิ้นสุดที่ประมาณ 320 องศาเซลเซียส ส่วนการสลายตัวของเซลลูโลส (C) เริ่มต้นที่อุณหภูมิประมาณ 280 องศาเซลเซียส สิ้นสุดที่ประมาณ 360 องศาเซลเซียส

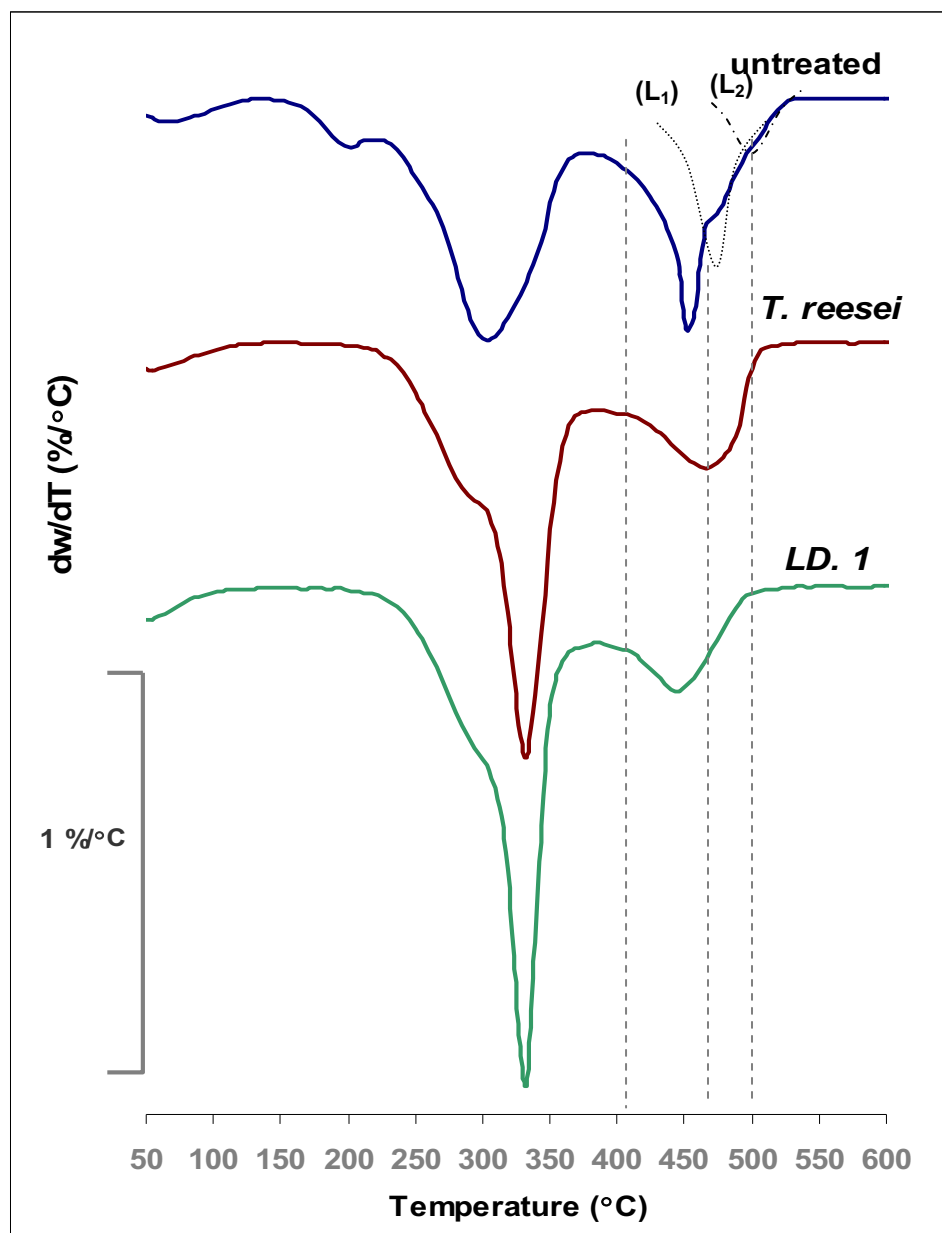
จะเห็นได้ว่า ในฟางที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ ปรากฏพีกที่เกิดจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสอย่างเด่นชัด แต่กลับไม่เห็นพีกที่สัมพันธ์กับการสลายตัวของเซลลูโลสได้ชัดเจน ทั้งๆ ที่ในฟางเริ่มต้น มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบในสัดส่วนที่สูงถึงกว่าร้อยละ 30 ตรงกันข้ามกับผลที่ได้จากการทดสอบกับฟางที่ผ่านการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ทั้งจุลินทรีย์รวมและชนิดเดียวเป็นเวลา 3 วัน พบว่า พีกที่เด่นชัดที่สุด เป็นพีกจากการสลายตัวของเซลลูโลส (C) แต่พีกของเฮมิเซลลูโลส (H) กลับเห็นไม่ชัดเจน ผู้วิจัยเชื่อว่า น่าจะเป็นเพราะก่อนถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ทั้งเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในฟางอยู่รวมกัน เมื่อนำไปเผาเฮมิเซลลูโลสจึงเริ่มมีการสลายตัวก่อน ดังนั้นความร้อนรวมทั้งกาซที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลส อาจส่งผลต่อปฏิกิริยาการสลายตัวของเซลลูโลส ทำให้พีกของการสลายตัวของเซลลูโลส ไม่ปรากฏชัดในฟางที่ไม่ผ่านการย่อย แต่ในฟางที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ เฮมิเซลลูโลสบางส่วนน่าจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ xylanase ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และมีผลให้เส้นใยเซลลูโลสเป็นอิสระมากขึ้น (ภาพที่ 3.11(b)) ดังนั้น พีกของ DTG curve ที่ได้จากการสลายตัวของเซลลูโลสจึงเด่นชัดมากขึ้นในขณะที่พีกจากการสลายตัวของเฮมิเซลลูโลสกลับลดลง สัมพันธ์กับปริมาณของเฮมิเซลลูโลสที่ลดลง

จากรายงานวิจัยอื่นๆ ระบุว่า พีกที่ปรากฏขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 350 - 470 องศาเซลเซียส เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสลายตัวของลิกนิน แต่จาก DTG curve โดยเฉพาะในตัวอย่างฟางที่ไม่ผ่านการย่อย จะเห็นว่า มีสองพีก แสดงว่าปฏิกิริยาการสลายตัวทางความร้อนที่พบในช่วงอุณหภูมินี้ น่าจะเกิดจากสององค์ประกอบ (L_1 และ L_2) ที่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าคืออะไร การย่อยสลายฟางด้วยเชื้อ *T. reesei* มีผลให้องค์ประกอบ L_1 ลดลง ในขณะที่การย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 กลับมีผลให้องค์ประกอบ L_2 ลดลง



ภาพที่ 3.15: DTG curve ของฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 เปรียบเทียบกับฟางที่ไม่ผ่านการย่อย ทดสอบในบรรยากาศออกซิเจน

ภาพที่ 3.16 เป็น DTG curve ของตัวอย่างทั้งสามเช่นเดิม เพียงแต่ทดสอบในอากาศ แทนในบรรยากาศออกซิเจน พบว่า ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับในภาพที่ 3.15 โดยเฉพาะในช่วงอุณหภูมิ 350 - 470 องศาเซลเซียส ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสลายตัวของลิกนิน สามารถจำแนกออกเป็นสองปฏิกิริยา (L_1 และ L_2) ในฟางที่ไม่ผ่านการย่อยมีพีค L_1 ที่ชัดเจน ในขณะที่องค์ประกอบที่ให้พีค L_2 ซึ่งสลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 400 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรวม พด.1 มีปริมาณลดลงอย่างชัดเจน ดังนั้น การเตรียมซิลิกาอสังฐานโดยการเผาฟางที่ถูกย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 น่าจะสามารถเผาไล่อินทรีย์สารได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิเพียง 450-500 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.16: DTG curve แสดงปฏิกิริยาการสลายตัวของฟางข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* และเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 เทียบกับฟางที่ไม่ผ่านการย่อย ทดสอบในอากาศ (air)

3.6 ผลการวิเคราะห์และตรวจสอบเก้าอี้ที่ได้จากการเผาฟาง

ฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน เมื่อนำกากที่เหลือจากการย่อยจากแต่ละการทดลองไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่ยังเหลืออยู่ พบว่านอกจากปริมาณเก้าอี้ที่ได้จะแตกต่างกันแล้ว ยังมีลักษณะและสีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 3.17

โดยเก้าอี้ฟางที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (Untreated) มีลักษณะเป็นผงสีขาวอมชมพูอ่อนๆ มีเศษฟางสีดำซึ่งเป็นคาร์บอนที่ยังเผาไหม้ไม่หมดปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ส่วนเก้าอี้จากกากฟางที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม (LD.1) มีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียด คล้ายแป้ง แสดงถึงการเผาไหม้ของอินทรีย์วัตถุที่สมบูรณ์กว่าตัวอย่างอื่นๆ และสุดท้าย เก้าอี้จากกากฟางที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อรา *T. reesei* มีลักษณะเป็นผงละเอียดแต่สีไม่ขาวเท่ากับกรณีการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม จากผลการวิเคราะห์ทางความร้อน สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นอินทรีย์สารในกลุ่มของลิกนินที่ยังเผาไหม้ได้ไม่สมบูรณ์ และหากเพิ่มอุณหภูมิในการเผาให้สูงขึ้นหรือเพิ่มระยะเวลาในการเผาให้นานขึ้นน่าจะสามารถกำจัดมลทินที่เหลืออยู่นี้ออกไปหมดได้

ในหัวข้อถัดไปจะแสดงถึงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเก้าอี้ทั้งสามด้วยรังสีเอกซ์ เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของซิลิกาและปริมาณของสารอนินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นมลทิน



ภาพที่ 3.17: ลักษณะของสีและความละเอียดของเก้าอี้ฟางที่ไม่ผ่านและผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ และเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส

3.6.1 องค์ประกอบทางเคมี

ตารางที่ 3.1: การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วงาด้วยรังสีเอกซ์

ตัวอย่าง ถั่วงา	ปริมาณที่พบ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)								
	SiO ₂	K ₂ O	CaO	MgO	Mn ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅	SO ₃	รวม
CT	72.60	17.94	1.86	2.67	0.56	0.18	2.88	1.21	99.9
LD	73.65	1.12	2.52	1.07	9.88	0.13	9.83	1.66	99.9
TR	82.53	2.55	2.64	1.18	3.42	0.17	4.70	2.66	99.9

หมายเหตุ: CT คือ ถั่วงาจากชุดควบคุม; LD คือ ถั่วงาของฟางที่ถูกย่อยด้วยเชื้อรวม พด.1; และ TR คือถั่วงาของฟางที่ถูกย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei*

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของถั่วงาที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (LD และ TR) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (CT) ดังตารางที่ 3.1 พบว่า ปริมาณซิลิกาของทุกตัวอย่างยังอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเป้าหมาย (ร้อยละ 99) อยู่มาก โดยถั่วงาที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* มีสัดส่วนของซิลิกาสูงที่สุดในกลุ่ม คือร้อยละ 82.5 ในขณะที่ถั่วงาที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายของอินทรีย์สารที่สูงสุด กลับมีสัดส่วนของซิลิกาเพียงร้อยละ 73.6 อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับซิลิกาจากตัวอย่างถั่วงาชุดควบคุม

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณของออกไซด์ที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ ร่วมด้วย พบว่า ในถั่วงา LD นั้น มีแมงกานีส และ ฟอสฟอรัส ปะปนอยู่ในปริมาณที่สูง โดยธาตุทั้งสองนี้มีน้ำหนักรวมกันในรูปของสารประกอบออกไซด์ถึงร้อยละ 19.7 ในขณะที่ถั่วงา TR มีปริมาณของแมงกานีสและฟอสฟอรัสในรูปของสารประกอบออกไซด์รวมกันเพียงร้อยละ 8.1 และในชุดควบคุมมีเพียงร้อยละ 3.4 เท่านั้น คำถามที่เกิดขึ้นคือ ธาตุทั้งสองที่พบมากในตัวอย่างถั่วงา LD มีที่มาอย่างไร

การที่พบแมงกานีสและฟอสฟอรัสในถั่วงาชุดควบคุม (CT) มีปริมาณที่ต่ำ บ่งชี้ว่า ธาตุทั้งสองไม่ได้มีอยู่ในฟางตั้งแต่เริ่มต้น แต่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากการนำฟางไปผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเชื้อจุลินทรีย์ จากการตรวจสอบพบว่า ทั้งแมงกานีส และฟอสฟอรัส น่าจะมีที่มาจาก Manganese sulfate (MnSO₄) และ Di-potassium hydrogen phosphate (KH₂PO₄) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง (Basal media) นั้นเอง และการที่พบแมงกานีสและฟอสฟอรัสในตัวอย่างถั่วงา LD เป็นปริมาณที่สูงอาจเพราะในช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงได้ดึงเอาแมงกานีสและฟอสฟอรัสจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ ทำให้บริเวณรอบๆ substrate ที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่หนาแน่นมีระดับความเข้มข้นของธาตุทั้งสองสูง

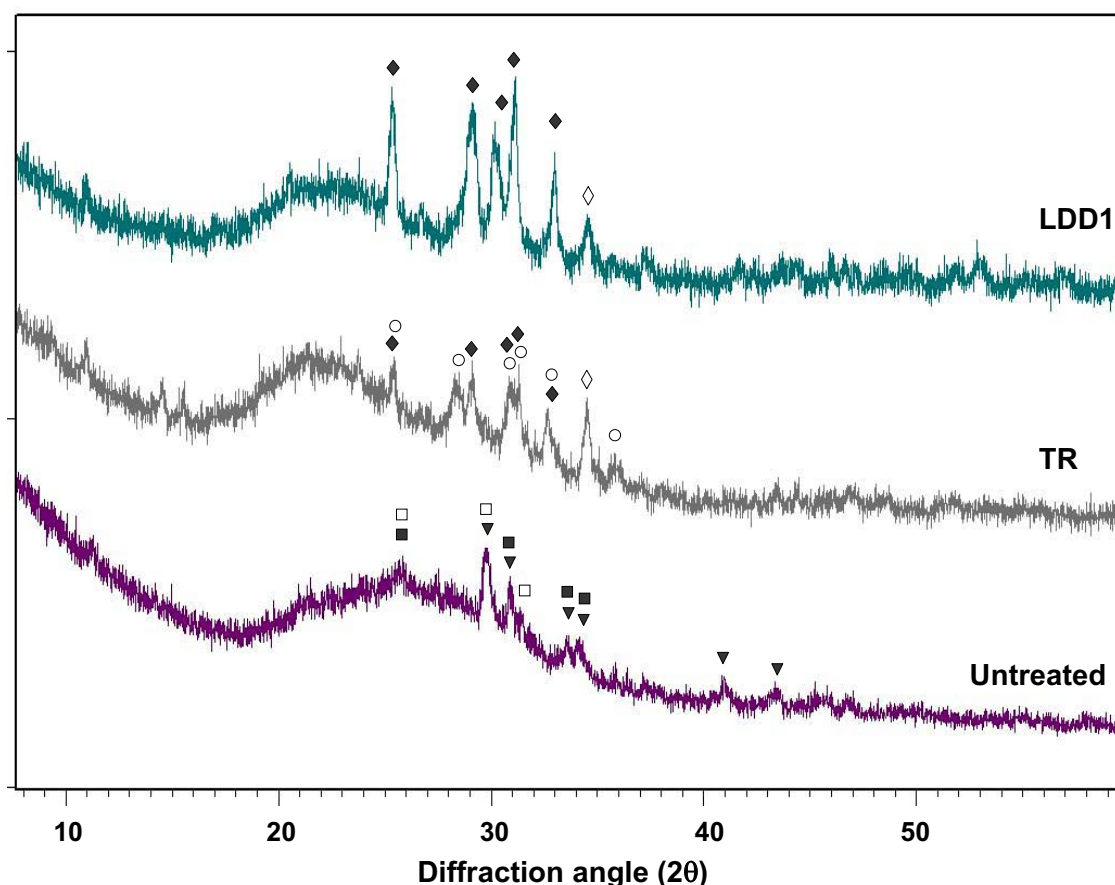
มากกว่าบริเวณอื่นๆ ธาตุทั้งสองจึงอาจถูกสะสมหรือถูกดูดซับไว้โดย substrate ดังนั้น ในตัวอย่าง LD ซึ่งมีปริมาณของซิลิกาต่อน้ำหนักรวมของฟางสูงกว่าตัวอย่าง TR จึงทำให้พบแมงกานีสและฟอสฟอรัสในตัวอย่างเก่า LD เป็นสัดส่วนที่สูงกว่าในตัวอย่างเก่า TR

3.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางแร่และความเป็นผลึก

เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ทางเคมีที่พบในเก่าฟางตัวอย่างต่างๆ จากการทดลองที่ผ่านมา ตัวอย่างเก่าฟางทั้งสามถูกนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางแร่และความเป็นผลึกโดยใช้เทคนิคการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ ผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 3.18

เฟสหลักที่พบในตัวอย่างเก่าทั้งสามคือซิลิกาชนิดอสัณฐาน ซึ่งสัมพันธ์กับพีคที่มีฐานกว้างเริ่มตั้งแต่มุม 2θ เท่ากับ 17 องศาไปจนถึงประมาณ 28 องศา พีคที่มีลักษณะกว้างเช่นนี้แสดงให้เห็นถึงการจัดเรียงตัวของโครงข่ายซิลิกาแบบมีระเบียบในระยะสั้นเพียงไม่กี่ยูนิตเซลล์ โดยเฉพาะในตัวอย่างเก่าฟางที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์ก่อนนำไปเผา (untreated) ที่มีลักษณะของความเป็นอสัณฐานมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ สังเกตจากการที่ตัวอย่าง untreated มีฐานของพีคซิลิกาอสัณฐานที่กว้างที่สุด นอกจากนี้ ยังพบทั้งโพแทสเซียมออกซาลेट ($K_2C_2O_4$) และ K_2CO_3 ซึ่งยืนยันถึงที่มาของโพแทสเซียมที่มีอยู่มากในฟาง สารประกอบเหล่านี้ เป็นฟลักซ์ที่ทำให้ซิลิกาอสัณฐานบางส่วนเกิดการหลอมที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส (Krishnarao et al., 2001) ส่งผลให้โครงสร้างของซิลิกาบริเวณนั้นยิ่งมีความไม่เป็นระเบียบเพิ่มมากขึ้น คำอธิบายนี้สัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพหลังเผาของเก่าฟางที่ไม่ผ่านการย่อย คือ เมื่อสัมผัสด้วยนิ้วจะเปราะร่วมแตกง่าย เมื่อซิลิกาอสัณฐานมีการหลอมเช่นนี้ ส่งผลให้การเตรียมให้ได้ซิลิกาอสัณฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นไปได้ยาก เพราะกระบวนการกำจัดโลหะอัลคาไลน์ที่แพร่เข้าไปในโครงสร้างซิลิกาแล้วนั้น ทำได้ยากลำบาก เมื่อเปรียบเทียบกับเก่าฟางที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ผงของเก่าที่ได้มีลักษณะที่นุ่มละเอียดคล้ายแป้ง อนุภาคไม่มีลักษณะของการหลอมติดกันเป็นแก้ว

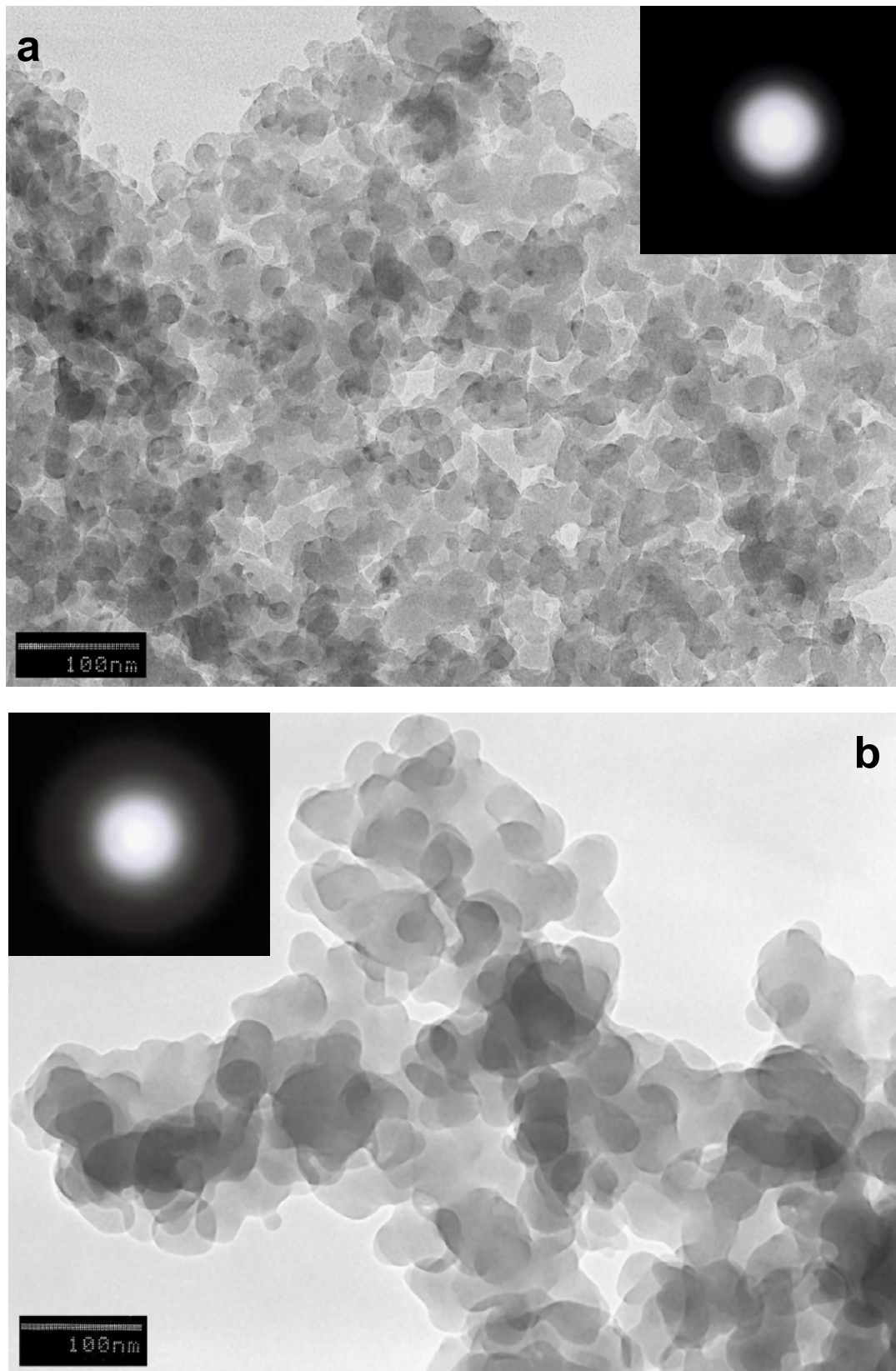
นอกจากซิลิกาแล้ว ในตัวอย่างเก่ายังมีฟีดของสารประกอบอื่นๆ ปะปนอยู่ด้วย จากการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับสเปกตรัมจากฐานข้อมูลตัวอย่าง พบว่า พีคเหล่านี้ตรงกับสารประกอบในกลุ่มฟอสเฟตและแมงกานีต์เป็นหลัก เช่น ในตัวอย่างเก่า TR พบสารประกอบหลายชนิดทั้ง $Mn_3(PO_4)_2$, $K_6Mn_2O_6$ และ Ca_2MnO_4 ส่วนตัวอย่างเก่า LDD1 พบ $Mn_3(PO_4)_2$ เป็นหลัก สารประกอบเหล่านี้ น่าจะเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของธาตุที่มีอยู่ในตัวอย่างระหว่างการเผาไล่อินทรีย์สารในกากฟางที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส สารประกอบฟอสเฟตเหล่านี้ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยมากต้องใช้กรดในการละลาย และด้วยปริมาณของสารประกอบฟอสเฟสและแมงกานีต์ที่พบค่อนข้างสูงนี้ ทำให้ในการเตรียมซิลิกาอสัณฐาน อาจต้องนำกากฟางไปแช่ในสารละลายกรด เช่น HCl เพื่อละลายสารปนเปื้อนเหล่านี้ออกไปเสียก่อน (Liou, 2004) จึงค่อยนำไปเผาไล่อินทรีย์สาร น่าจะช่วยให้ปริมาณของมลทินลดลง และได้ซิลิกาที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้น



ภาพที่ 3.18: XRD Spectra ของถั่วฟางที่ผ่านการเตรียมต่างกันก่อนเผาที่ 500 องศาเซลเซียส; Untreated คือ ถั่วฟางที่เผาโดยไม่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์, TR คือ ถั่วฟางที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* ก่อนเผา และ LDD1 คือ ถั่วฟางที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 ก่อนเผา (สัญลักษณ์แทนเฟสต่างๆ ได้แก่; $\blacklozenge$ $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$; $\diamond$ Ca_2MnO_4 ; $\circ$ $\text{K}_6\text{Mn}_2\text{O}_6$; $\blacktriangledown$ K_2SO_4 ; $\blacksquare$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$; และ $\square$ K_2CO_3)

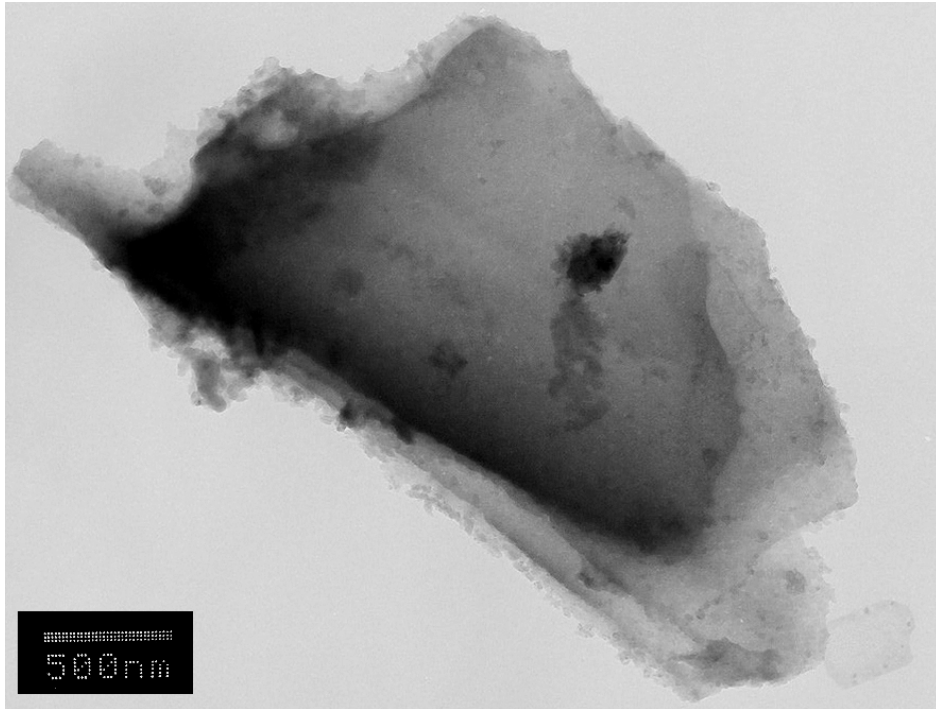
3.6.3 ลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาค

จากการตรวจสอบตัวอย่างถั่วฟางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ถั่วฟางที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์มีลักษณะอนุภาคโดยทั่วไปดังแสดงในภาพที่ 3.19 กล่าวคือ อนุภาคส่วนใหญ่ในตัวอย่างถั่ว TR มีขนาดเล็กกว่า 50 นาโนเมตร (3.19(a)) คือประมาณ 15 – 40 นาโนเมตร และมีโครงสร้างเป็นแบบ ออสัณฐานโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของลำอิเล็กตรอน คาดว่าอนุภาคเหล่านี้จะเป็นอนุภาคของซิลิกาอสัณฐาน นอกจากนี้ ในตัวอย่างถั่ว LD ยังพบอนุภาคที่มีลักษณะคล้ายกันแต่มีขนาดใหญ่กว่า คือมีขนาดประมาณ 50-80 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3.19(b) ซึ่ง จากการวิเคราะห์อนุภาคทั้งในตัวอย่างถั่ว TR และ LD ด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนของลำอิเล็กตรอนพบว่ามีโครงสร้างแบบอสัณฐานเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 3.19 ลักษณะของอนุภาคโดยทั่วไปจากตัวอย่างเก่าฟางที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์และเผาที่ 500 องศาเซลเซียส (a) ตัวอย่างเก่า TR (b) ตัวอย่างเก่า LDD1 จากการตรวจสอบโดยเทคนิคการเลี้ยวเบนของลำอิเล็กตรอน พบว่าทั้งสองมีโครงสร้างเป็นแบบอสัณฐาน (ภาพเล็ก)

ในตัวอย่างเก่า TR ยังพบอนุภาคที่มีลักษณะแตกต่างไปดังแสดงภาพที่ 3.20 อนุภาคดังกล่าวมีรูปร่างเป็นแผ่น มีขนาดใหญ่กว่าชนิดแรกมากและพบอยู่ทั่วไป จากลักษณะรูปร่างและปริมาณที่พบเชื่อกันว่าจะเป็นอินทรีย์สารบางส่วนที่ยังคงเหลือจากการเผาที่ 500 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลให้สีของตัวอย่างเก่า TR ไม่เป็นสีขาว ดังภาพที่ 3.17



ภาพที่ 3.20 อนุภาคลักษณะอื่นที่พบในตัวอย่างเก่า TR คาดว่าเป็นอินทรีย์สารที่เหลือจากการเผา

บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

แนวคิดของการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลายอินทรีย์สารจำพวกลิกโนเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบหลักของแกลบและฟางข้าว เพื่อให้เหลือแต่ส่วนที่เป็นซิลิกาออสฐานซึ่งมีอยู่ประมาณร้อยละ 10-20 โดยน้ำหนักของฟางและแกลบตามลำดับนั้น พบว่ายังมีอุปสรรคหลายประการ ดังนี้

การใช้เอนไซม์เซลลูเลสชนิดสำเร็จรูป ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงและสามารถใช้อย่างเส้นใยเซลลูโลสเช่น กระดาษกรองได้เป็นอย่างดีนั้น กลับให้ผลการย่อยสลายแกลบที่ต่ำมาก แสดงให้เห็นว่า ลำพังการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียวในการย่อยสลายอินทรีย์สารประเภทลิกโนเซลลูโลสในแกลบซึ่งประกอบด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส อยู่รวมกันนั้น ไม่สามารถให้ผลเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ ด้วยราคาของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่สูงมาก ทำให้วิธีการนี้ ไม่มีความเหมาะสมในเชิงพาณิชย์

ฟางเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีการนำใช้ประโยชน์น้อยกว่าแกลบแต่มีปริมาณมากกว่าหลายเท่าตัว จึงนำไปสู่แนวคิดที่ใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายฟาง ทั้งจุลินทรีย์ชนิด *Trichoderma reesei* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และจุลินทรีย์รวม พด.1 ที่กรมพัฒนาที่ดินได้มีการส่งเสริมให้ใช้ในกลุ่มเกษตรกรอยู่แล้วในการผลิตปุ๋ยหมักจากพืช ด้วยวิธีนี้พบว่า เชื้อจุลินทรีย์รวม พด.1 สามารถย่อยสลายฟางได้อย่างมีประสิทธิภาพ น้ำหนักของฟางลดลงสูงสุดถึงร้อยละ 55 ภายหลังจากที่ใช้อย่าง pH 6 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่การใช้เพียงเชื้อรา *T. reesei* เพียงอย่างเดียวให้ผลที่ต่ำกว่า คือ มีผลให้น้ำหนักของฟางลดลงสูงสุดร้อยละ 40 เมื่อทดสอบที่ pH 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

กากฟางที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ยังคงมีอินทรีย์สารเหลืออยู่ไม่น้อย แม้ในตัวอย่างฟางที่ผ่านการย่อยด้วยเชื้อ พด.1 ยังมีอินทรีย์สารเหลือมากกว่าร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก (จากเทคนิคการวิเคราะห์ทางความร้อน) แสดงว่าซิลิกาบางส่วนอาจกลายเป็นสารแขวนลอยขนาดเล็กและสูญเสียไประหว่างกระบวนการกรองแยกกาก ดังนั้น ในอนาคตน่าจะมีการทดลองศึกษาการคัดแยกและรวบรวมอนุภาคซิลิกาที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว เช่น การใช้ตะแกรงที่มีขนาดช่องผ่านเล็กลง หรือ การตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง เพื่อให้ได้ปริมาณซิลิกาที่ถูกต้องมากขึ้น และนำกากที่เหลือไปทำการย่อยสลายซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้มีปริมาณอินทรีย์สารเหลือน้อยที่สุด

กากฟางที่ผ่านการย่อยด้วยจุลินทรีย์รวม พด.1 หลังผ่านการเผาที่ 500 องศาเซลเซียส ได้เข้ามามีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียดและเหลืออินทรีย์สารในระดับต่ำที่สุด แต่ยังคงมีสารประกอบอื่นเช่น แมงกานีสฟอสเฟต ปะปนอยู่ประมาณร้อยละ 26.4 โดยน้ำหนัก ในขณะที่ถ้าซึ่งได้จากฟางที่ย่อยด้วยเชื้อ *T. reesei* ให้ซิลิกาปริมาณสูงกว่า คือร้อยละ 82.5 แต่ก็ยังมีสารอื่นๆ ปะปนอยู่ถึงร้อยละ 17.5 ดังนั้น แนวคิดในการใช้เฉพาะจุลินทรีย์เพื่อเตรียมซิลิกาออสฐานที่มีความบริสุทธิ์สูงจากแกลบหรือฟางนั้น ยังคงจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิธีที่จะขจัดมลทินเหล่านี้ออกไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Amany, L., Essam, S.A. and Zeinat, A.N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*., *Polymer Degradation and Stability* 63(1999) 273-278.
2. Ball A. S., Brabban A. and McCarthy A. J., Studies on the extracellular p-nitrophenyl β -d-cellobiosidase activity of a thermophilic *streptomycete*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(1991) 221-225.
3. Biely P., Microbial xylanolytic systems, *Trends in Biotechnology* 3 (1985) 286-290.
4. Chen, J. M. and Chang, F.W., The chlorination kinetic of rice husk, *Indian Engineering Chemical Research* 30 (1991) 2241-2247.
5. CDC; NIOSH hazard review - health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica, www.cdc.gov, US (1989).
6. Conradt P., Pimkhaokham P., Leela-Adisorn U., Nanostructured silica from rice husk, *Journal of Non-Crystalline Solids* 145(1992) 75-79.
7. Cook D.J., Rice husk ash, in: Swamy R.N.(ed.), Concrete Technology and Design, Cement Replacement Materials, vol.3, Surrey Univ. Press, London (1986) 171-196.
8. Degussa-fp, www.degussa-fp.com, Germany (2002).
9. Department of Agriculture, Renewable biological system for alternative sustainable energy production, FAO Corporate Document Repository, Thailand. (2007).
10. Gorthy P. and Pudukottah M.G., Production of silicon carbide from rice husks, *Journal of the American Ceramic Society* 82(6) 1999.
11. Hamdan H., Muhid M.N.M., Endud S., Listiorini E., and Ramli Z., *Journal of Non-Crystalline Solids*, 211(1997) 126-131.
12. Haruta S., Cui Z., Huang Z., Li M., Ishii M., and Igarashi Y., Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability, *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 59:529-534.
13. Jitcharoen J., Charealpong P., Saithanu W., Muen-apai S., Loihar, Y., Reongmariung W., Preparation of amorphous silica from rice husks at low temperature by chemical and biological treatment, *Extended abstracts from 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok (2001).
14. Kalapathy U., Proctor A. and Shultz J., A simple method for production of pure silica from rice hull ash, *Bioresour Technology* 73(2000) 257-262.
15. Kalapathy U., Proctor A. and Shultz J., An improved method for production of silica from rice hull ash, *Bioresour Technology* 85 (2002) 285-289.

16. Kaur P. P., Arneja J. S., and Singh J., Enzymatic hydrolysis of rice straw by crude cellulase from *Trichoderma reesei* , *Bioresource Technology* 66 (1998) 267-269.
17. Knowles J., Lehtovaara P. and Teeri T., Cellulase gene and their families, *TIBTECH* 5 (1987) 255-61.
18. Krishnarao R.V., Mahajan Y. R. and Kumar T. J., Conversion of raw rice husks to SiC by pyrolysis in nitrogen atmosphere, *J. of the European Ceramic Society* 18(1998) 147-152.
19. Krishnarao R.V., Subrahmanyam J., Jagadish Kumar T., Studies on the formation of black particles in rice husk silica ash, *Journal of the European Ceramic Society* 21(2001) 99-104.
20. Lanning F.C., Silicon in rice, *J. Agric. Food Chem.* 11(5) (1963) 435-437.
21. Li Y. L., Li D. C., Teng F. C., Purification and characterization of a cellobiohydrolase from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum* CT2, *Extremophlie* 1 (2006) 143-146.
22. Liou T. H., Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk, *Materials Science and Engineering A* 364(2004) 313-323.
23. Mansaray K.G. and Ghaly A.E., Thermal degradation of rice husks in nitrogen atmosphere, *Bioresource Technology* 65 (1998) 13-20.
24. Mansaray K.G. and Ghaly A.E., *Biomass and Bioenergy* 17 (1999) 19-31.
25. Miller G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry* 31 (1959) 426-428.
26. Mizuno Y., Kawase M., and Matsuo T., United State Patent no. 6,378,584: www.uspto.com, US (2002).
27. Muthuvelayudham R. and Viruthagiri T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw, *African Journal of Biotechnology* 5 (2006) 1873 -1881.
28. National Energy Policy Office; NEPO, www.nepo.go.th, Thailand (2002).
29. Okeke, B. C. and Obi, S. K. C. Saccharification of Agro-Waste Materials by Fungal Cellulases and Hemicellulases. *Bioresource Technology* 51(1995) 23-27.
30. Padhi B.K. and Patnaik C., Development of Si₂N₂O, Si₃N₄ and SiC ceramic materials using rice husk, *Ceramics International* 21(1995) 213-220.
31. Prasad C.S., Maiti KN and Venugopal R., Effect of rice husk ash in whiteware compositions, *Ceramics International* 27 (2001) 629-635.

32. Rahman I.A., The formation of different Si_3N_4 phases in the presence of V_2O_5 during carbothermal reduction of untreated and acid treated rice husk, *Ceramics International* 24(1998) 293-297.
33. Real C., Alcalá M.D., and Criado J.M., Precipitation of silica from rice husks, *Journal of the American Ceramic Society* 79(1996) 2012-2016.
34. Real C., Alcalá M.D., Muñoz-Páez A., and Criado J.M., XAFS analysis of the potassium-silica interaction in rice husk, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 133(1997) 68-72.
35. Sangkuamsawang P., Rujkornkan R., and Swatsitang E., Preparation of SiC whisker from raw rice husk, *Extended abstracts from 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok (2001).
36. Suwanprateep J., Hatthapanit K., Rice-husk-ash-based silica as a filler for embedding composites in electronic devices, *J. Appl. Polym. Sci.* 86:12 (2002) 3013-3020.
37. Payá J., Monzó J., Borachero M.V., Mellado A. and Ordoñez, Determination of amorphous silica in rice husk ash by a rapid analytical method, *Cement and Concrete Research* 31(2001) 227-231.
38. Tomme P., Warren R.A.J. and Gilkes N.R., Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, *Advances in Microbial Physiology* 37(1995) 1-81.
39. Wang J., Wang J. and Gulfranz M., Efficient Cellulase Production from Corn Straw by *Trichoderma reesei* LW1 through Solid State Fermentation Process, College of Food Science Agriculture, University of Hebei, China (2005).
40. Watanabe A., Katoh K., Kimura M., Effect of rice straw application on CH_4 emission from paddy fields II - contribution of organic constituents in rice straw, *Soil Sci Plant Nutr*, 39 (1993) 707-712.
41. Williams P.T., and Besler S., The influence of temperature and heating rate on the slow pyrolysis of biomass, *Renewable Energy* 7:3(1996)233-250.
42. Ximenes E.A., Felix C.R., and Ulhoa C.J., Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and Characterization of one β -glucosidase, *Current Microbiology* 32 (1996) 119-123.
43. Yalçın N. and Sevinç V., Studies on silica obtained from rice husk, *Ceramics International* 27(2001) 219-224.
44. กลุ่มวิจัยและพัฒนาอินทรีย์วัตถุเพื่อการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน, เอกสารเผยแพร่เรื่องสารเร่งประเภทจุลินทรีย์ พด.1, กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2548).

45. วิไล สันติโสภาศรี กล้าณรงค์ ศรีรอด เอ็จ สโรบล และ สุนิรัตน์ หทัยรักษธรรม, สถานภาพของวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรและการใช้ประโยชน์, เอกสารการสัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านพลังงานทดแทน, สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (2544) 51-66.

ภาคผนวก 1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

■ การเตรียม potato dextrose agar (PDA) per liter

ส่วนผสม	200.0	g	Potato, infusion form
	20.0	g	Dextrose
	15.0	g	Agar

ต้มส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น และปรับให้ปริมาตรของของเหลวให้เป็น 1 ลิตร

■ การเตรียม Basal media per liter

ส่วนผสม	1.4	g	Ammonium sulfate (NH_4) ₂ SO ₄
	2.0	g	Di-potassium hydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)
	0.3	g	Urea
	0.3	g	Calcium chloride (CaCl ₂)
	0.6	g	Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)
	0.009	g	Ferrous Sulphate heptahydrate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)
	1.4	g	Manganese Sulphate (MnSO ₄)
	0.0014	g	Zinc Sulphate heptahydrate (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)
	0.75	g	Peptone

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บในตู้เย็น

ภาคผนวก 2

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- การเตรียม DNS reagent

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่	sodium hydroxide	7.0	g
	3,5 dinitrosalicylic acid	3.74	g
	sodium potassium tartrate	108.05	g
	sodium metabisulfite	2.93	g
	deionized water	500	ml

ละลาย sodium hydroxide ด้วยน้ำ 400 ml ในบีกเกอร์ จากนั้น เติม 3,5 dinitrosalicylic acid ลงไปแล้วคนจนละลายหมด เติม sodium potassium tartrate และ sodium metabisulfite คนจนละลายหมด รินสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตร แล้วเติมน้ำให้เป็น 500 ml

- การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมซิเตรท

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่	citric acid monohydrate	105	g
	sodium hydroxide	30	g
	deionized water	500	ml

สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 1 M เตรียมโดยละลาย citric acid monohydrate ในบีกเกอร์ด้วยน้ำประมาณ 400 ml จนละลายหมด แล้วเติม sodium hydroxide คนจนกระทั่งละลายหมด รินสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำจนมีปริมาตรเป็น 500 ml ปรับ pH ด้วยการเติม sodium hydroxide จนกระทั่งได้ pH 4.5

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลสในการวิจัยครั้งนี้ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมซิเตรท ที่เจือจางให้เหลือความเข้มข้นเพียง 0.05 M และมี pH 4.8 ซึ่งเตรียมโดยการตวงสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมซิเตรท ความเข้มข้น 1 M ปริมาณ 5 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml แล้วเจือจางด้วยน้ำให้มีปริมาตรเป็น 100 ml ทำการวัด pH หากไม่ได้ pH เป็น 4.8 ให้ปรับด้วยการเติม sodium hydroxide

- การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐานและการสร้างกราฟเทียบความเข้มข้น

เตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน เริ่มต้นโดยการละลาย anhydrous glucose ด้วยน้ำประมาณ 400 ml ในปิกเกอร์ รินสารละลายที่ได้ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml เติมน้ำจนมีปริมาตรเป็น 500 ml สารละลายน้ำตาลที่ได้มีความเข้มข้นเป็น 1.0 mg/ml

สำหรับการสร้างกราฟสอบเทียบค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ให้ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้มีความเข้มข้นเป็น 1.0 mg/ml เติมลงในหลอดทดลองขนาด 10 ml ในปริมาณหลอดละ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ml ตามลำดับ เจือจางโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมซิทเรท ความเข้มข้น 0.05 M จนมีปริมาตรเป็น 2.0 ml ทุกหลอดทดลอง สำหรับชุดทดลองซึ่งไม่เติมสารละลายน้ำตาล ("blank" ความเข้มข้น 0.0 mg/ml) ให้ใส่เฉพาะสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น 2.0 ml

- การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการย่อย

จุ่มหลอดทดลองที่มีสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ พร้อมกันกับหลอดทดลองที่มีเอนไซม์และตัวถูกย่อย ลงในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิไว้ตามที่ต้องการ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เช่น 1 ชั่วโมง เติม DNS reagent ปริมาณ 2.0 ml เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ จากนั้น ย้ายหลอดทดลองทั้งหมดไปจุ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำออกมาจุ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายที่เป็นส่วนใสจากในหลอดทดลอง มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสารละลายตัวอย่าง นำมาเทียบเป็นค่าความเข้มข้นของน้ำตาลในหลอดทดลองการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้กราฟการดูดกลืนแสงของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม ที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - Suthee Wattanasiriwech, Darunee Wattanasiriwech, Jisnuson Swasti, 2009. Preparation of amorphous silica nanoparticles from rice straw with microbial hydrolysis pretreatment. Waste Management xx, xxx-xxx. (ตาม manuscript แนบท้าย)
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - Senior projects นักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ระดับปริญญาตรี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ม. แม่ฟ้าหลวง จำนวน 3 คน 2 หัวข้อเรื่อง

Preparation of amorphous silica nanoparticles from rice straw with microbial hydrolysis pretreatment

Suthee Wattanasiriwech^{a,*}, Darunee Wattanasiriwech^a, Jisnuson Svasti^b

^a*School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand.*

^b*Protein Research Center, Mahidol University, Bangkok 10110, Thailand.*

Abstract

An enzymatic hydrolysis approach was used in order to develop a milder process for preparation of amorphous silica from rice straw. Rice straw was firstly hydrolyzed either with a microbial isolate (*T. reesei*) or a microbial community (LDD1), followed by a heat treatment at 500°C for 8 h. After hydrolysis, the rice straw was decomposed by *T. reesei* and by LDD1 to 60% and 45% of the initial weight, of which 12% and 23% ash content was determined by thermogravimetric analysis (TGA), respectively. X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) analysis confirmed that the major constituent in the ash was amorphous silica with the particle size range between 50-80 nm. Silica content in the *T. reesei* pretreated ash was 82.5%, while that in the LDD1 pretreated ash was 73.6%. High content of impurities such as manganese and phosphate associated with microbial activities were detected in both pretreated ash samples.

Keywords: Amorphous silica, rice straw, enzymatic hydrolysis.

1. Introduction

In Thailand, over 33 million tons of rice straw is generated annually as a by-product of rice production. Around 8.5-14.4 million tons are disposed off by burning in the field during the dry season, which partly contributes to severe air pollution problems (Suramaythangkoo and Gheewala, 2008). The main constituents of rice straw are cellulose (44%), hemicellulose (26%), and lignin (12%) – amounting to approximately 82% of the total mass (Sangnark and Noomhorm, 2004). The inorganic constituent contributes approximately 11-12% by weight of rice straw and is rich in silica (Agbagla-Dohnani et al., 2001). This highly active silica has many industrial uses and various

* Author for correspondence: [email:suthee@mfu.ac.th](mailto:suthee@mfu.ac.th); Tel/Fax: 6653-916263/6652-916776

extraction methods have been reported. Burning in open air is the most simple process, but desirable properties of silica such as high surface area and amorphous characteristics may not be preserved (Della et al., 2002). Over-firing of amorphous silica at 700°C or above may transform it to crystalline silica such as cristobalite or tridymite (Hamdan et al., 1997). The presence of these crystalline phases may not only reduce the reactivity of silica in the synthesis of downstream industrial products such as zeolites, but after a period of accumulation in lung tissue through the respiratory system, may also cause a disease known as silicosis (DHHS, 2002).

Alternatively, high purity nano-silica could be produced from rice straw ash by chemical extraction methods (Kalapathy et al., 2000 & 2002; Zaky et al., 2008). This involved dissolution of silica at 100°C in NaOH solution followed by precipitation using acid solutions. Apart from the difficulty of handling corrosive solutions, complete elimination of the by-products such as Na₂SO₄ or NaCl trapped inside nanopores of silica, by sequential washing and drying steps could be tedious.

Cellulase enzymes secreted from some strains of lignocellulosic microorganisms can effectively digest or shorten long chain of cellulose to water-soluble oligo-, di-, or monosaccharides. After enzymatic hydrolysis, rice straw can be utilized as nutrient-rich animal feed, as natural fertilizer, or further converted to biofuel by fermentation (Malherby & Cloete, 2002). For the last two decades, much research has focused on constructing superior lignocellulosic microorganisms, developing more effective substrate pretreatment methods, or improving hydrolytic activity of the enzymes to achieve the highest yield of sugars from lignocellulosic materials (Sun and Cheng, 2002). Among the recent findings, Abdulla and El-Shatoury (2007) reported that *Micromonospora*, and *Streptomyces*, two isolated cellulolytic actinomycetes, decomposed up to 60% by weight of rice straw after 8-12 weeks of incubation. Zhang et.al. (2008) reported that *Trichoderma reesei* ZM4-F3, a mutated cellulolytic fungus, could decompose 68.2% of rice straw after 5 days but the rice straw must be pretreated by soaking in an alkaline solution at 85°C before the hydrolysis. Despite the use of single strain, Haruta et al. (2002) constructed a highly effective microbial community from fermented composting materials. The microbial community consisted of both aerobic and anaerobic bacteria that were capable of degrading more than 60% of untreated rice straw in 4 days. With such a high degree of saccharification being achieved, the residual substrate should contain a large proportion of amorphous silica. Thus, collecting the solid residue from hydrolysis of

rice straw should be an alternative approach for producing amorphous silica. However, little attention has been paid to assess such possibility.

In the present study, on-site enzymatic hydrolysis of rice straw was carried out using either a microbial isolate (*Trichoderma reesei* TISTR 3080) or a microbial community (LDD1), which was reported to be highly capable of decomposing biomass (Sun and Cheng, 2002; LDD, 2008). The residual substrate from hydrolysis process was collected and characterized prior to heat treatment to remove remaining organic matter. The use of corrosive chemicals or excessive heat treatment was avoided throughout this study. After pyrolysis, ash samples were studied in terms of silica content and structure. Finally, the feasibility and economic viability of this approach for the production of amorphous silica is discussed.

2. Materials and methods

2.1 Rice straw

Rice (*Oryza sativa Indica*) straw used in this study was obtained from Chiang Rai, Thailand. Only the part of the straw approximately between 20cm and 50cm above the ground was taken. It was cut to 2-3 cm length then thoroughly washed 3-4 times with tapped water prior to placing in an electric oven at 60°C until dry, and storing in a sealed plastic bag at room temperature.

2.2 Microorganisms

Trichoderma reesei TISTR 3080 was obtained from the culture collection of Microbial Center, Thailand Institute of Science and Technology Research (TISTR), Bangkok, Thailand. Spores of *T. reesei* TISTR 3080 (TR) were inoculated in potato dextrose broth at 37°C for 24 h and kept as TR stock culture. Microbial community LDD1 was obtained from Chiang Rai regional centre of the Land Development Department, The Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. It consisted of effective cellulolytic microorganisms including bacterias, actinomycetes, and fungi that were capable of decomposing solid agricultural waste into fertilizer (LDD, 2008). LDD1 stock culture was prepared by dispersing 10% w/v of LDD1 powder in deionized water. The suspension (0.1 ml) was inoculated in a 50 ml trypticase soy broth at 37°C for 24 h.

2.3 Hydrolysis of rice straw

A 5.0-g rice straw sample was added to 350 ml basal media ((NH₄)₂SO₄ 1.4 g; KH₂PO₄ 2.0 g; urea 0.3 g; CaCl₂ 0.3 g; MgSO₄·7H₂O 0.6 g; FeSO₄·7H₂O 0.009 g; MnSO₄ 1.4 g; ZnSO₄·7H₂O 0.0014 g; peptone 0.75 g; distilled water 1000 ml) in a 1000 ml flask and sterilized at 121°C for 15 min. Each hydrolysis system was adjusted to an optimal condition obtained from preliminary study, i.e. initial pH 5 at 37°C for *T. reesei*, and initial pH 6 at 40°C for LDD. Then a 5-ml stock culture was added to the system and incubated on a rotary shaker operated at 150 rpm. After 72 h, the supernatant was taken and the amount of reducing sugar produced was determined using DNS method described by Ghose (1987). Glucose standard solutions with the concentration of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 mg/ml were used for construction of the calibration curves. To determine the weight loss, the residual solid substrate was separated using a 60 mesh nylon sieve, then washed with water and dried in an electric oven at 105°C until the weight was constant.

2.4 Substrate residue analysis

Microstructure of rice straw before and after 72-h hydrolysis was observed using an SEM (LEO 1450 VP). The samples were cut to 3-5 mm long, placed on a sticky carbon tape, and gold coated with AC gold sputtering prior to observation. Thermal analysis of the residues having an equal weight (4.4 mg) was conducted in an O₂ atmosphere using a TGA/SDTA 851^e STAR thermobalance (Mettler Toledo, Switzerland) with a constant heating rate of 20°C/min.

2.5 Characterization of rice straw ash (RSA)

To prepare a rice straw ash (RSA) sample, the rice straw residue was placed in a porcelain crucible and burnt in an electric furnace at the temperature of 500°C for 8 h with a constant heating rate of 2°C/min. After cooling down, the RSA sample was immediately placed in an air-tight desiccator. Chemical content of the RSA samples were determined using an energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer (Horiba, Japan) while phase analysis was performed using X-ray powder diffractometer and the software X'pert High Score Plus (X'pert Pro MPD, Philips, Netherlands). Approximated particle size and crystallinity of RSA samples were verified using a TEM (JEOL JEM-2010, Japan).

3. Results and Discussion

3.1 Hydrolysis of rice straw

Initially, the exterior surface of rice straw was a dense layer of amorphous silica with the thickness between 5-10 μm , while the interior part contained lignocellulosic layers of collapsed plant cell walls (Fig. 1). After 72 h of hydrolysis by the LDD1 mixed culture, the amorphous silica layer was apparently unaffected by the microbial attack, while the interior part was significantly “delaminated” (Fig. 2). Microstructural change of interior surface of rice straw before and after hydrolysis by LDD1 culture is displayed in Fig. 3.

Decomposition of lignocellulosic materials occurred by at least two mechanisms, namely fragmentation and saccharification (Saqib and Whitney, 2006). Fragmentation results from enzymatic attack on amorphous regions (e.g. lignin) that bind the other crystalline components of the lignocellulosic material together. The LDD1 could decompose as much as 55% of rice straw within 72 h, with only 1.26 g/l of reducing sugar present (Table 1). However, this amount of reducing sugar is relatively low compared to the significant decrease in the substrate weight. Vlasenko et al. (1996) reported that a 48-h hydrolysis of pretreated rice straw with a commercial cellulase enzyme resulted in 30% weight loss of the substrate with 33 g/l of reducing sugar produced. From the microstructure observation of the LDD1 treated rice straw residue, some members of the LDD1 microbial community appeared to be highly capable of disintegrating the interior layers of rice straw including the top layer, allowing the complex porous structure underneath, with a larger surface area to be further hydrolyzed by other members. However, the low amount of the reducing sugar measured may result from utilization of sugars by the actively growing microorganisms.

Microstructural change due to aggressive enzymatic degradation was not observed in the residual rice straw samples from the *T. reesei* culture, which showed only 40% weight loss, with 0.50 g/l of reducing sugar observed. Cellulase enzymes produced by *T. reesei* may be relatively effective in saccharification, but less capable in fragmentation of the lignocellulosic material. To enhance the cellulolytic degradation ability of *T. reesei*, pretreatment e.g. mechanical or chemical process was required (Jin et al., 2006; Zhang et al., 2008).

3.2 Thermal analysis

Thermal analysis results of untreated and residual rice straw samples are shown in Fig. 4. Ash content in the untreated rice straw was only 10% while those in the LDD1 and

TR pretreated rice straw residues were increased to 23% and 12%, respectively. These values indicated a higher degree of bio-degradation in rice straw samples especially by the LDD1 culture, and were in good agreement with the hydrolysis results.

Moisture content in the dried residues was around 2-3% and was completely lost at around 100°C. The major weight loss was first observed around 185°C in the untreated rice straw, which may be due to the decomposition of volatile matters such as low molecular weight water-soluble sugars or salts. Following this, a substantial weight loss by approximately 50% occurred with every sample occurred from 245°C to 340°C. This was likely to be associated with decomposition of hemicellulose (H) and cellulose (C) (Mansaray, 1999; Xiao et al., 2001), the overlapping peaks of which may be better resolved in the differential thermogram (DTG) as shown in Fig. 5. The sharp peak of cellulose decomposition in the LDD treated sample could be due to its higher surface area resulting from effective fragmentation by LDD1.

Another important change due to the decomposition of lignin occurred between 350°C and 480°C, resulting in a 20-30% decrease of the initial weight. Two well resolved peaks (L_1 and L_2) were observed in the DTG plot, suggesting that it was likely that two components decomposed within this temperature range. Among all the samples, the relative height ratio of lignin decomposition peak to the cellulose decomposition peak (L/C ratio) in the LDD1 treated sample was smallest, corresponding to the least amount of lignin component in the residue. This result thus shows that LDD1 microbial community was more capable of degrading lignin components than *T. reesei* single strain. The relatively small L_1 and L_2 peaks from the untreated rice straw could be due to incomplete pyrolysis as discussed below.

3.3 Characterization of ash

The rice straw residues from the microbial hydrolysis pretreatment and the untreated rice straw were burnt along in an electrical furnace at 500°C for 8 h. The ash samples are shown in Fig. 6, and the results of chemical analysis result using the XRF technique are given in Table 2. The untreated rice straw ash gave crispy feeling when touched with fingers which could result from formation of potassium silicate glass as described by Kalapathy et al. (2002). This potassium silicate glass could melt at very low temperature and prevent further pyrolysis of the carbonaceous matter, resulting in the presence of dark carbon particles in the untreated rice straw ash. From Table 2, the silica

content of the untreated rice straw ash was 72.6%. It should be noted that the chemical analysis result did not include carbon content, so the actual silica content in this ash sample was somewhat lower than the reported value.

On the other hand, the LDD1 and TR pretreated ash samples were apparently soft to the finger, even though their colors were different. The off-white color in the TR pretreated ash samples could result from residual carbon compounds that require a higher temperature or a longer time for complete burning. The highest silica content of 82.5% was found in the TR treated samples. Apparently, less carbon residue and higher silica content were expected in the LDD1 treated ash sample, but only 73.6% silica was detected. This was due to high impurity content consisting mainly of manganese and phosphorus compounds.

Under the TEM observation, the estimated particle size of amorphous silica in the TR treated ash sample was less than 50 nm, while that in the LDD1 treated ash was between 50 and 80 nm, as displayed in Fig. 7. The diffused ring in the selected area electron diffraction pattern (SADP) mode revealed that these silica nano-particles were in amorphous form. XRD analysis of the ash samples confirmed that this silica was in amorphous form, as shown in Fig. 8. A broad peak covering diffraction angle of 17° – 28° two theta observed in every ash sample was characteristic of amorphous silica. The broader silica peak observed in the untreated ash sample could be associated with the formation of glass. Manganese and phosphorus, the major impurities in the LDD1 treated ash, were also observed in the TR treated ash sample but at lower level. Manganese phosphate ($\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$) was found in the LDD1 treated ash, with a trace of calcium manganite (Ca_2MnO_4). These compounds were also found in the TR treated ash sample, together with the presence of potassium manganese oxide ($\text{K}_6\text{Mn}_2\text{O}_6$).

Another question raised here was why the pretreated rice straw ash samples contained a significant amount of manganese and phosphorus? Since only a small amount of manganese and phosphorus was found in the untreated rice straw sample, the source of manganese and phosphorus was likely from the basal media. Phosphate was an important nutrient for many microorganisms including fungi (Gadd, 1999). Many lignocellulosic fungi were capable of degrading lignin by producing an enzyme called manganese peroxidase (MnP) that could depolymerize lignin and convert it into water soluble products (Dorado et.al., 1999). Therefore, manganese and phosphate from the basal media

may be used by microorganisms during growth, and become concentrated in the rice straw residues as a result of such microbial activities.

Potassium was the major impurity found in the untreated sample. Apart from potassium sulfate, a trace of potassium oxalate ($K_2C_2O_4$) and potassium carbonate (K_2CO_3) were detected by the XRD analysis of the untreated ash sample. This evidence suggested the presence of potassium oxalate monohydrate, a soluble salt found in the interior part of rice straw, as reported by Inglesby et. al (2005). This potassium compound may dissolve away after soaking in the basal media solution for several hours, leaving only a small amount of potassium in the pretreated rice straw ash.

4. Conclusion

Amorphous silica with the particle size range between 50-80 nm has been prepared from rice straw residue with on-site microbial hydrolysis pretreatment using a microbial isolate (*T. reesei*) or a microbial community (LDD1), followed by a heat treatment at 500°C for 8 h. The residual weight and the microstructural change of the substrate indicated that LDD1 could decompose rice straw more effectively than *T. reesei*. Since the LDD1 pretreated residue contained less amount of lignin, it was believed that the LDD1 microbial community was highly capable of hydrolyzing lignin components, causing greater disintegration of the lignocellulosic structure. After the rice straw residues were heat treated at 500°C, the ash content in the LDD1 pretreated residue was also found to be significantly higher by almost two-fold. However, not only silica was present in the LDD1 and *T. reesei* pretreated ash samples, but impurities e.g. manganese and phosphate compounds associated with microbial activities were also detected. To improve the silica yield, further investigation on washing the decomposed rice straw residues is required.

5. Acknowledgement

The authors thank Associate Prof. T. Chairuangsi for his help on the TEM operation, and N. Kor and P. Baophong for microbial preparation and biochemical analysis. This work is supported by the Thailand Research Fund, contract number MRG4680131.

6. References:

- Abdulla, H.M., El-Shatoury, S.A., 2007. Actinomycetes in Rice Straw Decomposition. *Waste Management* 27, 850-853.
- Agbagla-Dohnani, A., Nozière, P., Clément, G., Doreau, M., 2001. In Sacco Degradability, Chemical and Morphological Composition of 15 Varieties of European Rice Straw. *Animal Feed Science and Technology* 94, 15-27.
- DHHS, 2002. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica. DHHS (NIOSH) Publication No. 2002-129.
- Della, V.P., Kühn, I., Hotza, D., 2002. Rice Husk Ash as An Alternate Source for Active Silica Production. *Materials Letters* 57(4), 818-821.
- Dorado, J., Almesdros, G., Camarero, S., Martinez, A.T., Vares, T., Hatakka, A., 1999. Transformation of Wheat Straw in The Course of Solid-State Fermentation by Four Ligninolytic Basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 605-612.
- Gadd, G. M., 1999. Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. *Advances in Microbial Physiology* 41, 47-92.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry* 59(2) 257-268.
- Hamdan, H., Muhid, M.N.M., Endud, S., Listiorini, E., Ramli, Z., 1997. ²⁹Si MAS NMR, XRD and FESEM Studies of Rice Husk Silica for The Synthesis of Zeolites. *Journal of Non-Crystalline Solids* 211(1-2) 126-131.
- Haruta, S., Cui, Z., Huang, Z., Li, M., Ishii, M., Igarashi, Y. 2002. Construction of A Microbial Community with High Cellulose-Degradation Ability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 529-534.
- Inglesby, M.K., Gray, G.M., Wood, D.F., Gregorski, K.S., Robertson, R.G. Sabellano, G.P., 2005. Surface Characterization of Untreated and Solvent Extracted Rice Straw. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43, 83-94.

- Jin, S., Chen, H., 2006. Superfine Grinding of Steam-Exploded Rice Straw and Its Enzymatic Hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 30, 225-230.
- Kalapathy, U., Proctor, A., Shultz, J., 2000. A Simple Method for Production of Pure Silica from Rice Hull Ash. *Bioresource Technology* 73, 257-262.
- Kalapathy, U., Proctor, A., Shultz J., 2002. An Improved Method for Production of Silica from Rice Hull Ash, *Bioresource Technology* 85, 285-289.
- LDD, 2008. Land Development Department, Microbial Activators LDD1, LDD2, and LDD3 for The Enrichment of Soil Nutrients. Available Online <<http://e-library.ddd.go.th/library/Ebook/bib32.pdf>>.
- Malherbe, S., Cloete, T.E., 2002. Lignocellulose Biodegradation: Fundamentals and Applications. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* 1, 105-114.
- Mansaray, K.G., Ghaly, A.E., 1999. Determination of Kinetic Parameters of Rice Husks in Oxygen Using Thermogravimetric Analysis. *Biomass and Bioenergy* 17(1), 19-31.
- Sangnark, A., Noomhorm, A., 2004. Chemical, Physical and Baking Properties of Dietary Fiber Prepared from Rice Straw. *Food Research International* 37, 66-74.
- Saqib, A.A.N., Whitney, P.J., 2006. Role of Fragmentation Activity in Cellulose Hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58, 180-185.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology* 83, 1-11.
- Suramaythangkoor, T., Gheewala, S.H., 2008. Potential of Practical Implementation of Rice Straw - Based Power Generation in Thailand. *Energy Policy* 36, 3193-3197.
- Vlasenko, E.Yu., Ding, H., Labavitch, J.M., Shoemaker, S.P., 1996. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Rice Straw. *Bioresource Technology* 59, 109-119.
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R.C., 2001. Chemical, Structural, and Thermal Characterizations of Alkali-Soluble Lignins and Hemicelluloses, and Cellulose from Maize Stems, Rye Straw, and Rice Straw. *Polymer Degradation and Stability* 74, 307-319.

- Zaky, R.R., Hessien, M.M., El-Midany, A.A., Khedr, M.H., Abdel-Aal, E.A., El-Barawy, K.A., 2008. Preparation of Silica Nanoparticles from Semi-Burned Rice Straw Ash. *Powder Technology* 185, 31-35.
- Zhang, Q.Z., Cai, W.M., 2008. Enzymatic Hydrolysis of Alkali-Pretreated Rice Straw by *Trichoderma reesei* XM4-F3. *Biomass and Bioenergy* 32, 1130-1135.

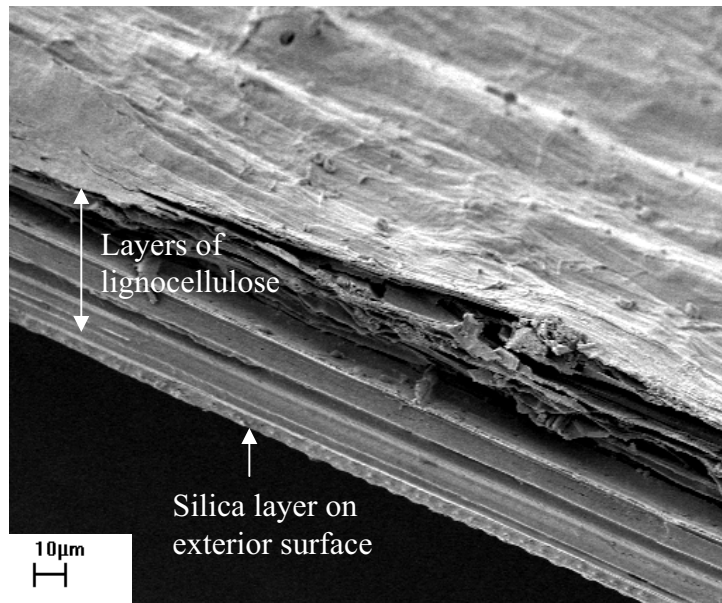


Fig. 1: SEM micrograph on cross-sectional view of rice straw showing initial microstructure before hydrolysis.

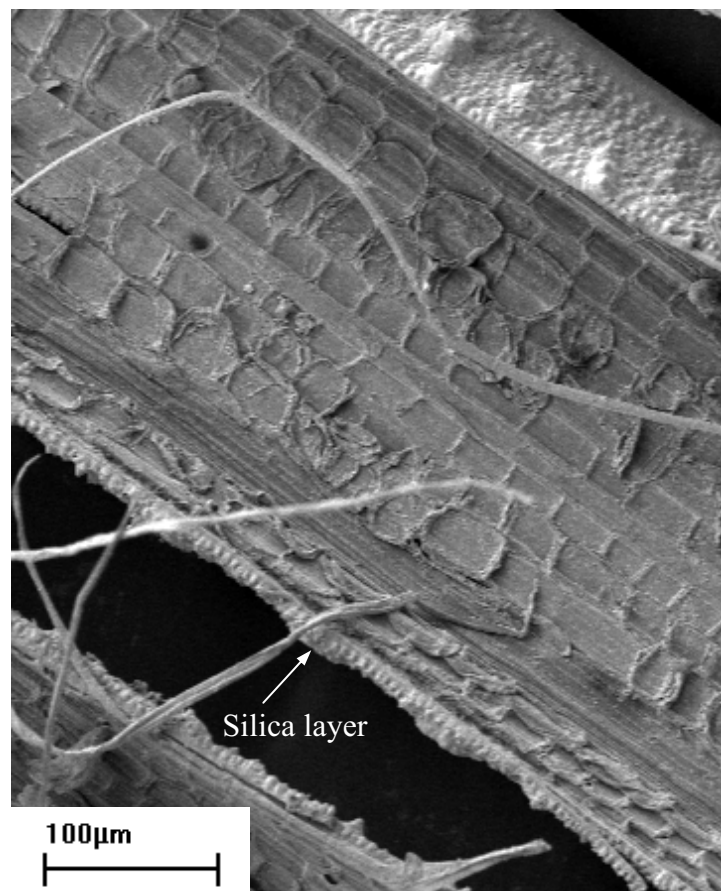


Fig. 2: SEM micrograph of degraded rice straw after 72 h of LDD1 hydrolysis.

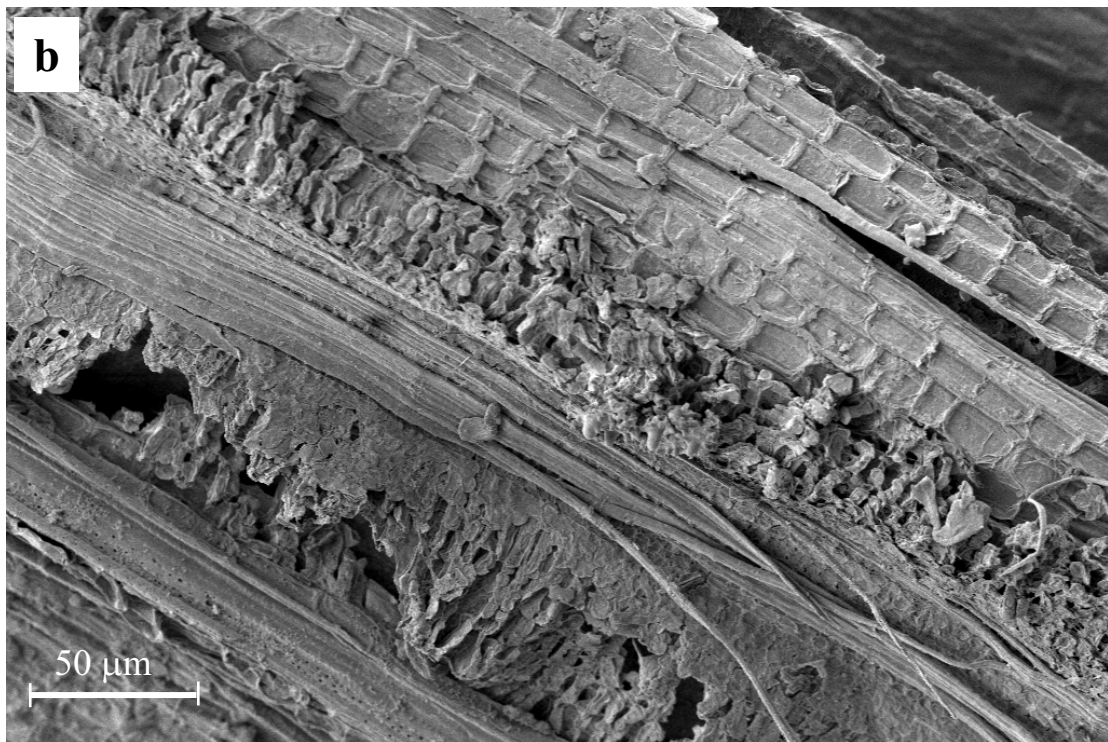
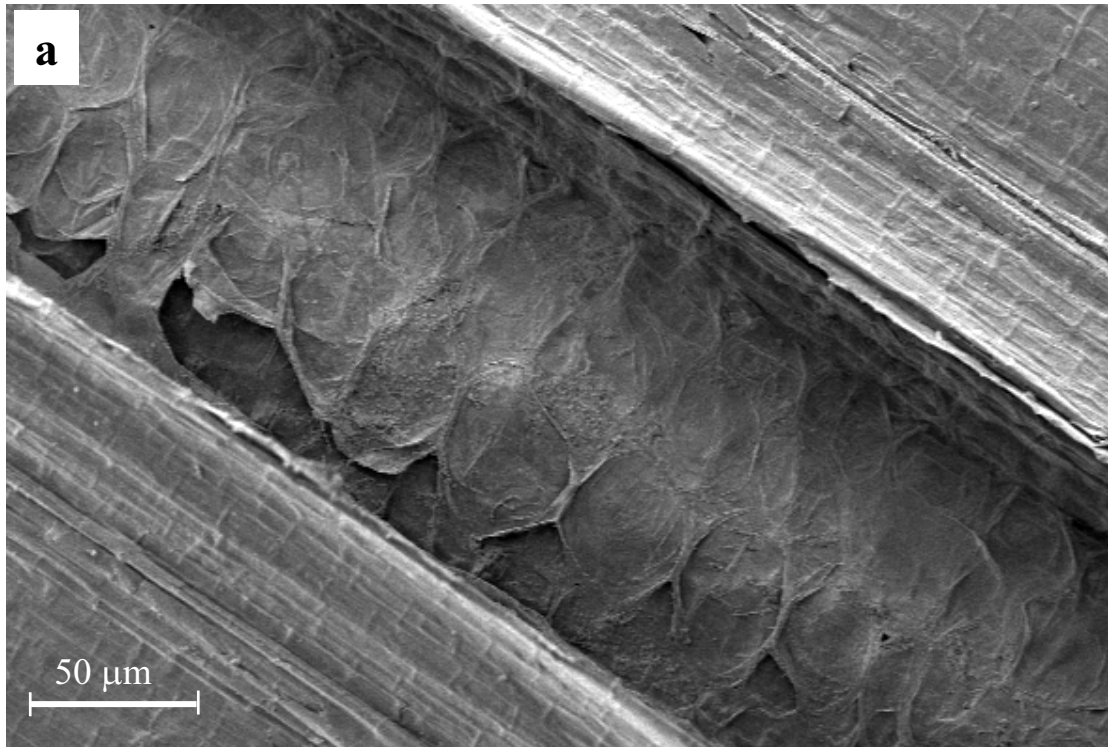


Fig. 3: SEM micrographs showing interior surface of rice straw (a) before (b) after LDD1 hydrolysis for 72 h.

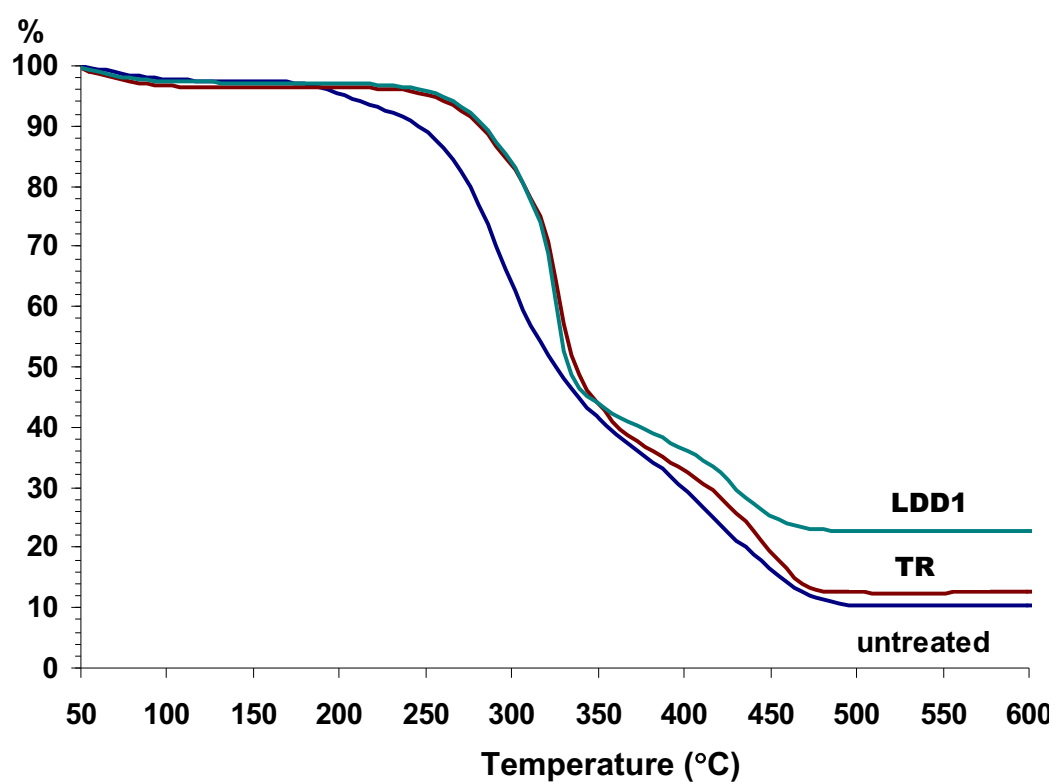


Fig. 4: TGA curves of untreated and hydrolyzed rice straw samples. (TR: rice straw hydrolyzed by *Trichoderma reesei* TISTR 3080; LDD1: rice straw hydrolyzed by LDD1 microbial community).

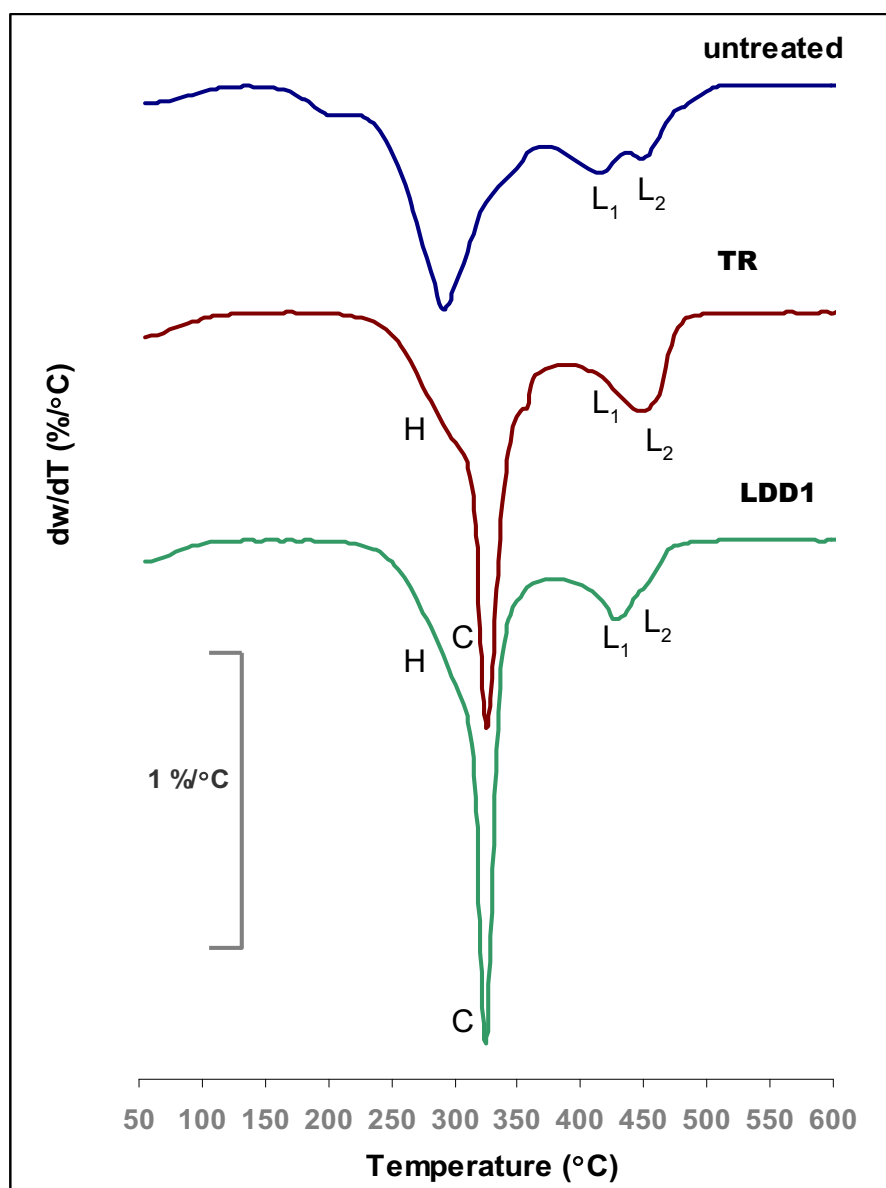


Fig. 5: DTG curves of untreated and hydrolyzed rice straw samples. (H: hemicelluloses; C: cellulose; L₁ and L₂: lignin).

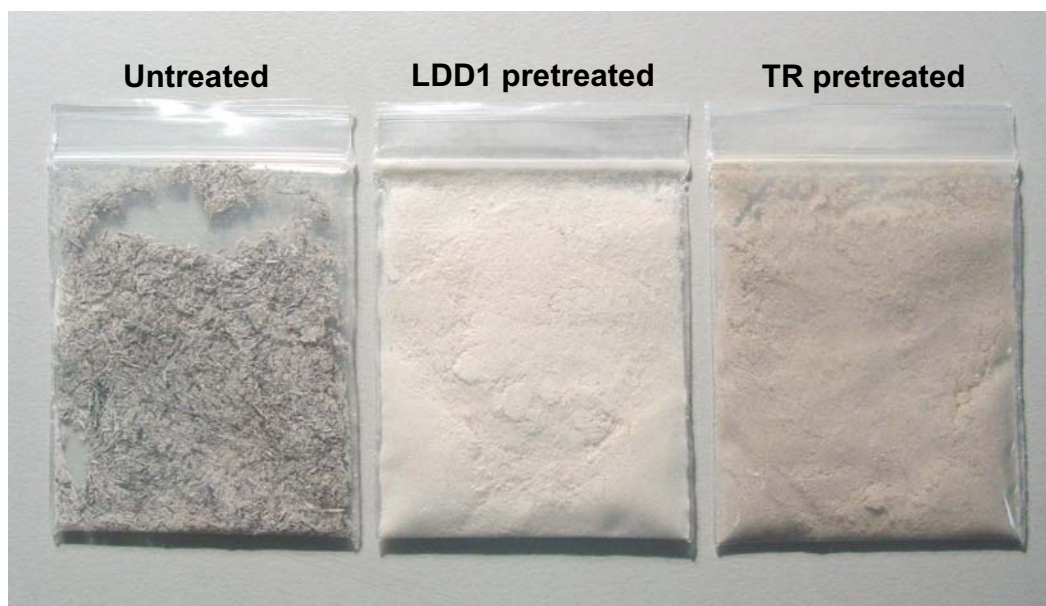


Fig. 6: Ashes from untreated and rice straw residues burned at 500°C for 8 h.

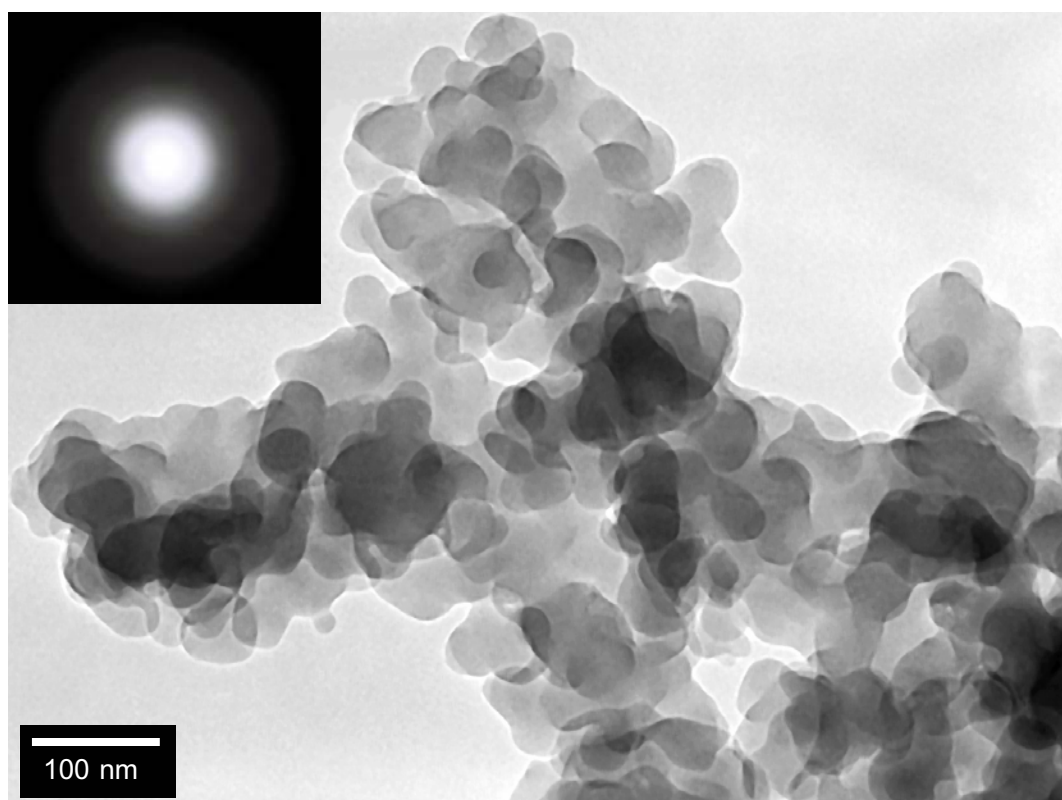


Fig. 7: TEM micrograph of silica nano-particles in the LDD1 treated ash sample. The small image was SADP of the particles.

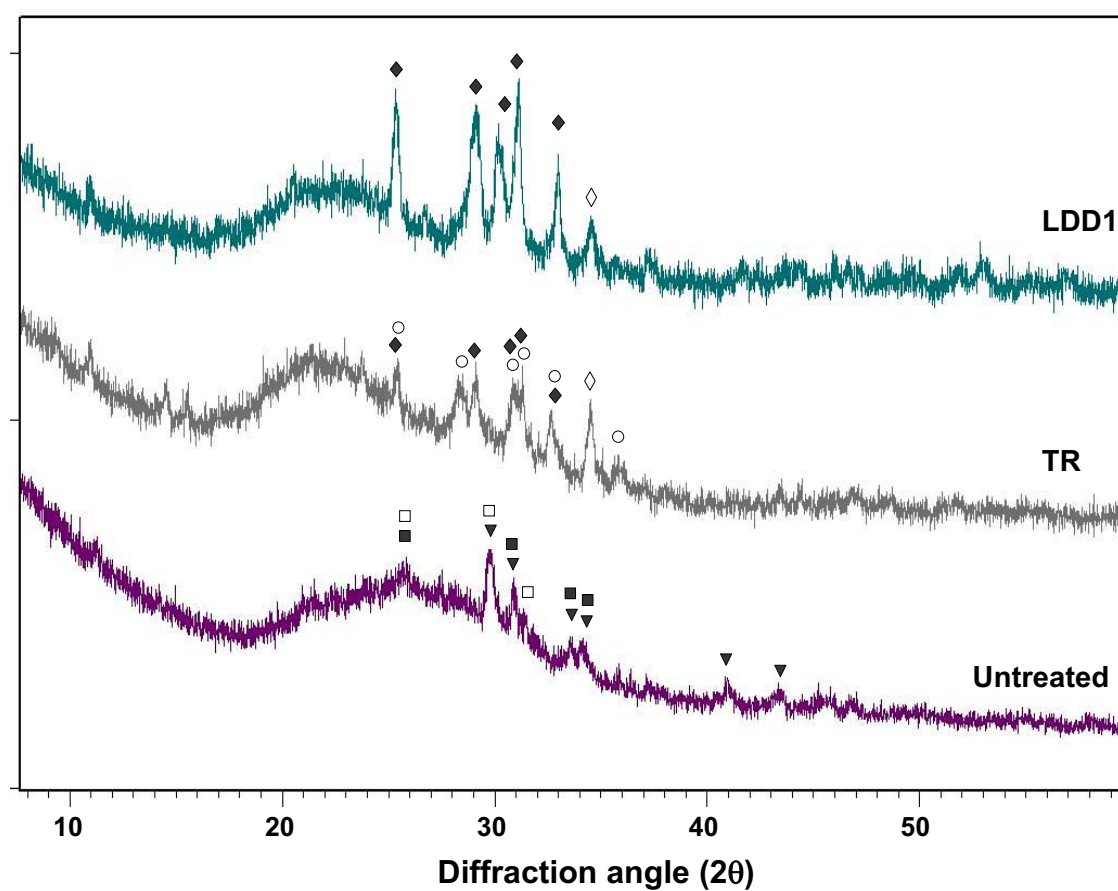


Fig. 8: XRD spectra of ash samples. Denoted TR, and LDD1 are *Trichoderma reesei*, and LDD1 pretreated samples, respectively. Symbolic representation of each phase are as follows; $\blacklozenge$ $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$; $\diamond$ Ca_2MnO_4 ; $\circ$ $\text{K}_6\text{Mn}_2\text{O}_6$; $\blacktriangledown$ K_2SO_4 ; $\blacksquare$ $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$; and $\square$ K_2CO_3 .

Table 1: Optimal culture conditions and hydrolysis results after 72h incubation

Culture	pH	Temperature (°C)	Weight loss (%)	Reducing sugar (g/l)	Ash content (%)
TR	5	37	40	1.26	12
LDD1	6	40	55	0.50	23

Table 2: X-ray fluorescence chemical analysis of ash samples

Ash sample	Chemical content (% by weight)							
	SiO ₂	K ₂ O	CaO	MgO	Mn ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	P ₂ O ₅	SO ₃
Untreated	72.60	17.94	1.86	2.67	0.56	0.18	2.88	1.21
LDD1 treated	73.65	1.12	2.52	1.07	9.88	0.13	9.83	1.66
TR treated	82.53	2.55	2.64	1.18	3.42	0.17	4.70	2.66