



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

- โครงการย่อยที่ 1 การสำรวจหาสารประกอบ polyphenols เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล
- Investigation of high value added polyphenolic compounds of by-products from sugar industry

โดย
นางสาวศิริลักษณ์ เลี้ยงประยูร และคณะ
ตุลาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสำรวจหาสารประกอบ polyphenols เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้
จากอุตสาหกรรมน้ำตาล

Investigation of high value added polyphenolic compounds of by-
products from sugar industry

Executive Summary

โครงการ: การสำรวจหาสารประกอบ polyphenols เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล
เป้าหมาย

งานวิจัยจำนวนมากพยายามเพิ่มประสิทธิภาพและมูลค่าจากผลผลิตพลอยได้โดยนำไปใช้ประโยชน์ในหลายรูปแบบ การสำรวจหาสารมูลค่าเพิ่มที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้เหล่านั้น สาร polyphenols เป็นสารประกอบทุติยภูมิกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชหลายชนิดรวมทั้งในอ้อย เช่น ใบ เปลือก และลำต้น สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติสำคัญในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ปัจจุบันถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อาหาร โดย lignin เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดเนื่องจากในกากอ้อยมีปริมาณ lignin อยู่ถึง 20% แต่ส่วนใหญ่ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของ polyphenols โดยเฉพาะ lignin ที่ได้จากกากอ้อยเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ

วิธีการ

ศึกษาชนิดและปริมาณสาร polyphenols ที่สกัดจากตัวอย่างใบอ้อยและกากอ้อย โดยตัวอย่างใบอ้อยที่ใช้ในการศึกษามาจากพันธุ์ขอนแก่น 3 และ พันธุ์ 92-11 อายุประมาณ 10 เดือนนำมาทดลองสกัดสาร polyphenols ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ กากอ้อยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาล 4 แห่งได้แก่ โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย โรงงานน้ำตาลบ้านไร่ โรงงานน้ำตาลมิตรผล และโรงงานน้ำตาลนครบุรี นำมาใช้ในการสกัด lignin ซึ่งเป็นสาร polyphenols ที่มีขนาดใหญ่และมีปริมาณมากใน lignocellulosic material หลายชนิดรวมทั้งกากอ้อย โดยใช้สภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง (mild condition) สารสกัดที่ได้นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเทคนิค spectroscopy เพื่อจำแนกกลุ่มของ polyphenols จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR และ $^1\text{H-NMR}$ รวมถึงวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพด้วยการวิเคราะห์สมบัติในการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) และสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ข้อมูลทั้งผลได้ในการสกัดและคุณสมบัติของสารสกัดจะนำไปใช้ต่อยอดในการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบของแผ่นวัสดุปิดแผล (โครงการย่อยที่ 2) และ การคำนวณต้นทุนเพื่อประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของทั้งการผลิตสาร polyphenols และการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบของแผ่นวัสดุปิดแผล (โครงการย่อยที่ 3) ต่อไป

ผลที่ได้จากงานวิจัย

ผลจากงานวิจัยแสดงถึงข้อมูลในเชิงปริมาณและคุณภาพของสาร polyphenols ที่ได้จากใบอ้อยและกากอ้อยจากวิธีการสกัดที่ไม่ซับซ้อนเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสารที่มีคุณสมบัติที่ต้องการมาใช้ประโยชน์ โดยพบว่าในเชิงปริมาณ lignin เป็นสารที่มีปริมาณมากในกากอ้อยโดยให้ผลได้จากการสกัดประมาณ 20% และผลได้ขึ้นกับสภาวะในการสกัดโดยใช้ต่างให้ผลได้มากกว่าการใช้กรด กากอ้อยใหม่ที่เพิ่งผ่านการหีบต้องใช้เวลากระบวนการเปิดด้วยไอน้ำเพื่อเพิ่มผลการสกัดในขณะที่กากอ้อยเก่า (6 - 12 เดือน) สามารถสกัด lignin ออกมาได้เท่ากันหรือมากกว่า lignin ที่ได้จากกากอ้อยมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันไปตามสภาวะในการสกัดและส่งผลกระทบต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันโดยกากอ้อยใหม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า lignin จากกากอ้อยเก่าเนื่องมาจากสภาพการเก็บรักษากากอ้อยอาจส่งผลต่อการเกิด oxidation ของ lignin เช่นกัน ทั้งนี้กากอ้อยที่ผ่านการสกัด lignin แล้วยังสามารถนำกลับมาเผาเพื่อใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าได้โดยให้พลังงานความร้อนต่ำกว่ากากอ้อยปกติประมาณ 2 - 15% ขึ้นกับอายุของกากอ้อยและวิธีการสกัดเพราะ lignin ที่ถูกสกัดออกเป็นส่วนหนึ่งของพลังงานที่เกิดขึ้นจากการเผากากอ้อย

โครงการการสำรวจหาสารประกอบ polyphenols เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตพลอยได้จาก

อุตสาหกรรมน้ำตาล

ศิริลักษณ์ เลี้ยงประยูร อุดมลักษณ์ สุขอัฒตะ และ สุธีรา วิทยากาญจน์

¹ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลในแต่ละปีมีปริมาณมหาศาลและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งอาจยังไม่เต็มประสิทธิภาพ การสำรวจหาสารมูลค่าเพิ่มที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้เหล่านั้นและส่งผลกระทบต่อมูลค่าของอุตสาหกรรมน้ำตาลโดยรวม สาร polyphenols เป็นสารประกอบทุติยภูมิกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชหลายชนิดรวมทั้งในอ้อย มีคุณสมบัติสำคัญในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ปัจจุบันถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหาร เช่น สารแต่งกลิ่นรส อาหารเสริมสุขภาพ และโภชนเภสัช รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์หลายชนิด จากโครงสร้างทางเคมีของผลผลิตพลอยได้ของอ้อยพบว่า lignin ซึ่งเป็น macropolymer ของ polyphenols มีปริมาณมากในกากอ้อย งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีการสกัดรวมถึงคุณสมบัติของ lignin จากกากอ้อย ได้แก่ โครงสร้างทางเคมี สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัสดุพิเศษ โดยโครงสร้างและคุณสมบัติของสารสกัด lignin แตกต่างกันไปตามชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด (1%NaOH และ formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) สัดส่วนของ solid: liquid ratio (1:6 และ 1:12) อายุของกากอ้อย (หลังหีบ 1 วัน และ 6 -12 เดือน) และการทำ pretreatment ($\pm$ steam explosion) ผลพบว่าการใช้กากอ้อยเก่าสามารถสกัด lignin ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ steam explosion และให้ผลได้สูงสุด 26% โดยน้ำหนัก ในขณะที่การสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ต้องใช้ steam explosion โดยได้ผลได้สูงสุด 22% ตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุดคือ 1%NaOH ที่อัตราส่วน 1:12 อย่างไรก็ตาม lignin จากกากอ้อยเก่ามีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า lignin จากกากอ้อยใหม่เล็กน้อยซึ่งส่วนนี้อาจเนื่องมาจากการเกิด oxidation ของ lignin เมื่อนำไปทดสอบสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า lignin ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 1,250 $\mu\text{g/ml}$ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Vibrio cholera* (DMST 15778), *Salmonella typhimurium* (DMST 562) และ *Escherichia coli* (DMST 4212)) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* (DMST 8840)) นอกจากนี้กากอ้อยที่ผ่านการสกัด lignin แล้วยังสามารถนำกลับมาใช้ผลิตไฟฟ้าต่อไปได้โดยให้ค่าพลังงานความร้อนลดลงประมาณ 2 - 15% ขึ้นกับปริมาณ lignin ที่ถูกสกัดออกไปเพราะโครงสร้างของ lignin ที่เป็น hydrocarbon polymer ก็เป็นส่วนที่ให้พลังงานเช่นกัน

Abstract

Large amount of sugar industrial by products is generated annually without fully utilization capacity. Investigation of high value added compounds could be a way to improve this limitation and hopefully overall value chain of sugar industry could be increased. Polyphenols is a group of secondary metabolites available in various plants including sugarcane. It becomes more and more interesting compounds due to its ability to inhibit oxidation reaction which make it suitable for various products either food i.e flavors, nutritional food and pharmaceutical products or non-food such as precursor for polymer industries. Lignin is a macropolyphenols found abundantly in bagasse, this work therefore aims at investigating a suitable lignin extraction method as well as characterizing its chemical structure and biological activity in order to provide necessary information for wound dressing fabrication. The results indicated the effect of extracting media (1%NaOH and formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v), solid: liquid ratio (1:6 and 1:12), age of bagasse (fresh and 6 - 12 month old bagasse) and pretreatment ($\pm$ steam explosion) on extraction yield. The highest extraction yield of lignin (26%) was obtained from extraction old bagasse with 1:12 of bagasse: 1%NaOH (w/v) without steam explosion while 22% yield could be obtained from new bagasse using the same extraction condition but with steam explosion. Lignin obtained from new bagasse gave better antioxidant activity than those of old bagasse which could be partly due to lignin oxidation. All lignin obtained from all extraction conditions at the concentration of 1,250 μ g/ml (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) could inhibit microbial growth. The better inhibition was observed in gram negative bacteria (*Vibrio cholera* (DMST 15778), *Salmonella typhimurium* (DMST 562) and *Escherichia coli* (DMST 4212)) than gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* (DMST 8840)). In addition, delignified bagasse could be reutilized as an energy source with slight reduction of heat building capacity (2 - 15%) as extracted lignin is also a part of energy produced by bagasse.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	4
วิธีการทดลอง	5
1. การสกัด polyphenols จากใบอ้อย	5
1.1 การเตรียมตัวอย่าง	5
1.2 การสกัด polyphenols	5
2. การสกัด lignin จากกากอ้อย	5
2.1 การเตรียมตัวอย่างกากอ้อย	5
2.2 การสกัด lignin กากอ้อย	7
2.3 การวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อน	8
3. การวิเคราะห์ทางเคมี	8
3.1 การวิเคราะห์ชนิดของการสกัด polyphenols ด้วย thin layer chromatography (TLC)	8
3.2 ตรวจสอบปริมาณ total phenolic content (TPC)	8
3.3 การตรวจสอบปริมาณ flavonoids content	8
3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR	9
3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค H^1 -NMR	9
4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพ	9
4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ด้วยเทคนิค DPPH	11
ผลการทดลอง	12
1. Polyphenols จากใบอ้อย	12
2. Polyphenols จากกากอ้อย	17
สรุปผลการดำเนินงาน	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	33

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูลของตัวอย่างกากอ้อยจาก 4 โรงงาน	6
ตารางที่ 2 สภาวะในการสกัด lignin จากกากอ้อย.....	7
ตารางที่ 3 ผลได้การสกัด polyphenols จากใบอ้อย (% extraction yield, w/w) และค่า total phenolic content ในรูปของ gallic acid และ catechin.....	12
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด polyphenols จากใบอ้อยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration).....	15
ตารางที่ 5 Total phenolic content (%TPC) ในรูปของ gallic acid และ Kraft lignin	21
ตารางที่ 6 Functional groups จาก wave number ต่าง ๆ ของตัวอย่าง lignin จากกากอ้อยเก่าและใหม่	23
ตารางที่ 7 Proton chemical shift (δ , ppm) ของ lignin จากกากอ้อยจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR	24
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัด lignin จากกากอ้อยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration).....	25
ตารางที่ 9 ค่าพลังงานความร้อนจากกากอ้อยของตัวอย่างจากโรงงาน 4 แห่งก่อนและหลังการสกัด lignin ..	28

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ตัวอย่างใบอ้อยที่ตัดขนาดประมาณ 1 cm. และผ่าน hammer mill sieve ขนาด 0.2 mm.....	5
ภาพที่ 2 เครื่อง FTIR spectrometer Nicolet IR200	9
ภาพที่ 3 ตัวอย่างใบอ้อยที่ผ่าน sieve ขนาด 0.2 mm หลังสกัดด้วย methanol 24 ชั่วโมง (1) และตัวอย่าง ใบอ้อยทั้งสองขนาดที่กรองผ่านกระดาษกรอง (2).....	12
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ (1) gallic acid ($C_7H_6O_5$), (2) catechin ($C_{15}H_{14}O_6$), (3) pyrogallol ($C_6H_6O_3$) และ tannic acid ($C_{76}H_{52}O_{46}$).....	14
ภาพที่ 5 % DPPH _{remaining} ของ crude extract จากใบอ้อยขนาด 0.2 mm และ 1 cm ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ catechin ความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/ml.....	16
ภาพที่ 6 TLC ของสารสกัดจากตัวอย่างใบอ้อยขนาด 0.2 mm และ 1 cm	17
ภาพที่ 7 TLC ของสารสกัด non-lignin และ lignin จากตัวอย่างกากอ้อยเก่าและใหม่.....	18
ภาพที่ 8 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อย (%yield, w/w กากอ้อย) ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ	19
ภาพที่ 9 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ (% yield, w/w กากอ้อย) จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ.....	20
ภาพที่ 10 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง lignin จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ	20
ภาพที่ 11 ATR-FTIR spectrum จากตัวอย่างกากอ้อยเก่าและใหม่ (new) จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ.....	22
ภาพที่ 12 1H NMR spectrum ของ lignin จากกากอ้อยที่สกัดด้วยด่างที่ไม่ผ่าน steam explosion (NSB 1:12)	23
ภาพที่ 13 1H NMR spectrum ของ lignin จากกากอ้อยที่สกัดด้วยกรดที่ไม่ผ่าน steam explosion (NSA 1:6)	24
ภาพที่ 14 % DPPH _{remaining} ของสารสกัด lignin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 mg/ml.....	26

บทนำ

ผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลในแต่ละปีมีปริมาณมหาศาลและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น กากอ้อยถูกนำกลับไปเผาใช้เป็นพลังงานหมุนเวียนในโรงงาน และใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ และกากหม้อกรองนำไปใช้ทำปุ๋ย ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากพยายามเพิ่มประสิทธิภาพและมูลค่าจากผลผลิตพลอยได้ดังกล่าวโดยนำไปใช้ประโยชน์นอกเหนือจากวิธีการที่มีในปัจจุบัน การสำรวจหาสารมูลค่าเพิ่มที่สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมชนิดอื่น ๆ เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้เหล่านั้นและส่งผลกระทบต่อมูลค่าของอุตสาหกรรมน้ำตาลโดยรวม

สาร polyphenols เป็นสารประกอบพหุதியูมิกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชหลายชนิดรวมทั้งในอ้อย มีคุณสมบัติสำคัญในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ปัจจุบันถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหาร เช่น สารแต่งกลิ่นรส อาหารเสริมสุขภาพ และโภชนเภสัช รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์หลายชนิด polyphenols พบได้ในส่วนต่างๆ ของอ้อย ได้แก่ ใบ และ เปลือก มี flavonoids และ anthocyanins รวมถึงผลิตภัณฑ์และผลผลิตพลอยได้จากหลายขั้นตอนของอุตสาหกรรมน้ำตาล โดย lignin เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดเนื่องจากในกากอ้อยมีปริมาณ lignin อยู่ถึง 20% แต่ส่วนใหญ่ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่ถูกกำจัดด้วยการย่อยด้วยกรดหรือด่างก่อนนำกากอ้อยไปใช้ทำเยื่อกระดาษ lignin

จากแนวความคิดเรื่องระบบโรงกลั่นชีวภาพ (biorefinery) ของชีวมวล lignocellulose จะพบว่า lignin เป็นหนึ่งในสามองค์ประกอบหลักที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในแบบที่ไม่ซับซ้อนและมูลค่าต่ำ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นสารเชื่อมเนื้อไม้ ยางมะตอยธรรมชาติ (bitumen) ซึ่งการนำ lignin จากกากอ้อยมาใช้ประโยชน์ยังสามารถพัฒนาได้อีกด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสมเนื่องจากกากอ้อยมีโครงสร้างที่แข็งแรงน้อยกว่าชีวมวล lignocellulose อื่น เช่น ไม้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้การย่อยด้วยสภาวะที่รุนแรง รวมไปถึงสาร polyphenols ชนิดอื่นๆ ที่พบในอ้อยก็ควรมีการสำรวจชนิดและปริมาณรวมทั้งสมบัติทางเคมีเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาใช้ประโยชน์อย่างสูงสุด

วิธีการทดลอง

1. การสกัด polyphenols จากใบอ้อย

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบ polyphenols ในตัวอย่างสด ตัวอย่างใบอ้อยที่ได้จะนำมาอบที่อุณหภูมิ 45°C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแห้งที่ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัด polyphenols

นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแล้วมาลดขนาดเพื่อเปรียบเทียบผลได้จากการสกัดจากตัวอย่าง 2 ขนาด ได้แก่ ตัวอย่างใบอ้อยที่ตัดให้มีขนาด ประมาณ 1 cm. และตัวอย่างที่ลดขนาดด้วยเครื่อง hammer mill ผ่าน sieve ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 mm. (ภาพที่ 1) จากนั้นทำการสกัดสาร polyphenols จากใบอ้อยโดยใช้ methanol สกัดตัวอย่าง 5 กรัม ใน methanol 50 ml. ทำการสกัดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 225 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างออกจากตัวทำละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างสารสกัดออกจากตัวอย่างบนกระดาษกรองด้วย methanol ครั้งละ 10 ml. จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นระเหย methanol ออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นคำนวณผลได้จากการสกัด (% extraction) โดยเปรียบเทียบน้ำหนักของ crude extract ต่อน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น



ภาพที่ 1 ตัวอย่างใบอ้อยที่ตัดขนาดประมาณ 1 cm. (1) และผ่าน hammer mill sieve ขนาด 0.2 mm. (2)

2. การสกัด lignin จากกากอ้อย

2.1 การเตรียมตัวอย่างกากอ้อย

ตัวอย่างกากอ้อยที่ได้จาก 4 โรงงาน จะนำมาหาค่าความชื้นโดยการอบตัวอย่างน้ำหนัก 20 กรัมที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างที่ปล่อยให้เย็นใน dessicator หลังอบบันทึกและอบตัวอย่างซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (1) โดยค่าความชื้นจะใช้ในการคำนวณผลได้จากการสกัด lignin รายละเอียดของตัวอย่างกากอ้อยที่ได้จากโรงงานทั้ง 4 แห่งดังแสดงในตารางที่ 1

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \quad \text{.....(1)}$$

ตารางที่ 1 ข้อมูลของตัวอย่างกากอ้อยจาก 4 โรงงาน

โรงงาน	วันที่เก็บตัวอย่าง	สภาพกองกากอ้อย	อายุ	%ความชื้น
โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย จ. นครสวรรค์	30 ต.ค. 2557		6 เดือน	52.7
โรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล บ้านไร่ จ.อุทัยธานี	30 ต.ค. 2557		6 เดือน	59.7
โรงงานน้ำตาลมิตรภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ	24 ธ.ค. 2557		12 เดือน	20.8
โรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา	24 ธ.ค. 2557		12 เดือน	27.6

2.2 การสกัด lignin จากกากอ้อย

lignin เป็นสารประกอบ polyphenols ขนาดใหญ่และมีโครงสร้างและสมบัติทางเคมีที่ซับซ้อนทำให้ไม่สามารถสกัดออกได้ด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพียงอย่างเดียว โดยมากอุตสาหกรรมเยื่อใช้วิธีการ delignification ด้วยด่างเพื่อแยก lignin ออกจากโครงสร้างของ cellulose และ hemicelluloses

ในงานวิจัยนี้จะเปรียบเทียบผลได้จากการสกัดจากตัวอย่างกากอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion) ก่อนเข้าสู่กระบวนการ delignification ด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง (mild condition) ดังแสดงในตารางที่ 2 ตัวอย่าง lignin ที่ได้จากทุกสภาวะจะนำมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเปรียบเทียบผลได้ (% extraction yield) จากแต่ละวิธี

ตารางที่ 2 สภาวะในการสกัด lignin จากกากอ้อย

ตัวอย่าง	ปัจจัยที่ศึกษา	สภาวะที่ทดลอง
■ กากอ้อย	1. Delignification	■ Acid hydrolysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Delmas (2011) สกัด lignin จากกากอ้อยโดยผสมกับ formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) autoclave ที่ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:12 (w/v) กรองกากอ้อยออกผ่านกระดาษกรอง ตักตะกอน lignin โดยเติมน้ำกลั่น จากนั้นกรองตะกอน lignin ออกผ่านกระดาษกรอง ระเหยน้ำส่วนที่เหลือออกจาก lignin โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ■ Alkali hydrolysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Zabaleta (2012) สกัด lignin จากกากอ้อยโดยผสมกับสารละลาย 1% NaOH autoclave ที่ 110°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:12 (w/v) กรองกากอ้อยออกและแยก lignin ออกโดยการปรับ pH ให้เท่ากับ 2 ด้วย 50% H₂SO₄ 10 ml. และกรอง ระเหยน้ำส่วนที่เหลือออกจาก lignin โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
	2. Steam explosion + delignification	■ Steam explosion ที่ 210 °C เป็นเวลา 4 นาที ตามสภาวะของ Cara <i>et al.</i> (2008) ■ Acid hydrolysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Delmas (2011) สกัด lignin จากกากอ้อยโดยผสมกับ formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) autoclave ที่ 110°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:12 (w/v) กรองกากอ้อยออกผ่านกระดาษกรอง ตักตะกอน lignin โดยเติมน้ำกลั่น จากนั้นกรองตะกอน lignin ออกผ่านกระดาษกรอง ระเหยน้ำส่วนที่เหลือออกจาก lignin โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ■ Alkali hydrolysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Zabaleta (2012) สกัด lignin จากกากอ้อยโดยผสมกับสารละลาย 1% NaOH autoclave ที่ 110°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ solid-liquid ratio เท่ากับ 1:12 (w/v) กรองกากอ้อยออกและแยก lignin ออกโดยการปรับ pH ให้เท่ากับ 2 ด้วย 50% H₂SO₄ 10 ml. และกรอง ระเหยน้ำส่วนที่เหลือออกจาก lignin โดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อน

นำตัวอย่างกากอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการสกัด lignin มาวิเคราะห์ค่าพลังงานความร้อนตามวิธี ASTM D5865 เพื่อเปรียบเทียบว่ากากอ้อยที่สกัด lignin ออกแล้วสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไฟฟ้าได้เช่นเดียวกับกากอ้อยปกติหรือไม่

3. การวิเคราะห์ทางเคมี

ในการคัดเลือกวิธีการสกัด Crude extract จากใบอ้อยและ lignin จากกากอ้อยจะนำมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณเบื้องต้นด้วยการวัด total phenolic content (TPC) ด้วยเทคนิค spectrophotometry โดยใช้ gallic acid, catechin และ quercetin เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับสาร polyphenols ในกลุ่ม hydrolyzable tannin, condensed tannin และ flavonoid ตามลำดับ เพื่อระบุชนิดของ polyphenols ในเชิงคุณภาพจะใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มของ polyphenols ที่สกัดได้ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การวิเคราะห์ชนิดของการสกัด polyphenols ด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

วิเคราะห์ชนิดของสารด้วยเทคนิค TLC ตามวิธีการของ Sharma *et al.*, (1998) เตรียมตัวอย่างด้วย methanol ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน plant sterols, catechin และ gallic acid ความเข้มข้น 5 mg/ml หยดตัวอย่าง 10 μ l และสารละลายมาตรฐาน 5 μ l ลงบนแผ่น TLC (20 เซนติเมตร x 20 เซนติเมตร เคลือบ silica gel 60G, Merck) วางแผ่น TLC ลงใน chamber ที่มี mobile phase (chloroform/ ethyl acetate/acetic acid (50:50:1, v/v/v)) จากนั้นตรวจสอบผลด้วย ferric chloride reagent 1% (w/v) โดยจุดของ gallic acid methyl gallate, pyrogallol, catechol, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid และ tannic acid จะปรากฏบนแผ่น TLC ทันที จากนั้นพ่นสารละลาย 40% orthophosphoric acid อีกครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 180 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตรวจสอบสารที่ไม่ใช่ polyphenols

3.2 ตรวจสอบปริมาณ total phenolic content (TPC)

ทำการวิเคราะห์ TPC โดยดัดแปลงวิธี Folin – Ciocalteu colorimetric method ตามวิธีการของ Wolfe *et al.*, (2003) เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วงของสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 μ g/ml ดูดตัวอย่างปริมาตร 125 μ l เติมน้ำลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 500 μ l เติมสารละลาย Folin – Ciocalteu 125 μ l ทิ้งไว้นาน 6 นาที จากนั้นเติม 7% Sodium carbonate ปริมาตร 1250 μ l และน้ำกลั่น 1000 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm คำนวณค่าเป็น mg gallic acid/g crude extract ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

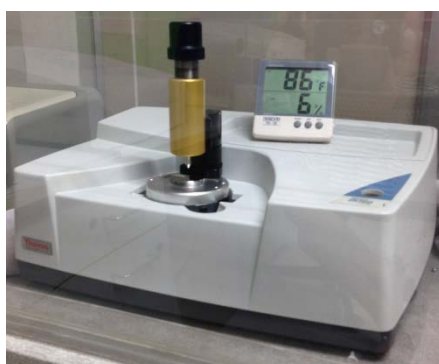
3.3 การตรวจสอบปริมาณ flavonoids content

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Wolfe *et al.*, (2003) เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในช่วงของสารมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 และ 300 μ g/ml ดูดตัวอย่างปริมาตร 250 μ l เติมน้ำลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1250 μ l จากนั้นเติม 5% Sodium nitrite

ปริมาตร 75 μL ที่ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วเติม 10% Aluminium chloride 150 μL ที่ทิ้งไว้นาน 6 นาที จากนั้นเติม 1M NaOH ปริมาตร 500 μL และน้ำกลั่น 275 μL นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm คำนวณค่าเป็น mg catechin/g crude extract ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

3.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค FTIR

นำตัวอย่างสารสกัด lignin บดเป็นผง หนักประมาณ 10 mg ทำการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยเทคนิค FTIR spectrometry ด้วยเครื่อง Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) instrument (Nicolet IR200, Thermo Fisher Scientific, USA) ทำการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงคลื่น (wave number) $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, Resolution 4 cm^{-1} , 128 scan ต่อตัวอย่างและวิเคราะห์โครงสร้างด้วย OMNIC8 software



ภาพที่ 2 เครื่อง FTIR spectrometer Nicolet IR200

3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$

ละลายสารสกัด lignin หนัก 10 มิลลิกรัม ในสารละลาย $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการทดสอบด้วยเครื่อง Bruker Avance III HD-NanoBay 400 MHz NMR Spectrometer วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MestReNova

4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพ

4.1 การทดสอบการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ MIC (minimal inhibitory concentration) และ MBC (minimal bactericidal concentration) ตามวิธีการของ Basri *et al* (2005) ในเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่

- *Staphylococcus aureus* (DMST 8840)
- *Escherichia coli* (DMST 4212)
- *Salmonella typhimurium* (DMST 562)
- *Vibrio cholera* (DMST 15778)

4.1.1 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

- การเตรียมอาหาร Tryptone soy agar

ชั่ง Tryptone soy agar (Difco, United States) ตามที่กำหนดคือ 22.5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร โดยเตรียมในปริมาณที่ต้องการ เติมน้ำกลั่น ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส ดูดอาหารใส่หลอด ๆ ละ 5 ml นำไปฆ่าเชื้อโดยผ่านหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45 °C นำไปเลี้ยงให้ผิวหน้าอาหารทำมุม 45 องศา

- การเตรียมอาหาร Muller-Hinton agar

ชั่ง Muller-Hinton agar (Merck, Germany) ตามที่กำหนดคือ 21 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร โดยเตรียมในปริมาณที่ต้องการ เติมน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อโดยผ่านหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 45 °C นำไปเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 20 ml/จาน

- วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้น Tryptone soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No.5 (ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/ml (Kirby-Bauer)) นำมาเจือจางด้วยอาหาร ในอัตราส่วน 1: 200

4.1.2 วิธีการเตรียมสารทดสอบ

เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้น 10,000 µg/ml โดยเจือจางด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Syringe filter (Whatman) ที่มีความละเอียด 0.2 µm สารทดสอบที่เตรียมได้ จะถูกนำไปเจือจางอีกครั้งด้วยวิธี two-fold dilution

4.1.3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ปิเปตอาหาร Muller-Hinton agar ปริมาตร 100 µl ใส่ลงใน microplate 96 หลุม จากนั้นปิเปตสารทดสอบ 100 µl ใส่ลงหลุมและเจือจางด้วยวิธี two-fold dilution โดยปิเปตสารทดสอบความเข้มข้น 10,000 µg/ml ลง microplate หลุมที่หนึ่ง ผสมสารทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง 4-5 ครั้ง จากนั้นดูดสารผสมปริมาตร 100 µl จากหลุมที่หนึ่งลงหลุมที่สองทำเช่นนี้จนถึงหลุมสุดท้าย ปิเปตสารผสมหลุมสุดท้ายทิ้งไป 100 µl จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 100 µl ใส่ในแต่ละหลุมโดยหลุมที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น positive control และหลุมที่ใส่เชื้อแบคทีเรียเป็น negative control นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง

4.1.4 การตรวจผล

- ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยเติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม หาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) โดยการสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย resazurin

▪ ตรวจสอบการทำลายเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ตามวิธีการของ Basri *et al.* (2005) โดยนำสารละลายในหลุมที่สังเกตเห็นว่าไม่มีการเจริญของเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Muller-Hinton agar รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่า MBC

4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ด้วยเทคนิค DPPH

วิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน DPPH โดยดัดแปลงวิธีจาก Fagali and Catala (2008) เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมใน methanol 1 ml แล้วดูดสารตัวอย่างผสมกับสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0.25 mM 1 ml ผสมด้วย vortex mixer ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ที่ 0 – 60 นาที ทุก 1 นาที เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบ % DPPH_{remaining} กับสารมาตรฐาน catechin และ gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02 mg/ml คำนวณได้จากสมการ (2)

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

A_f : ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละช่วงเวลา

A_0 : ค่าการดูดกลืนแสงที่จุดเริ่มต้น

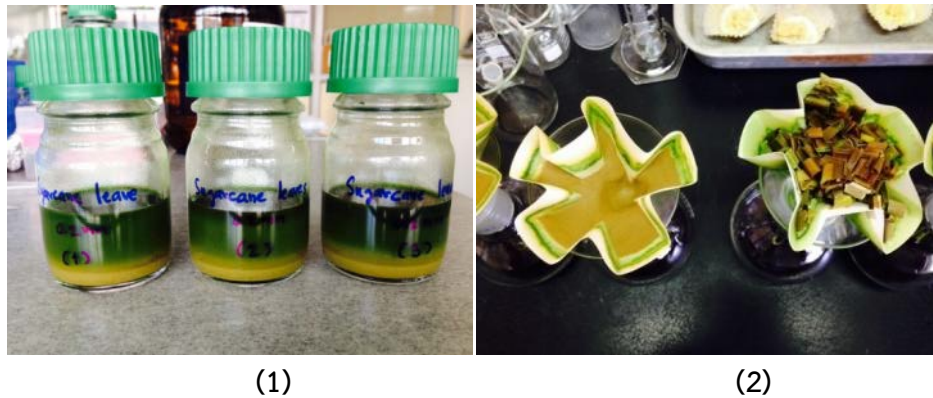
ผลการทดลอง

1. Polyphenols จากใบอ้อย

1.1 ผลได้การสกัด และปริมาณ total phenolic content (TPC)

➤ Methanol extraction

ทำการทดลองสกัด polyphenols ด้วย methanol ในตัวอย่างที่ลดขนาดด้วย hammer mill ผ่าน sieve ขนาด 0.2 mm. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำมารองและ ระเหยเอา methanol ออก (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ตัวอย่างใบอ้อยที่ผ่าน sieve ขนาด 0.2 mm หลังสกัดด้วย methanol 24 ชั่วโมง (1) และตัวอย่างใบอ้อยทั้งสองขนาดที่กรองผ่านกระดาษกรอง (2)

เปรียบเทียบผลได้การสกัดพบว่าเมื่อลดขนาด % extraction yield ที่ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 2.2% เทียบกับการตัดเป็นชิ้นหยาบขนาด 1 cm. (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ค่า total phenolic content ในรูปของ gallic acid (hydrolysable tannin) พบว่าใบอ้อยขนาดเล็ก (0.2 mm) มีค่า %TPC มากกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเชิงคุณภาพการลดขนาดใบไม่มีผลต่อ %TPC (w/w crude extract) เมื่อเปรียบเทียบในรูปของ catechin ซึ่งเป็น polyphenols ในรูป condensed tannin

ตารางที่ 3 ผลได้การสกัด polyphenols จากใบอ้อย (% extraction yield, w/w) และค่า total phenolic content ในรูปของ gallic acid และ catechin

ตัวอย่าง	% extraction yield (w/w ใบอ้อย)	% TPC (gallic acid) (w/w crude extract)	% TPC (gallic acid) (w/w ใบอ้อย)	% TPC (catechin) (w/w crude extract)	% TPC (catechin) (w/w ใบอ้อย)
ใบอ้อย 0.2 mm	6.48 ^a ± 0.13	4.21 ^a ± 0.34	0.27 ^a ± 0.03	0.86 ^a ± 0.06	0.06 ^a ± 0.01
ใบอ้อย 1 cm	4.15 ^b ± 0.29	3.52 ^b ± 0.15	0.15 ^b ± 1.02	0.80 ^a ± 0.06	0.03 ^b ± 0.00

: ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± Standard deviation (SD)

: ตัวอักษรเดียวกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย (student t test, $P \leq 0.05$)

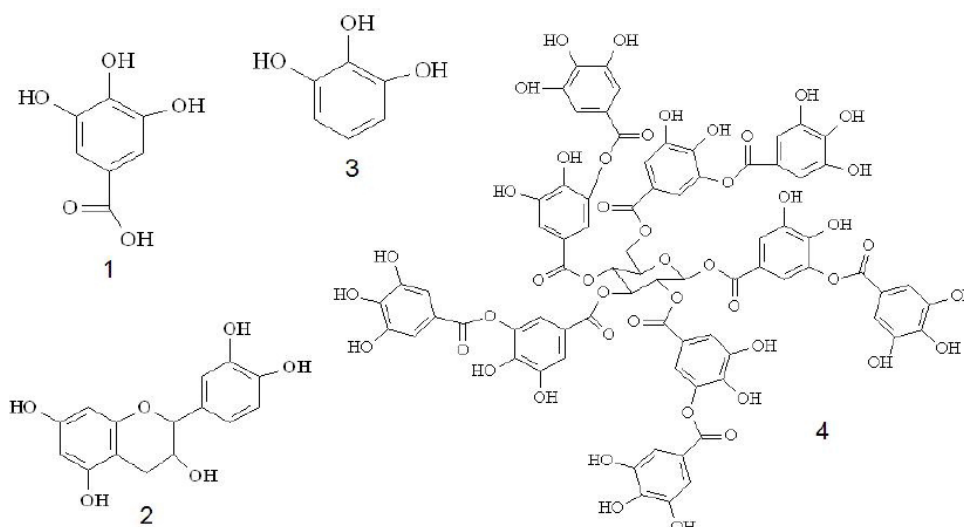
รายงานวิจัยจำนวนมากสรุปคล้ายคลึงกันว่าชนิด ปริมาณ และการปนเปื้อนของสารกลุ่มอื่น ๆ ที่ได้จากขั้นตอนการสกัด polyphenols ในตัวอย่างพืชแตกต่างกันไปตามสภาวะที่ใช้ในการสกัดโดยเฉพาะชนิด

ของตัวทำละลาย โดย methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยเกี่ยวกับ polyphenols ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสาร polyphenols ด้วย methanol พบว่าการใช้กรดปริมาณเล็กน้อยสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด โดยกรดส่วนใหญ่ที่ใช้ได้แก่ hydrochloric acid เนื่องจาก acetic acid และ formic acid มีผลต่อการเปลี่ยนรูปของ polyphenols เช่น การเกิด acylation จากงานวิจัยของ Escribano-Bailon and Santos-Buelga (2003) พบว่าความเข้มข้นของ hydrochloric acid ในช่วง 0.01 – 0.05N HCl ใน methanol ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ polyphenols

➤ Methanol-HCl extraction

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองสกัดใบอ้อยขนาด 0.2 mm โดยใช้ตัวอย่าง 200 mg ต่อ 0.02 N HCl ใน methanol ปริมาตร 2 ml ทำการสกัดด้วยเครื่อง ultra-sonicate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเหวี่ยงแยกตัวอย่างใบออกจากสารสกัดที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายและระเหย methanol ออกด้วยแก๊สไนโตรเจน ทำการคำนวณผลได้พบว่าที่สภาวะการสกัดดังกล่าว ผลได้ของการสกัดเท่ากับ 6.11% เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่า %TPC (gallic acid) ได้เท่ากับ 3.61% (w/w crude extract) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้ methanol เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ %TFC (catechin) มีค่าเท่ากับ 0.67% (w/w crude extract) ซึ่งน้อยกว่าการใช้ methanol เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ ในแง่ของระยะเวลาที่ใช้สกัด การใช้ acidic methanol ใช้เวลาน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับการใช้ methanol

ในการคัดเลือกวิธีการจำเป็นต้องพิจารณาร่วมกับกระบวนการ electrospinning ที่ใช้ในการผลิตแผ่นวัสดุผลิตผลด้วยว่ามี acid residue ซึ่งอาจตกค้างหรือไม่หากเลือกใช้ acidic methanol ในการสกัด polyphenols นอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ crude extract จะมีส่วนสำคัญในการเลือก เนื่องจาก gallic acid และ catechin เป็น monomeric unit ของ hydrolyzable และ condensed tannin ตามลำดับอย่างไรก็ตามยังมีสารกลุ่ม polyphenols อื่น ๆ ที่โครงสร้างอาจยังอยู่ในลักษณะที่เป็น polymeric phenols ซึ่งจำนวนของ hydroxyl groups และการเรียงตัวในโมเลกุลที่อาจแตกต่างจากสารมาตรฐานส่งผลโดยตรงต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ Folin-Ciocalteu reagent เช่นที่งานวิจัยของ Blainski *et al.*, (2013) พบว่า pyrogallol มีค่า specific absorptivity ที่ 760 nm 30 นาที ($A^{1\%}_{\text{pyrogallol}}$) เมื่อทดสอบกับ Folin-Ciocalteu reagent เท่ากับ 1551.8 ± 93.95 ซึ่งสูงกว่า $A^{1\%}_{\text{catechin}}$ (1188.7 ± 62.50), $A^{1\%}_{\text{gallic acid}}$ (970.8 ± 31.46) และ $A^{1\%}_{\text{tannic acid}}$ (830 ± 39.29) เนื่องจาก pyrogallol มีโครงสร้างเป็น 1 aromatic ring และ 3 hydroxyl groups ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมีจำนวนของ hydroxyl group ต่อน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าสารชนิดอื่น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ (1) gallic acid ($C_7H_6O_5$), (2) catechin ($C_{15}H_{14}O_6$), (3) pyrogallol ($C_6H_6O_3$) และ tannic acid ($C_{76}H_{52}O_{46}$)

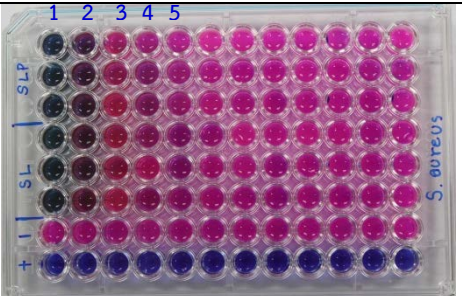
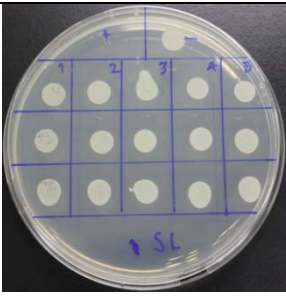
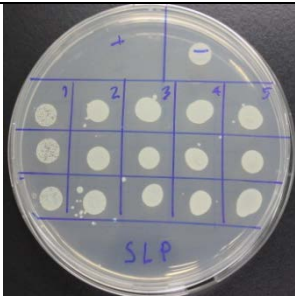
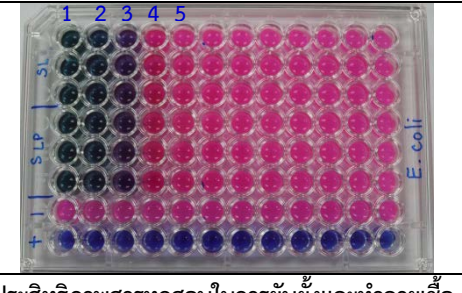
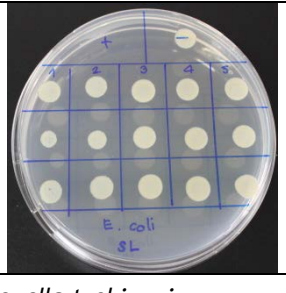
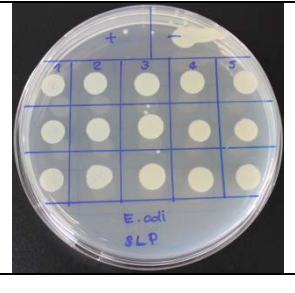
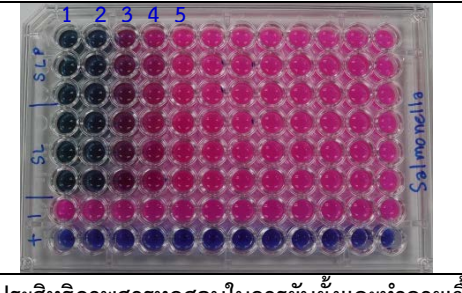
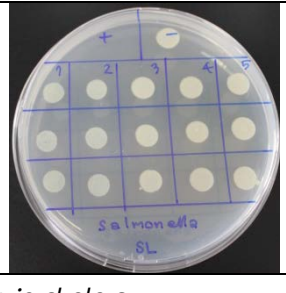
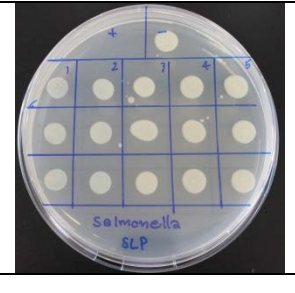
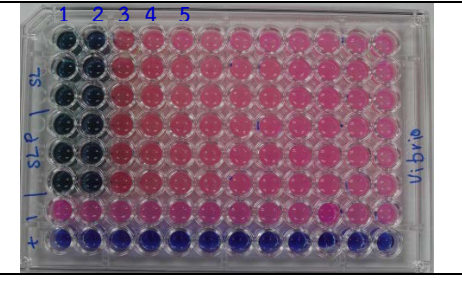
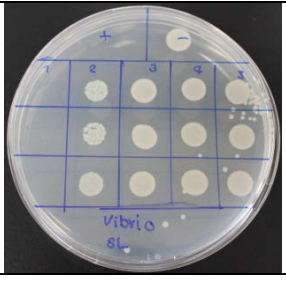
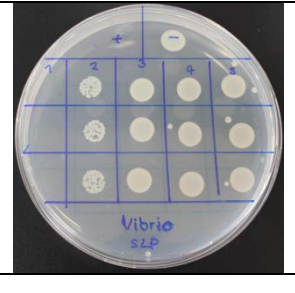
ที่มา: Blainski *et al.*, (2013)

1.2 คุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) และ สมบัติในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดจากใบอ้อยที่ตัดขนาด 1 cm และ ใบอ้อยที่ผ่าน sieve ขนาด 0.2 mm ของเครื่อง hammer mill ดังแสดงในตารางที่ 4

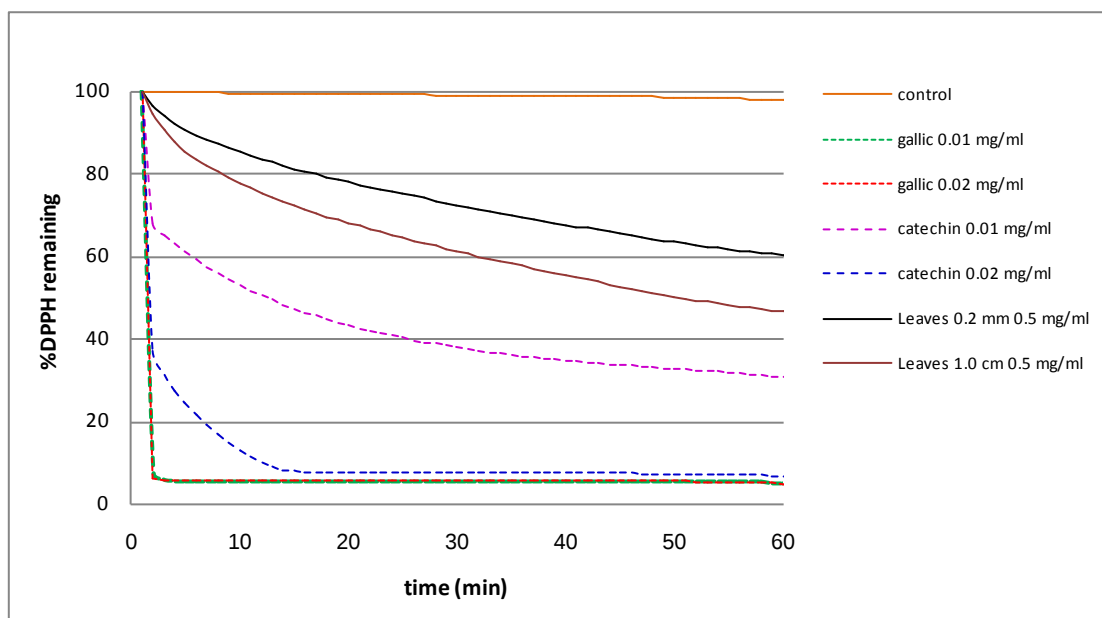
ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด Polyphenols จากใบอ้อยทั้งสองขนาดที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Vibrio cholera* (DMST 15778), *Salmonella typhimurium* (DMST 562) และ *Escherichia coli* (DMST 4212)) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* (DMST 8840)) อย่างไรก็ตามในระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารทั้ง 2 ชนิดที่ทดสอบคือ 2,500 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถที่จะทำลายเชื้อได้ทั้งหมด จากงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด polyphenols จากพืชชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อรายงานว่าการยับยั้งของสารจากการคำนวณค่า MIC โดยเฉลี่ยจะเป็นครึ่งหนึ่งหรือเท่ากับค่า MBC แต่ทั้งนี้อาจแตกต่างกันไปตามโครงสร้างของสารทางเคมีของสารสกัดเช่น จำนวนและตำแหน่งของ hydroxyl group และน้ำตาลในโครงสร้างโดยโครงสร้างที่ไม่มีน้ำตาล (Aglycones) มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อมากกว่าโครงสร้างที่มีน้ำตาล (Glycosides) เช่น การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในช่องปาก 4 สายพันธุ์ พบว่าสาร polyphenols ที่นำมาทดสอบ (Kaempferol-3-glucoronoids, epicatechin, malvin, theaflavin, procyanidin, curcumin, pyrogallol, pyrocatechol, apigenin และ diadzein) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเช่นกัน ค่า MBC ของสารแต่ละชนิดอยู่ที่ 2 - 3 เท่าของค่า MIC (MIC ตั้งแต่ 7.8 - 1250 $\mu\text{g/ml}$) (M. Shahzad, G. Ramage *et al.* 2013)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด polyphenols จากใบอ้อยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration)

1. ประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i>		
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	
	ใบอ้อยตัด (1 cm.)	ใบอ้อยบด (0.2 mm.)
		
2. ประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ <i>Escherichia coli</i>		
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	
	ใบอ้อยตัด (1 cm.)	ใบอ้อยบด (0.2 mm.)
		
3. ประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ <i>Salmonella typhimurium</i>		
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	
	ใบอ้อยตัด (1 cm.)	ใบอ้อยบด (0.2 mm.)
		
4. ประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ <i>Vibrio cholera</i>		
Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	Minimum Bactericidal Concentration (MBC)	
	ใบอ้อยตัด (1 cm.)	ใบอ้อยบด (0.2 mm.)
		

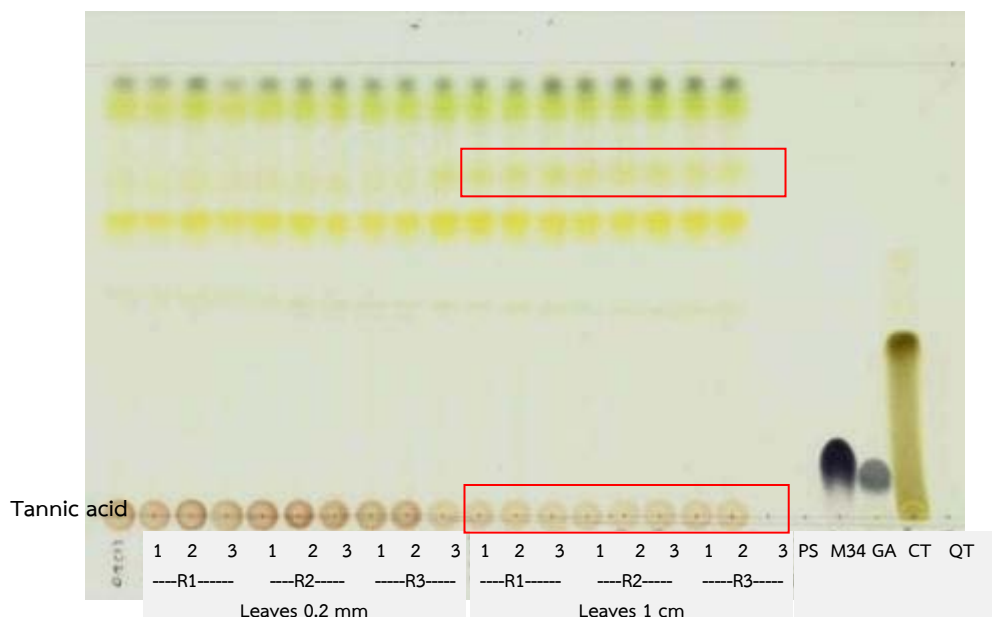
1.3 คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของ crude extracts ที่ได้จากใบอ้อยขนาด 0.2 mm และขนาด 1 cm ความเข้มข้น 0.5 mg/ml โดยใช้สารมาตรฐาน gallic acid และ catechin ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/ml เป็นสารเปรียบเทียบ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 % DPPH_{remaining} ของ crude extract จากใบอ้อยขนาด 0.2 mm และ 1 cm ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ catechin ความเข้มข้น 0.01 และ 0.02 mg/ml

จากผลการทดลองพบว่า crude extract มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า %DDPH_{remaining} กับสารมาตรฐานบริสุทธิ์ (gallic acid และ catechin) พบว่า crude extract มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานประมาณ 50 - 100 เท่า อย่างไรก็ตามสารสกัดที่ได้ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หากเทียบจาก % TPC (gallic acid) และ % TFC (catechin) โดยน้ำหนัก crude extract ซึ่งมีค่าประมาณ 3.5 - 4.2% และ 0.8% ตามลำดับจะพบว่าความเข้มข้นของ crude extract ที่ 0.5 mg/ml ที่ใช้ทดสอบจะมี gallic acid และ catechin อยู่ประมาณ 0.02 mg และ 0.004 mg ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แต่ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าอาจเนื่องมาจากสารอื่นที่อยู่ใน crude extract โดยเมื่อเปรียบเทียบ %DDPH_{remaining} ของ crude extract ที่ได้จากการสกัดใบอ้อยคนละขนาดพบว่าใบอ้อยขนาด 1 cm ที่ให้ผลการสกัดและ %TPC (gallic acid) ที่น้อยกว่ากลับมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของสารสกัดจากสองตัวอย่างด้วย TLC พบว่าชนิดของสารที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อยคนละขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) โดยการสกัดใบขนาด 0.2 mm ได้ปริมาณ tannic acid มากกว่า ซึ่งเป็นกลุ่ม hydrolysable tannin เช่นเดียวกับ gallic acid ในขณะที่ใบขนาด 1 cm ให้สารสกัด polyphenols ที่มีสีเหลืองซึ่งอาจเป็นกลุ่ม cinnamic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid (Sharma, Bhat et al. 1998)



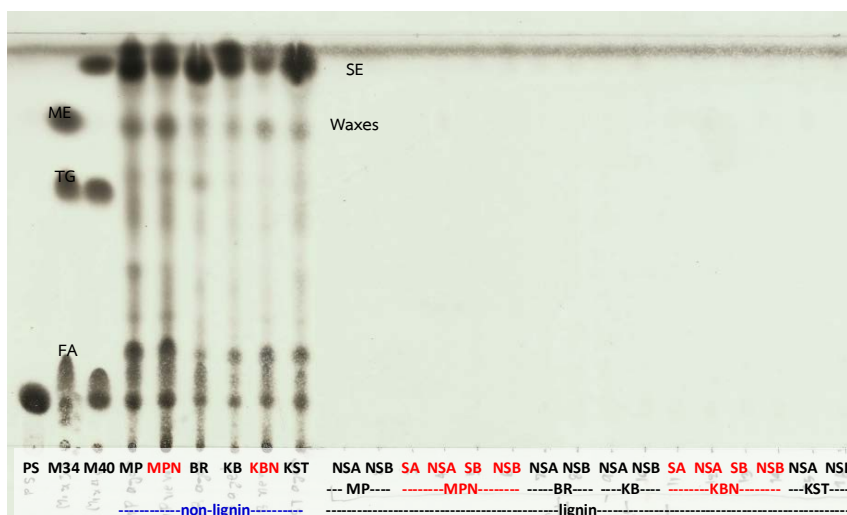
ภาพที่ 6 TLC ของสารสกัดจากตัวอย่างใบอ้อยขนาด 0.2 mm และ 1 cm ใน mobile phase (chloroform/ ethyl acetate/ acetic acid (50:50:1, v/v/v)) ตรวจสอบผลด้วย ferric chloride reagent 1% (w/v) โดยสาร polyphenols จะปรากฏสีม่วงน้ำเงิน สีน้ำเงินเขียว และสีเหลือง (PS; plant sterol, M34; standard mixture, GA; gallic acid, CT; catechin, QT; quercetin)

2. Polyphenols จากกากอ้อย

2.1 Non-lignin polyphenols

ทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณของสารประกอบ polyphenols รวมถึง plant lipids ชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์พืชนอกเหนือไปจาก lignin ที่อยู่ในโครงสร้างของกากอ้อย โดยใช้ hexane ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารกลุ่ม plant lipids สกัดกากอ้อย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบด้วย TLC เปรียบเทียบกับตัวอย่าง lignin ที่ได้หลังจากการสกัด (ภาพที่ 7)

ผลจาก TLC พบว่าในตัวอย่างกากอ้อยก่อนนำไปสกัด lignin ยังมีสารประเภท plant sterols, free fatty acid, waxes และ sterol esters ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์พืชส่วนใหญ่ตกค้างจากกระบวนการผลิต ซึ่งปริมาณที่พบในตัวอย่างกากอ้อยจาก 4 โรงงานแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากพันธุ์และอายุของอ้อย กระบวนการเก็บเกี่ยวรวมถึงสภาพแวดล้อมในการเก็บกากอ้อยของแต่ละโรงงาน



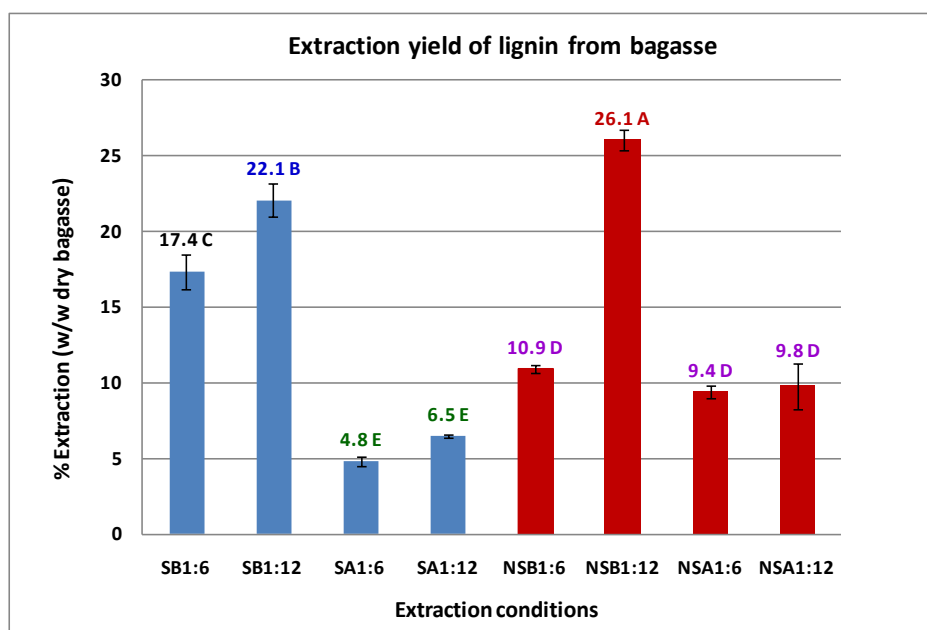
ภาพที่ 7 TLC ของสารสกัด non-lignin และ lignin จากตัวอย่างกากอ้อยเก่าและใหม่ (N) จากโรงงานน้ำตาล 4 โรง (MP: มิตรผล, BR: บ้านไร่, KB: ครบุรี และ KST: เกษตรไทย) ในสภาวะต่าง ๆ ใน mobile phase (hexane/ diethyl ether/ acetic acid (80:20:1, v/v/v)) ตรวจสอบผลโดยพ่นด้วยสารละลาย saturated copper acetate ใน 40% ortho phosphoric acid (1:1, v/v) อบที่ 180 °C นาน 10 นาที (PS; plant sterol, M34; standard mixture, FA; free fatty acid, TG; triacylglycerols, ME; methyl ester, Waxes; wax esters และ SE; sterol ester)

อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านกระบวนการสกัด lignin ไม่ว่าจะจากสภาวะการใช้กรดหรือด่างหรือการทำ steam explosion ไม่พบว่ามีสารกลุ่มนี้ตกค้างอยู่ ส่วนหนึ่งอาจมาจากปริมาณของสารกลุ่มนี้มีอยู่ในกากอ้อยเริ่มต้นเพียง 0.03 - 0.25 % (โดยน้ำหนัก) และสภาวะที่ใช้ในการสกัดอาจทำลายโครงสร้างของสารทำให้ไม่พบในตัวอย่าง lignin

2.2 Lignin

ในการสกัด polyphenols จากกากอ้อยวัตถุดิบหลักคือเพื่อสกัดเอา lignin ซึ่งเป็น macro polyphenols ที่มีอยู่มากใน lignocellulosic material ออกมาใช้ประโยชน์ ในงานที่เกี่ยวข้องกับการนำ cellulose จากพืชมาใช้ประโยชน์ เช่น อุตสาหกรรมเยื่อ โดยส่วนใหญ่ มักกำจัด lignin ออกโดยการใชสภาวะที่รุนแรง เช่น ด่างและอุณหภูมิสูง เพื่อแยกส่วนของ lignin ที่ทำหน้าที่เหมือนตัวประสานระหว่างโครงสร้างที่เป็น cellulose ของเนื้อเยื่อพืชออก ในการทดลองนี้ได้นำกากอ้อยอายุประมาณ 6 เดือน ความชื้นประมาณ 50% มาทำการสกัด lignin โดยเปรียบเทียบผลได้จากการใช้ปัจจัยในการสกัดดังนี้

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



ภาพที่ 8 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อย (%yield, w/w กากอ้อย) ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ

จากการเปรียบเทียบผลได้ของการสกัด lignin จากกากอ้อยระหว่างการใช้และไม่ใช้ steam explosion ในการเปิดโครงสร้างของตัวอย่างกากอ้อย (ภาพที่ 8) พบว่าการใช้สภาวะที่เป็นกรดในการสกัดให้ผลได้ต่ำกว่าการใช้ต่างประมาณ 2 - 4 เท่าไม่ว่าจะทำการ pretreatment กากอ้อยด้วย steam explosion หรือไม่

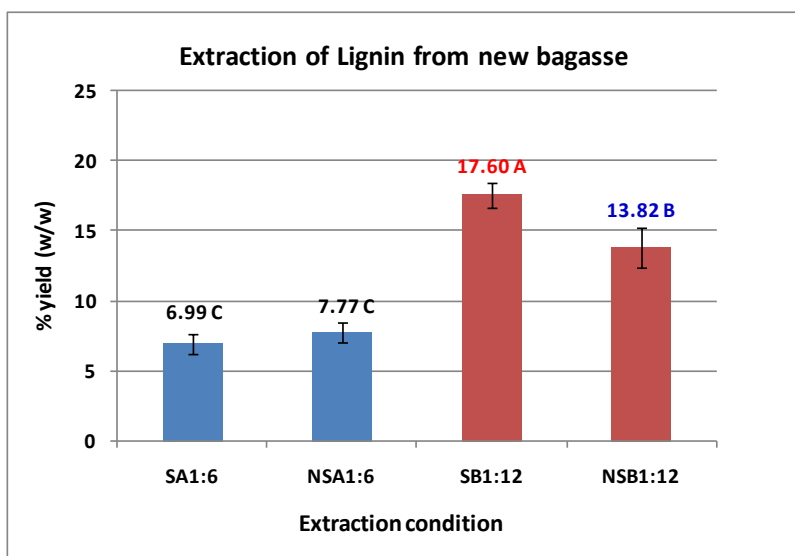
ในการใช้ต่างเมื่อเปรียบเทียบผลของการ pretreatment พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญในกรณีที่ใช้อัตราส่วน solid: liquid เท่ากับ 1:6 (SB1:6 และ NSB1:6) แต่เมื่อใช้อัตราส่วน 1:12 (SB1:12 และ NSB1:12) พบว่าไม่มีความจำเป็นต้องนำกากอ้อยมาผ่านกระบวนการ steam explosion

ในกรณีของการใช้กรด การเพิ่มอัตราส่วนของ solid: liquid จาก 1:6 เป็น 1:12 ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ดังนั้นเมื่อพิจารณาในแง่การเลือกกระบวนการสกัด สภาวะที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการ steam explosion และใช้อัตราส่วนของกากอ้อย : 1% NaOH เท่ากับ 1:12 เป็นวิธีง่ายและให้ผลได้การสกัดที่สูง

2.3 Lignin จากกากอ้อยเก่าและใหม่

จากอัตราส่วนของ solid: liquid ที่ได้จากการทดลองสกัด lignin ด้วยกรดและด่างข้างต้น ได้ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สภาวะดังกล่าวในตัวอย่างกากอ้อยที่ได้จากการหีบใหม่เพื่อเปรียบเทียบผลของการทำ steam explosion ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ผลการสกัด (ภาพที่ 9) พบว่าเมื่อสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ ร่วมกับการใช้กรดให้ผลการสกัดไม่แตกต่างกันคือ ประมาณ 7% ในขณะที่พบว่าหากใช้ต่างในการสกัดการทำ steam explosion เพิ่มผลได้จากการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ คือจาก 13.8% เป็น 17.6% อย่างไรก็ตาม ผลได้การสกัดจากกากอ้อยเก่ามีค่ามากกว่าการสกัดจากกากอ้อยใหม่อันเนื่องมาจากความแข็งแรงของโครงสร้างที่

น้อยกว่าดังกล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นการพิจารณาใช้กากอ้อยเก่าในการนำมาสกัด lignin จะลดขั้นตอนในการสกัดได้



ภาพที่ 9 ผลได้การสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่ (% yield, w/w กากอ้อย) ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ

อย่างไรก็ตาม crude lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ มีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 10) จากงานวิจัยที่ศึกษาการสกัด lignin จากพืชชนิดอื่น เช่น กิ่งก้านของต้นแอปเปิ้ล และกิ่งก้านของต้นมะกอกโดยใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน เช่น การทำ autohydrolysis pretreatment การใช้ด่าง หรือการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หรือ organosolv จะส่งผลต่อขนาดและคุณภาพของ lignin ที่ได้ โดยการใช้ด่างพบว่า จะได้ lignin ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กกว่าที่ได้จากการใช้กรดหรือตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากเกิดการ oxidation โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ แต่ขณะเดียวกันการใช้ด่างพบว่ามีารปนเปื้อนของน้ำตาลมากที่สุด โดยชนิดของน้ำตาลที่พบเป็นหลักคือ xylose เนื่องจากเป็น hemicellulosic sugar

ตัวอย่าง lignin ที่ได้จากการสกัดจากกากอ้อยทั้ง 4 สภาวะนี้จะนำไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (antimicrobial และ antioxidant activity) รวมทั้งวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ เพื่อเลือกชนิดที่เหมาะสมในการทดลองขึ้นรูปเป็น nanofiber ต่อไป



Acid



Steam Acid



Alkali



Steam Alkali

ภาพที่ 10 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง lignin จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ

2.4 โครงสร้างทางเคมีของ lignin

เนื่องจาก lignin เป็นสารสกัดที่มีโครงสร้างและสมบัติทางเคมีหลากหลายตามวิธีการสกัดและชนิดของพืช ในการตรวจสอบเชิงคุณภาพและปริมาณของ lignin ที่ได้จากการสกัดกากอ้อยด้วยสภาวะต่าง ๆ จะได้เปรียบเทียบกับ lignin ที่มีทางการค้า ได้แก่ Kraft lignin ซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นเดียวกับ lignin ที่ได้จากกากอ้อย นอกจากนี้การแยก lignin จาก black liquor ในกระบวนการ Kraft pulping ยังใช้วิธีการตกตะกอนด้วยกรด (acid washing) เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ในขณะที่ lignosulfonates ซึ่งเป็น lignin เชิงการค้าอีกชนิดที่ได้จาก liquid waste ในอุตสาหกรรมที่ผลิตเยื่อด้วยวิธี sulfite pulping จะแยก lignin โดยวิธีการเติมต่างมากเกินพอจนได้สารประกอบ lignin ในรูปเกลือของ Ca, Na และ Mg ซึ่งจะสามารถละลายน้ำได้

▪ ปริมาณ total phenolic content (TPC)

ปริมาณ total phenolic content (TPC) ของสารสกัด lignin ตรวจสอบโดยวิธี Folin - Ciocalteu test เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ Kraft lignin (ตารางที่ 5) ผลพบว่าในสารสกัด lignin ที่ได้จากกากอ้อยใหม่ผ่าน steam explosion และสกัดด้วย 1%NaOH (SB 1:12) ให้ค่า total phenolic content (w/w lignin) สูงที่สุดทั้งในรูปที่เทียบเท่ากับ mg gallic acid (22.7%) และ mg Kraft lignin (76.6%) ในขณะที่ตัวอย่างกากอ้อยทั้งเก่าและใหม่ผ่าน steam explosion (NSB 1:12) ให้ค่า % TPC_{kraft} และค่า % TPC_{gallic} (w/w lignin) ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ค่า % TPC_{kraft} และค่า % TPC_{gallic} (w/w lignin) จาก NSB 1:12 มีค่าต่ำกว่าจากกากอ้อยใหม่ที่ใช้ steam explosion ร่วมกับกรด (SA 1:6) (% TPC_{kraft} 64.8% และ % TPC_{gallic} 18.8%) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักกากอ้อยเริ่มต้น (% w/w bagasse) พบว่ากากอ้อยเก่าที่ใช้ต่าง (NSB 1:12) ให้ค่า % TPC_{kraft} และค่า % TPC_{gallic} (w/w bagasse) สูงกว่า

ตารางที่ 5 Total phenolic content (%TPC) ในรูปของ gallic acid และ Kraft lignin

ตัวอย่าง		% TPC _{kraft}	% TPC _{kraft}	% TPC _{gallic}	% TPC _{gallic}
อายุกากอ้อย	สภาวะการสกัด	(w/w lignin)	(w/w bagasse)	(w/w lignin)	(w/w bagasse)
เก่า	NSA 1:6	43.0 ^d ± 1.15	4.15 ^e ± 0.11	12.7 ^d ± 0.32	1.22 ^e ± 0.03
	NSB 1:12	48.2 ^c ± 0.30	10.1 ^b ± 0.06	14.1 ^c ± 0.08	2.96 ^b ± 0.02
ใหม่	SA 1:6	64.8 ^b ± 1.01	4.84 ^d ± 0.08	18.8 ^b ± 0.34	1.40 ^d ± 0.02
	NSA 1:6	37.0 ^e ± 1.22	3.03 ^f ± 0.10	10.9 ^e ± 0.11	0.90 ^f ± 0.03
	SB 1:12	76.6 ^a ± 1.50	13.0 ^a ± 0.25	22.7 ^a ± 0.28	3.85 ^a ± 0.07
	NSB 1:12	50.1 ^c ± 0.41	6.35 ^c ± 0.05	14.6 ^c ± 0.42	1.86 ^c ± 0.01

: ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ± Standard deviation (SD)

: ตัวอักษรเดียวกันในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ย (student t test, $P \leq 0.05$)

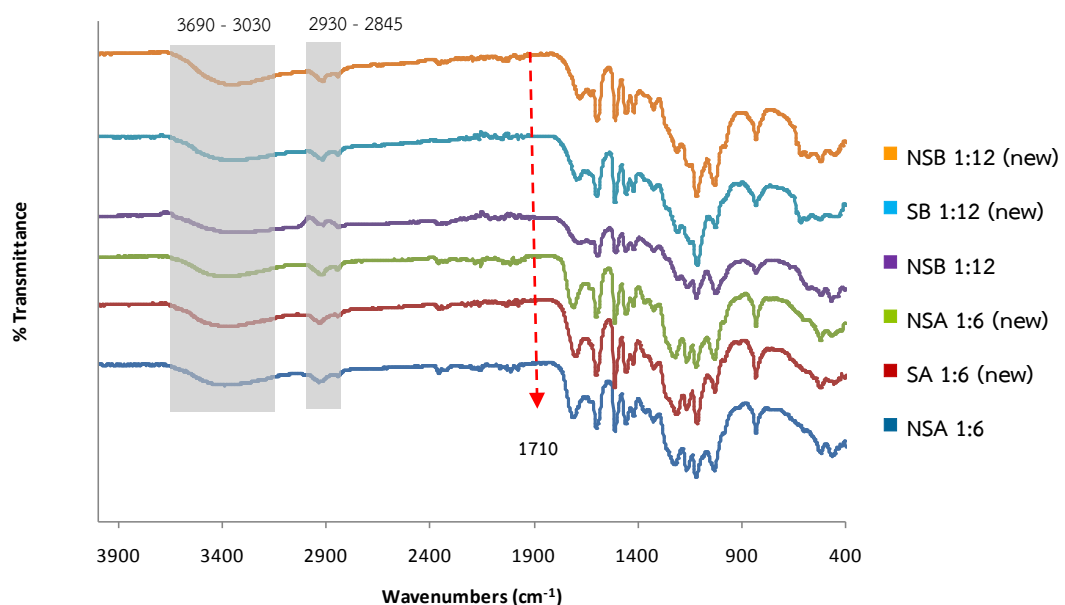
จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบเชิงคุณภาพกากอ้อยใหม่ที่ได้จากการหีบและนำมาสกัด lignin ที่ระยะเวลาไม่เกิน 1 เดือนหลังการเก็บตัวอย่าง ยังคงมีปริมาณ phenolic group มากกว่ากากอ้อยเก่า ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะการเก็บรักษากากอ้อยเก่าที่เป็นสภาพกลางแจ้งภายนอกอาคาร อาจ

ทำให้เกิดการ oxidize ของ phenolic compound ได้ง่าย แต่ในเชิงปริมาณการใช้ 1%NaOH ยังให้ทั้งผลได้ การสกัดและ %TPC ดีที่สุดจากตัวอย่างกากอ้อยทั้งสองแบบ

▪ ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค FT-IR

เมื่อนำ lignin จากทั้ง 6 สภาวะการสกัดมาวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ATR-FTIR (ภาพที่ 11) ตรวจพบสัญญาณที่ wave number 3030-3690 cm^{-1} (ตารางที่ 6) ซึ่งตรงกับการสั่นสะเทือนที่เกิดจาก O-H stretching ของทั้งโครงสร้างแบบ aliphatic และ aromatic

ที่ wave number 2930 - 2845 cm^{-1} ตรงกับ C-H stretching ในโครงสร้าง methoxyl groups, methyl และ methylene groups ของ side chains นอกจากนี้ยังพบว่ามีสัญญาณที่ wave number 1595, 1515 และ 1425 cm^{-1} ซึ่งพบโดยทั่วไปในสารประกอบ aromatic รวมทั้ง lignin ในทุกตัวอย่าง (Zabaleta 2012)



ภาพที่ 11 ATR-FTIR spectrum จากตัวอย่างกากอ้อยเก่าและใหม่ (new) จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ

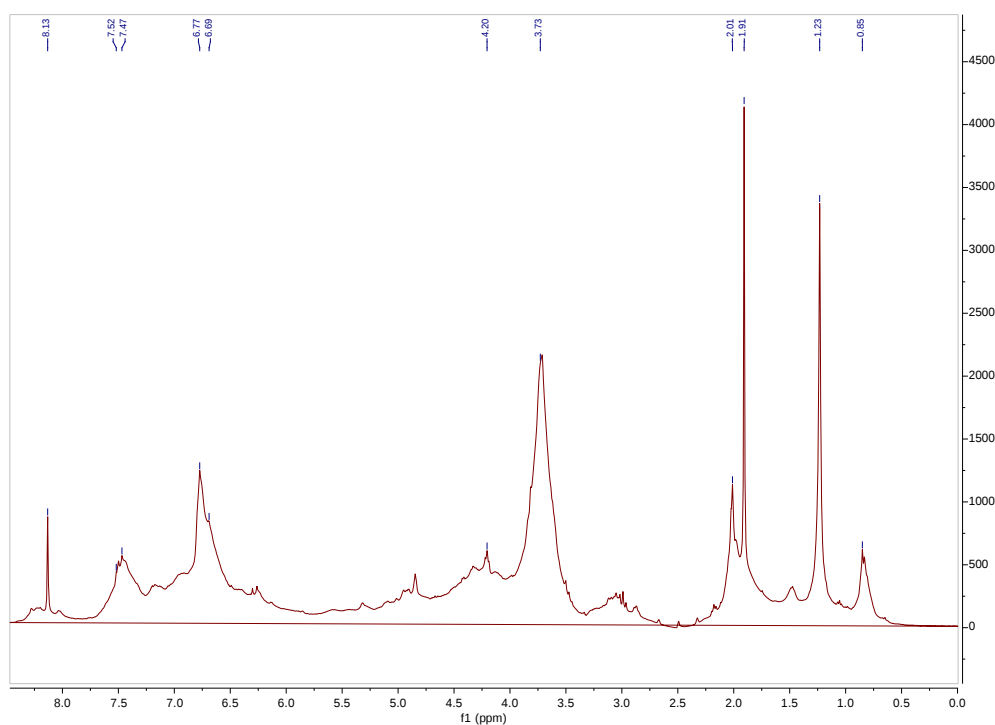
ผลจากการวิเคราะห์ FTIR พบว่าสารสกัดที่ได้จากกากอ้อยของทุกสภาวะการสกัดตรงกับโครงสร้างของ lignin เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยเมื่อเปรียบเทียบ FTIR spectrum จากแต่ละสภาวะการสกัดพบว่าสัญญาณที่ wave number 1710 cm^{-1} ซึ่งตรงกับ C=O bond stretching ในโครงสร้าง unconjugated ketones, carbonyl และ ester groups พบในสภาวะการสกัดด้วยกรดมากกว่าในสภาวะการสกัดด้วยด่าง

ตารางที่ 6 Functional groups จาก wave number ต่าง ๆ ของตัวอย่าง lignin จากกากอ้อยเก่าและใหม่

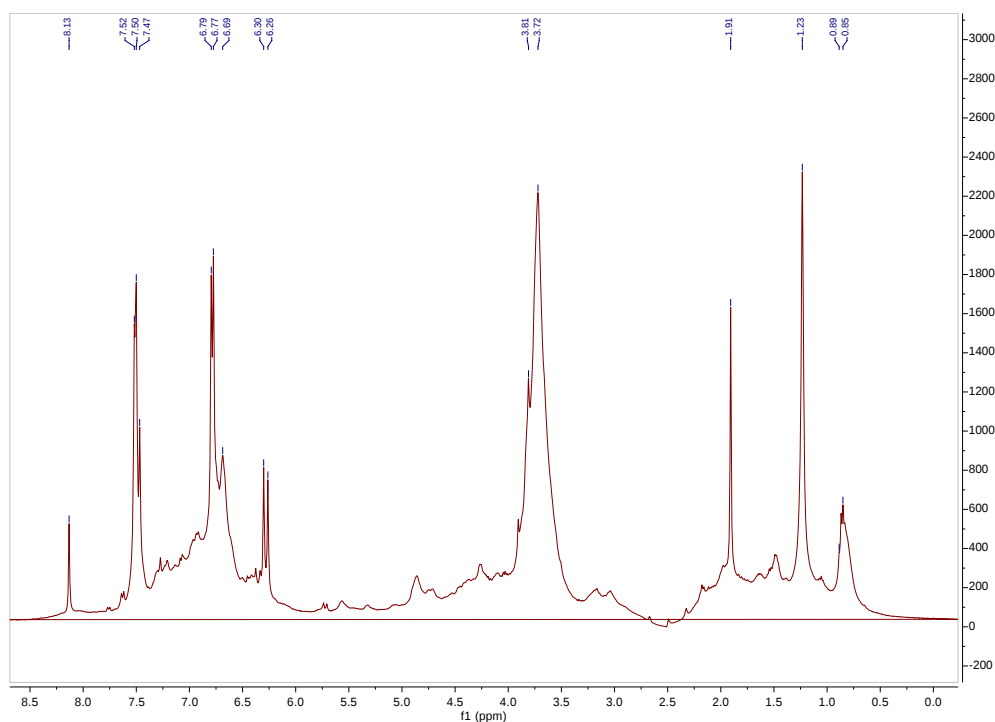
Wave numbers (cm ⁻¹)	Functional groups
3030-3690	OH stretching vibrations and hydrogen bonding in phenolic and aliphatic structure
2845-2930	C-H stretching in aromatic methoxyl groups and in methyl or methylene groups of side chains
1710	C=O bond stretching Unconjugated ketone, carboxyl, ester group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

▪ ผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ¹H-NMR

¹H-NMR spectrum ของสารสกัด lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดด้วยต่าง (NSB 1:12) และกรด (NSA 1:6) ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13



ภาพที่ 12 ¹H-NMR spectrum ของ lignin จากกากอ้อยที่สกัดด้วยต่างที่ไม่ผ่าน steam explosion (NSB 1:12)



ภาพที่ 13 ^1H NMR spectrum ของ lignin จากกากอ้อยที่สกัดด้วยกรดที่ไม่ผ่าน steam explosion (NSA 1:6)

จากค่า proton chemical shift (ตารางที่ 7) สามารถยืนยันโครงสร้างของ lignin ได้จากทั้งสภาวะการสกัดด้วยต่างและกรด

ตารางที่ 7 Proton chemical shift (δ , ppm) ของ lignin จากกากอ้อยจากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR

ตัวอย่าง	δ (ppm)	Assignments
NSB 1:12	8.00 - 6.00	Aromatic proton in guaiacyl (G) and syringyl (S) unit in lignin
	6.80	Aromatic proton in guaiacyl (G) unit in lignin
	6.71	Aromatic proton in syringyl (S) unit in lignin
	3.73, 3.36	Methoxyl proton
	1.51 - 0.86	Aliphatic moiety in the lignin fraction
NSA 1:12	7.3 - 7.4	Aromatic proton in position 2 and 6 in structure contain $\text{C}_\alpha=\text{O}$ group - <i>p</i> -hydroxyphenyl (H) units conjugated with double bond - proton in $\text{C}_\alpha=\text{C}_\beta$ structure - aromatic proton in <i>p</i> -coumaric and fururic acid
	6.80	Aromatic proton in guaiacyl propane
	6.20	Aromatic proton in syringyl propane
	3.70	Methoxyl proton ($-\text{OCH}_3$)
	2.0 - 0.8	Proton in aliphatic group - side chain of lignin - acetyl group in xylans

จากการวิเคราะห์พบความแตกต่างของ signal intensity ที่ 8.00 - 6.00 ppm ของ NSB และ 7.3 - 7.4 ppm ของ NSA ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของ aromatic proton ใน guaiacyl (G) และ syringyl (S) unit ของ lignin และ aromatic proton โครงสร้าง *p*-hydroxyphenyl (H) units ตามลำดับ ซึ่งโครงสร้างของ lignin จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะประกอบด้วยสาม unit หลักดังกล่าวอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามความแตกต่างของอัตราส่วนของ unit ที่ตรวจพบอาจเนื่องมาจากการทำลายพันธะ C - C และ C - O - C แบบสุ่มซึ่งส่งผลต่อโครงสร้างและสมบัติทางเคมีของ lignin (Delmas 2011)

2.5 คุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่าง lignin ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดและด่างจากกากอ้อยเก่าและใหม่จากโรงงานน้ำตาล 4 แห่งที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกากอ้อย ดังแสดงในตารางที่ 8 และผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด lignin ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration) ดังแนบในภาคผนวก

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัด lignin จากกากอ้อยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration)

ตัวอย่าง	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>V. cholera</i>	
	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
MP-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
MP-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
MPN-SA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
MPN-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500
MPN-SB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
MPN-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
BR-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500
BR-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KB-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500
KB-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KBN-SA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KBN-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KBN-SB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KBN-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KST-NSA 1:6	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500
KST-NSB 1:12	2,500	>2,500	1,250	>2,500	1,250	>2,500	1,250	2,500

: ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

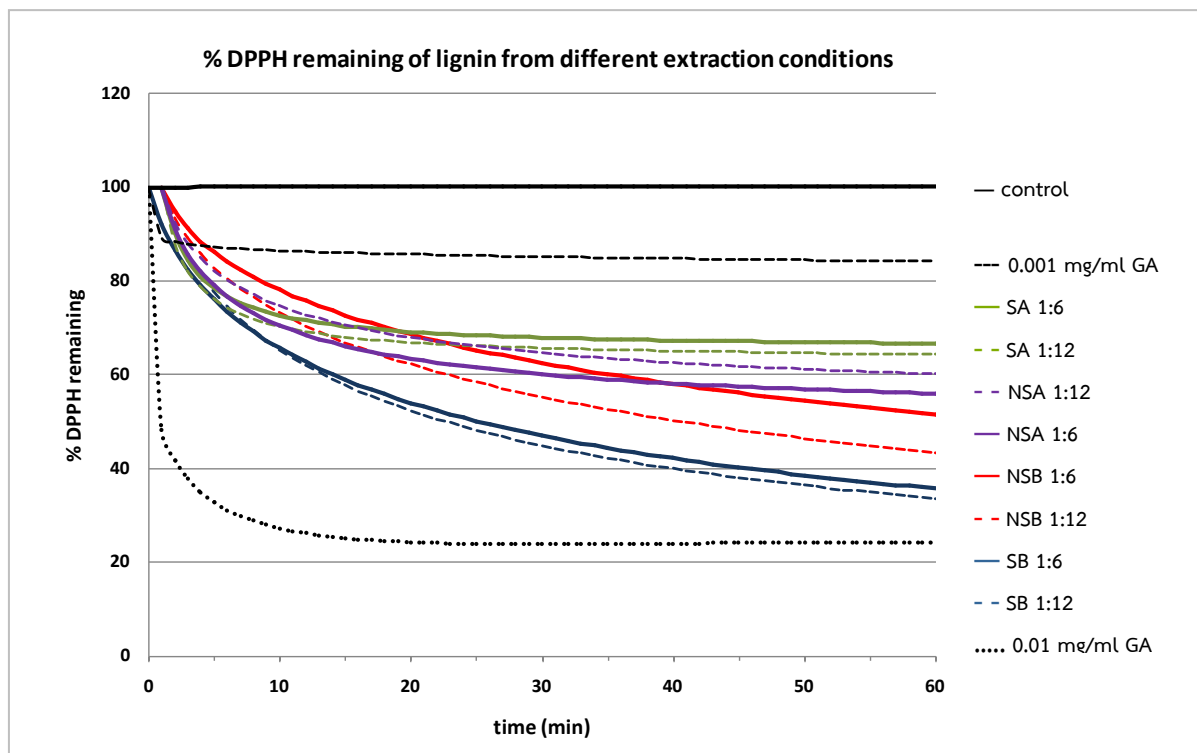
: กากอ้อยเก่า, MP: โรงงานน้ำตาลมิตรผล, KB: โรงงานน้ำตาลครบุรี, BR: โรงงานน้ำตาลบ้านไร่, KST: โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย

: กากอ้อยใหม่, MPN: โรงงานน้ำตาลมิตรผล, KBN: โรงงานน้ำตาลครบุรี

จากค่า MIC และ MBC จากตัวอย่างทั้งหมดให้ผลไปในทางเดียวกันกับสารสกัด polyphenols ที่ได้จากใบอ้อยดังอธิบายผลข้างต้น โดยที่ความเข้มข้น 1250 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ที่ความเข้มข้น 2500 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ ทั้งนี้ความเข้มข้นสูงสุดที่เตรียมได้สำหรับการทดสอบ MIC มีข้อจำกัดเรื่องความสามารถในการละลายของ lignin ใน DMSO ซึ่งไม่สามารถละลายได้สมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้นสูงกว่า 2.5 mg/ml จึงไม่สามารถทราบค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ MBC ได้ อย่างไรก็ตาม การละลายได้ของ lignin ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิด และ พันธุ์พืช สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตไปจนถึงสภาวะที่ใช้ในการสกัด ซึ่งโดยส่วนใหญ่การทำ delignification ในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นกรด ต่าง สารละลาย หรือตัวทำละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของ lignin โดยตรง ได้แก่ molar mass ความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา การเกิด crosslinking และความหนาแน่น ไปจนถึงสมบัติทางชีวภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับ lignin ที่ได้จากกากอ้อยในการทดลองนี้กับงานวิจัยที่ทดลองสกัด lignin จากเศษตอซังข้าวโพดด้วยสภาวะการสกัดใกล้เคียงกัน (4% NaOH, 95 °C นาน 120 นาที) พบว่า lignin ที่ได้จากเศษตอซังข้าวโพดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 1,250 $\mu\text{g/ml}$ (MIC) และให้ค่า MBC เท่ากับ 3,125 $\mu\text{g/ml}$ (Donga, Donga et al. 2011) ในขณะที่ lignin จากกากอ้อยที่ความเข้มข้นมากกว่าสองเท่า (2,500 $\mu\text{g/ml}$) ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (1,250 $\mu\text{g/ml}$)

2.6 คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัด lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ 0.01 และ 0.001 mg/ml ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 % DPPH_{remaining} ของสารสกัด lignin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากสภาวะการสกัดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 mg/ml

เมื่อพิจารณาจากค่า % DPPH_{remaining} พบว่าสารสกัด lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดด้วยกรดให้ค่า %DPPH_{remaining} ที่ 60 นาทีของการวัดสูงกว่าทุกตัวอย่างที่ใช้ต่างในการสกัด (55.9 - 66.6% ต่อ 33.4-51.2%) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า ทั้งในตัวอย่างที่ใช้ solid: liquid ratio เท่ากับ 1:6 และ 1:12

เปรียบเทียบตัวอย่าง lignin ที่ได้จากสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดที่ไม่ใช่ steam explosion (NSB 1:12) และใช้ steam explosion พบว่ามีค่า % DPPH_{remaining} ต่ำกว่าตัวอย่างที่ผ่านการทำ steam explosion (SB 1:12) คือ 43.0% และ 33.4% ตามลำดับ ความแตกต่างนี้ส่วนหนึ่งอาจมาจากความแตกต่างกันของปริมาณ total phenolic content (%TPC) ซึ่งมากกว่าในตัวอย่าง SB 1:12 อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าที่ 60 นาที ค่า % DPPH_{remaining} ของตัวอย่างทั้ง SB 1:12 และ NSB 1:12 ยังคงมีแนวโน้มลดลงและอาจต่อเนื่องต่อไปซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยกรดซึ่งมีค่า % DPPH_{remaining} คงที่ที่นาทีที่ 60 เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน gallic acid โดยความแตกต่างของลักษณะการเกิดปฏิกิริยากับ DPPH อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสารสกัด lignin ที่ได้จากแต่ละสภาวะ ซึ่งในงานวิจัยของ Li and Ge (2012) ที่ทดลองเปรียบเทียบคุณสมบัติของ lignin ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย Fenton reagent ซึ่งใช้หลักการวัด hydroxyl radical scavenging activity เช่นเดียวกันกับ DPPH พบว่า lignin ที่ได้จากการสกัดด้วย 10%NaOH มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า lignin ที่สกัดด้วย ethanol ประมาณสองเท่าเนื่องมาจากปริมาณ phenolic hydroxyl และ methoxyl group ที่สูงกว่า นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลและความทนต่ออนุมูลสูงของ lignin จากการสกัดด้วยด่างก็สูงกว่าซึ่งเป็นผลจากการสกัด

นอกจากนี้งานวิจัยของ Ugartondo *et al.* (2008) ซึ่งศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษของ lignin ประเภทต่าง ๆ (กากอ้อย, lignosulfonate, Kraft lignin และ steam explosion lignin) ต่อเซลล์กล่าวว่า lignin จากกากอ้อยมีสมบัติในการยับยั้งการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดง (in vitro AAPH-induced red blood cell haemolysis) ดีที่สุด โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มตามความเข้มข้นของ lignin ที่ทดสอบ (12.5 - 200 $\mu\text{g/ml}$) โดยค่า IC₆₀ ของ lignin จากกากอ้อยที่ทดสอบ (40 $\mu\text{g/ml}$) ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จาก (-) epicatechin (42.3 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งเป็น polyphenols ในกลุ่ม flavonoid ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในองุ่นและชา กล่าวได้ว่า lignin จากกากอ้อยมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

2.7 ค่าพลังงานความร้อน

เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการสกัด lignin จากกากอ้อยคือเพื่อแยกเอาสารที่มีมูลค่าสูงออกก่อนนำกากอ้อยไปใช้ในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงตามปกติ จึงได้ตรวจสอบค่าพลังงานความร้อนจากกากอ้อยก่อนและหลังการสกัดเอา lignin ออก ตามวิธีการ ASTM D5865 ผลดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าพลังงานความร้อนจากกากอ้อยของตัวอย่างจากโรงงาน 4 แห่งก่อนและหลังการสกัด lignin

ที่มา	ตัวอย่าง	สถานะการสกัด	% moisture	energy power (cal/g)	energy power (watt-hour)
โรงงานน้ำตาลมิตรผล	กากอ้อยใหม่	ก่อนสกัด	4.1	4268	4.96
		SA 1:6	5.5	4180	4.86
		NSA 1:6	5.7	4045	4.70
		SB 1:12	8.4	3693	4.29
		NSB 1:12	9.9	3663	4.26
	กากอ้อยเก่า	ก่อนสกัด	4.7	4129	4.80
		NSA 1:6	6.5	3744	4.35
		NSB 1:12	10.6	3350	3.90
โรงงานน้ำตาลนครบุรี	กากอ้อยใหม่	ก่อนสกัด	3.6	4287	4.99
		SA 1:6	7.3	4256	4.95
		NSA 1:6	9.0	3948	4.59
		SB 1:12	11.2	3629	4.22
		NSB 1:12	14.0	3535	4.11
	กากอ้อยเก่า	ก่อนสกัด	3.8	4169	4.85
		NSA 1:6	6.0	3238	3.77
		NSB 1:12	10.0	3214	3.74
โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย	กากอ้อยเก่า	ก่อนสกัด	6.2	4120	4.79
		NSA 1:6	6.0	3979	4.63
		NSB 1:12	9.0	3674	4.27
โรงงานน้ำตาลบ้านไร่	กากอ้อยเก่า	ก่อนสกัด	4.8	4236	4.93
		NSA 1:6	6.0	3238	3.77
		NSB 1:12	10.0	3214	3.74

ตัวอย่างกากอ้อยทั้งเก่าและใหม่ก่อนการสกัดจากทั้ง 4 โรงงาน ที่ความชื้นประมาณ 3 - 6% เมื่อทดสอบหาค่าความร้อนแบบ gross (cal/g) มีค่าใกล้เคียงกัน (4120 - 4287 cal/g หรือประมาณ 5 watt-hour) และหลังกระบวนการสกัดพบว่าในกากอ้อยที่สกัดเอา lignin ออกด้วยกรดให้ค่าพลังงานความร้อนไม่แตกต่างจากกากอ้อยที่ยังไม่สกัด ในขณะที่การใช้ต่างในการสกัดทำให้กากอ้อยที่เหลือให้ค่าความร้อนลดลงประมาณ 15 - 20% เมื่อเทียบกับค่าความร้อนที่ได้จากกากอ้อยที่ยังไม่ได้สกัด ส่วนหนึ่งเนื่องมาจาก lignin เองเมื่อนำมาเผาก็ให้พลังงานเช่นเดียวกันและโดยทั่วไปในโรงงานเยื่อก็จะนำ black liquor ที่มี lignin อยู่มาเผาเพื่อใช้เป็นพลังงานเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ความแตกต่างของค่าความร้อนยังขึ้นกับสภาพของกากอ้อยด้วยเช่นกันว่ามีการเสื่อมสภาพไปตามระยะเวลาการเก็บรักษาหรือไม่

ทั้งนี้นอกจากข้อมูลเชิงคุณภาพของกากอ้อยก่อนและหลังการสกัดแล้ว ยังคงต้องพิจารณาร่วมด้วยว่ากระบวนการสกัด lignin ส่งผลให้ปริมาณกากอ้อยหลังการสกัดลดลงประมาณ 50 % เนื่องจากโครงสร้างของ lignocellulose ที่ประกอบด้วย cellulose, hemicellulose และ lignin ที่เชื่อมโยงกันถูกทำลาย ทำให้

hemicellulose ซึ่งมีอยู่ประมาณ 25-28% โดยน้ำหนักในโครงสร้างและสามารถละลายน้ำได้สูญเสียไปอย่างไร้ที่ตามสามารถกล่าวได้ว่ากากอ้อยที่สกัด lignin ออกแล้วยังสามารถนำกลับไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ตามกระบวนการปกติของโรงงานน้ำตาล

สรุปผลการดำเนินงาน

ในขั้นตอนการสกัด polyphenols จากใบอ้อยพบว่าการใช้ methanol ในการสกัดให้ผลได้ประมาณ 6.5% โดยน้ำหนักใบอ้อย โดยขนาดของตัวอย่างที่แตกต่างกันให้ผลได้ของการสกัดรวมถึงชนิดของสารสกัดที่ได้แตกต่างกัน สารสกัดที่ได้จากใบอ้อยขนาดเล็กมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดที่ได้จากใบขนาดใหญ่เนื่องมาจากองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้แตกต่างกัน สารสกัด polyphenols จากใบอ้อยมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์เนื่องจากมีสมบัติใกล้เคียงกับสารมาตรฐานบริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดสอบ (gallic acid และ catechin) นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิดได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Vibrio cholera* (DMST 15778), *Salmonella typhimurium* (DMST 562) และ *Escherichia coli* (DMST 4212)) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* (DMST 8840))

ในส่วนของกากอ้อย polyphenols ที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ lignin (macropolypehols) และมีส่วนประกอบที่เป็น plant lipids อยู่ในปริมาณเล็กน้อย (0.03 - 0.25%โดยน้ำหนัก) และสูญเสียไปในขั้นตอนการสกัด lignin โดยผลได้การสกัด lignin ขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ การใช้ด่าง (1% NaOH) ให้ผลได้การสกัดมากกว่าการใช้กรด (formic acid: acetic acid: H₂O, 30:55:15, v/v/v) ประมาณ 3 เท่า นอกจากชนิดตัวทำละลายแล้วปัจจัยที่มีผลต่อผลได้การสกัดยังรวมถึง solid: liquid ratio พบว่าการใช้ด่างเพิ่มจากอัตราส่วน 1:6 เป็น 1:12 จะเพิ่มผลได้การสกัดประมาณ 5 - 10% ในขณะที่การเพิ่มอัตราส่วนของกรดไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด นอกจากนี้ในการทดลองสกัด lignin จากกากอ้อยใหม่พบว่าจำเป็นต้องมีการทำ pretreatment ด้วยวิธี steam explosion เนื่องจากกากอ้อยใหม่มีโครงสร้างที่แข็งแรงกว่ากากอ้อยเก่า รวมถึงมีค่า total phenolic content สูงกว่ากากอ้อยเก่า ซึ่งส่งผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าของ lignin ในกากอ้อยใหม่เทียบกับกากอ้อยเก่า

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ATR-FTIR และ ¹H-NMR พบว่าโครงสร้างของ lignin ที่ได้จากทั้งการสกัดด้วยกรดและด่างมี functional groups ที่แสดงโครงสร้างของ lignin ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่ศึกษาการสกัด lignin ในสภาวะใกล้เคียงกัน ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการสกัด lignin ขึ้นกับความต้องการในการนำไปใช้ประโยชน์และการจัดการกากอ้อยเก่าและใหม่ของโรงงาน ทั้งนี้กากอ้อยที่ผ่านการสกัด lignin แล้วยังสามารถนำกลับมาใช้ผลิตไฟฟ้าต่อไปได้โดยให้ค่าพลังงานความร้อนลดลงประมาณ 5 - 15% เทียบกับกากอ้อยปกติ

จากงานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่า lignin ที่ได้จากกากอ้อยมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานที่หลากหลาย เนื่องจากมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับสารสกัดกลุ่มที่เป็น bioactive compound อื่นที่ได้จากพืชอาหาร รวมทั้งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารมาตรฐานรวมถึงสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกเหนือไปจากการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์หรือเพื่อสุขภาพและความงาม การนำ

lignin ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ยังสามารถพัฒนาเพื่ออุตสาหกรรมอื่นได้อีก เช่น fine chemicals เพราะโครงสร้างพื้นฐานที่เป็น aromatic hydrocarbon เช่น phenol ยังมีศักยภาพในการนำไปผลิตสารตั้งต้นของ polymer หลายชนิดทดแทน phenol ที่ได้จากน้ำมันปิโตรเลียม ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี เช่น chemical depolymerization ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

▪ การสกัดสาร polyphenols จากใบอ้อย

ในงานวิจัยนี้ทำการสกัดสารประกอบ polyphenols โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลายเดี่ยวเพื่อลดขั้นตอนในการสกัดและเปรียบเทียบผลของขนาดตัวอย่างใบอ้อยที่ตัดหยาบขนาดประมาณ 1 cm. และบดละเอียดผ่าน hammer mill sieve ขนาด 0.2 mm. ในงานวิจัยเกี่ยวกับการสกัดสาร polyphenols จากพืช ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันแพร่หลายในการสกัด polyphenols มีหลายชนิด เช่น methanol, acetone, ethanol, ethyl acetate และน้ำ (Escribano-Bailon and Santos-Buelga 2003) เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าสารในกลุ่ม polyphenols ที่สกัดได้จากใบอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม flavonoids และ anthocyanins ในการสกัดจึงจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถสกัดสารได้ทั้งสองกลุ่ม ตัวทำละลายที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุดคือ methanol และ ตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol และน้ำ อย่างไรก็ตาม เพื่อหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายโดยคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการขยายระดับการสกัดในการทดลองนี้ จึงเลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลายเดี่ยวซึ่งสามารถระเหยและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายผสมซึ่งจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้นเพื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกทั้งหมด ทั้งนี้การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสามารถทำได้โดยการเพิ่มกรดปริมาณเล็กน้อยใน methanol โดยกรดที่ใช้โดยส่วนใหญ่คือ hydrochloric acid โดยระดับที่เหมาะสมโดยไม่ส่งผลต่อการเกิด degradation ของ monoacylated anthocyanins คือที่ 0.1% HCl (0.012N HCl ใน methanol)

ในการศึกษาต่อไปในอนาคตหากพิจารณาในแง่ของวิธีการสกัดที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อาจต้องพิจารณาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความปลอดภัยมากขึ้นแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานว่า methanol เป็นสารก่อมะเร็งแต่ในรายงานของ U.S Department of Health and Human Services (2012) methanol ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Class 2 ซึ่งว่าอันตรายต่อสุขภาพมากกว่า ethanol และ acetone (Class 3)

▪ การสกัดสาร polyphenols (lignin) จากกากอ้อย

Lignin จัดเป็นสาร polyphenols สำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้าง lignocellulosic material โดยมีโครงสร้างเป็นลักษณะสามมิติประกอบด้วย Phenylpropanoid unit โดยเฉพาะ Syringyl (S), Guaiacyl (G) และ *p*-hydroxyphenol (H) monomer และเชื่อมต่อกันผ่านปฏิกิริยา dehydrogenation ในการสกัด lignin โดยส่วนใหญ่ดังที่กล่าวข้างต้น มักเพื่อวัตถุประสงค์ในการนำ cellulose ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักไปใช้ประโยชน์ทั้งในการใช้เป็นเยื่อกระดาษ และการนำเข้าสู่กระบวนการผลิต bioethanol อย่างไรก็ตามในการแยกสารสำคัญต่างๆ จากเซลล์พืชโดยเฉพาะ lignocellulosic material ก่อให้เกิดสารชีวโมเลกุลที่หลากหลายซึ่งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะศักยภาพของ lignin ต่ออุตสาหกรรมเคมี เช่น สารเคมีในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการรักษาเนื้อไม้ polyurethane foam และส่วนผสมในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลง ทำความสะอาด และคอนกรีต เป็นต้น อย่างไรก็ตามโครงสร้างและสมบัติ

ของ lignin แตกต่างกันไปตามชนิดของพืชและวิธีการที่ใช้ในการสกัดจากพืช จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษาทั้งในระดับต้นน้ำตั้งแต่การเปลี่ยนแปลงกระบวนการชีวสังเคราะห์ของ lignin ไปจนถึงปลายน้ำในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัด lignin มาใช้ประโยชน์ แต่ข้อจำกัดในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ยังอยู่ในวงจำกัดอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าต่ำ การพัฒนาวิธีการสกัดและวิเคราะห์โครงสร้างและคุณสมบัติทั้งในด้านเคมีและชีวภาพจึงยังต้องมีการพัฒนาต่อไป

ทั้งนี้ในภาพรวมของ polyphenol profile ที่จะได้จากอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ยังควรต้องมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อให้ทราบถึงแหล่งของตัวอย่างที่มีศักยภาพในการนำมาสกัด polyphenols เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ โดยเริ่มต้นตั้งแต่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นอ้อย ไปจนถึงเมื่อนำอ้อยเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลเพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณในแต่ละขั้นตอน แต่ทั้งนี้ยังคงต้องการการศึกษาเชิงลึก โดยเฉพาะเทคนิคในการวิเคราะห์ทั้งโครงสร้างและปริมาณเนื่องจากสารกลุ่มนี้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาซึ่งอาจทำให้โครงสร้างที่ได้มีความแตกต่างจากชนิดและปริมาณที่พบในธรรมชาติ ซึ่งงานศึกษา polyphenol profile จากอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลขณะนี้ในดำเนินการในส่วนของงานวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาเอกต่อไป

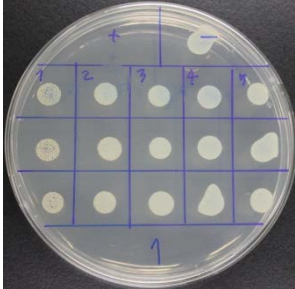
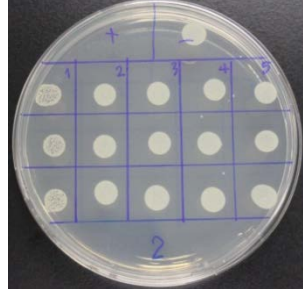
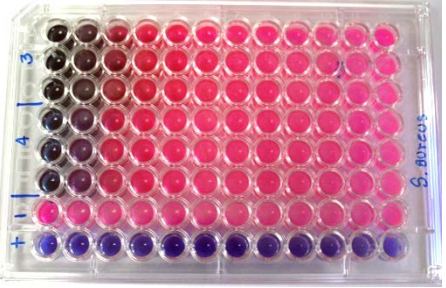
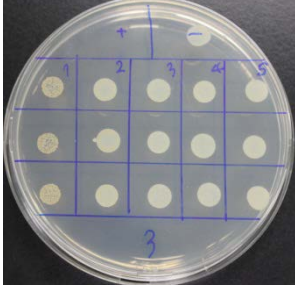
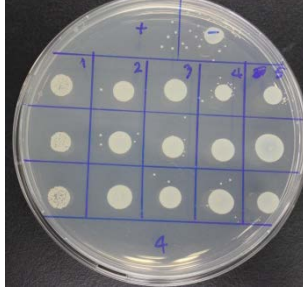
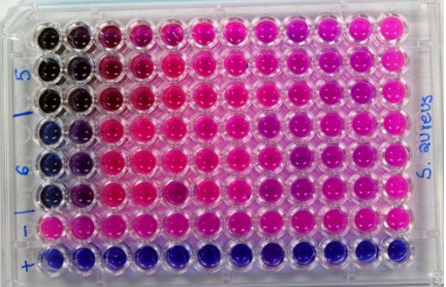
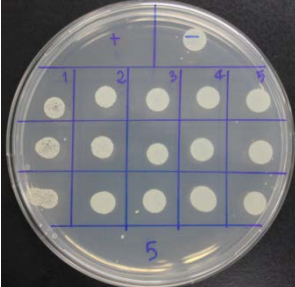
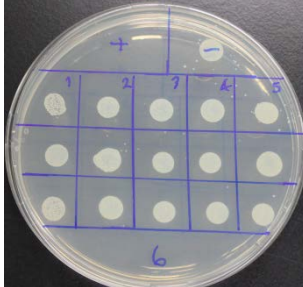
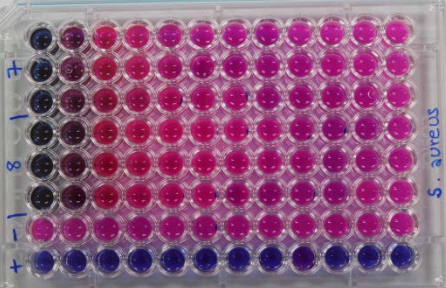
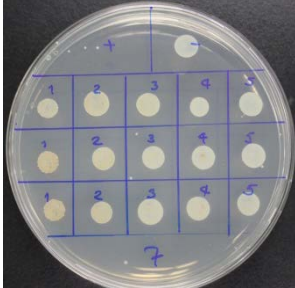
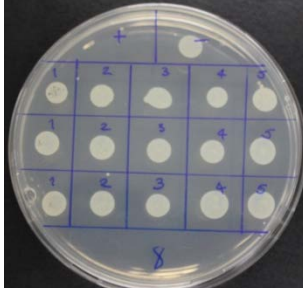
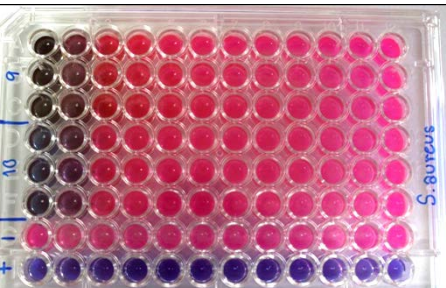
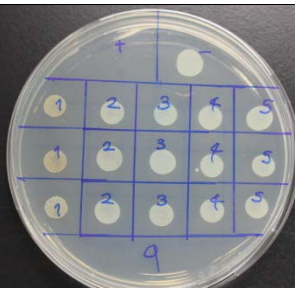
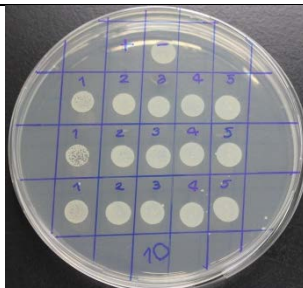
เอกสารอ้างอิง

- Administration, F. a. D. (2012). Guidance for industry. U. S. D. o. H. a. H. Services, Office of Communications Division of Drug Information. **Revision 2**.
- Blainski, A., et al. (2013). "Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L." Molecules **18**: 6852-6865.
- Cara, C., et al. (2008). "Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning." Fuel **87**(6): 692-700.
- Delmas, G.-H. (2011). La BiolignineTM: Structure et application a l'elaboration de resines epoxy. Mecanique, Energetique, Genie civil et Procedes (MEGeP). Toulouse, Universite de Toulouse. **Doctoral**: 144.
- Donga, X., et al. (2011). "Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production." Industrial Crops and Products **34**: 1629 - 1634.
- Escribano-Bailon, M. and C. Santos-Buelga (2003). Polyphenol extraction from foods. Methods in polyphenol analysis. C. Santos-Buelga and G. Williamson. Cambridge, UK, The Royal Society of Chemistry: 383.
- Fagali, N. and A. Catala (2008). "Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques." Biophysical Chemistry **137**(1): 56-62.
- Li, Z. and Y. Ge (2012). "Antioxidant activities of lignin extracted from sugarcane bagasse via different chemical procedures." International Journal of Biological Macromolecules **51**(5): 1116-1120.
- M. Shahzad, et al. (2013). Evaluation of the antibacterial potential of polyphenols against periodontal pathogens. Summer Meeting, 15-18 July 2013, Nutrition and healthy ageing.
- Sharma, O. P., et al. (1998). "Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid." Journal of Chromatography A **822**(1): 167-171.
- Ugartondo, V., et al. (2008). "Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources." Bioresource Technology **99**: 6683-6687.
- Wolfe, K., et al. (2003). "Antioxidant activity of apple peels." J Agric Food Chem. **51**(3): 609-614.
- Zabaleta, A. T. (2012). Lignin extraction, purification and depolymerization study. Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente, Universidad del País Vasco. **Ph.D.**: 280.

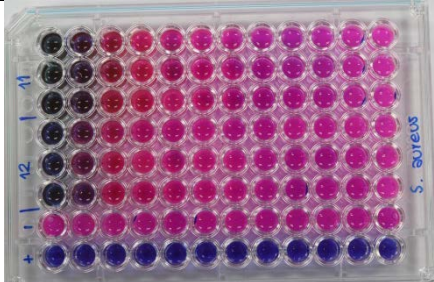
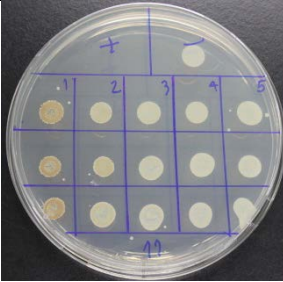
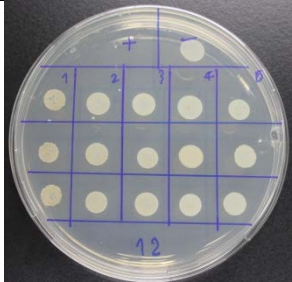
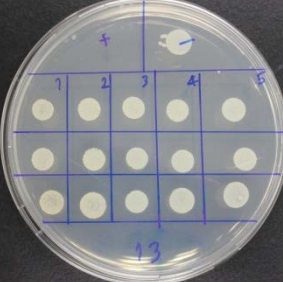
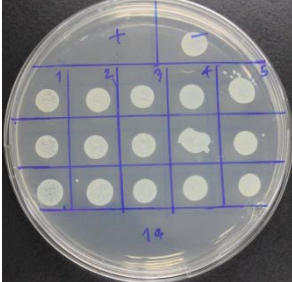
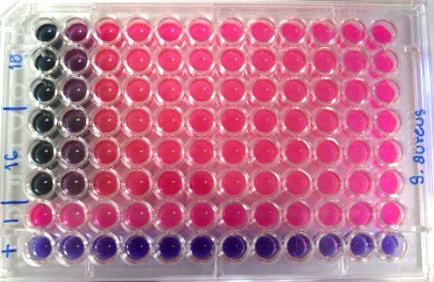
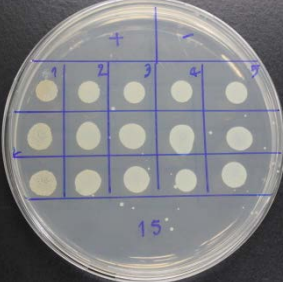
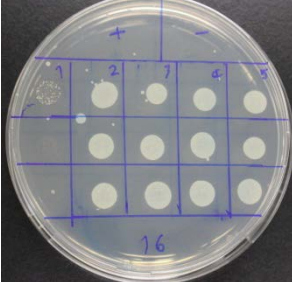
ภาคผนวก

■ ผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด lignin จากกากอ้อย ที่สภาวะต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

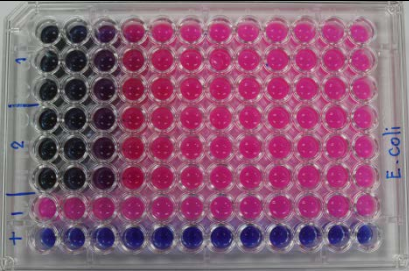
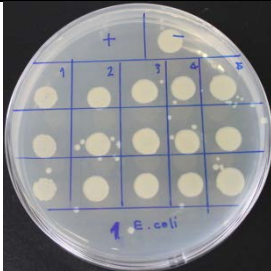
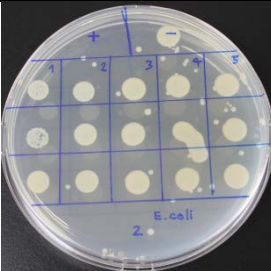
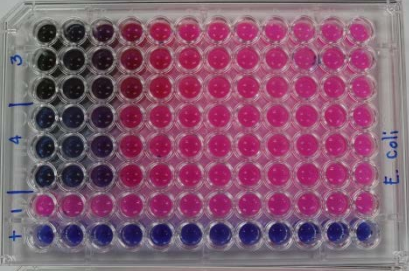
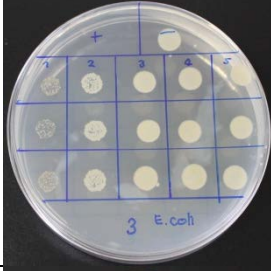
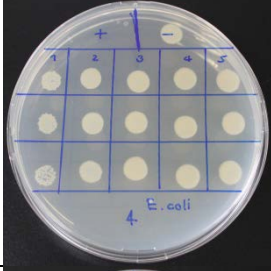
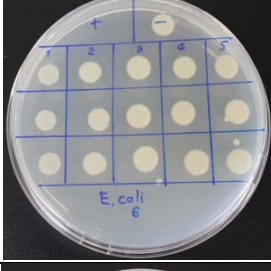
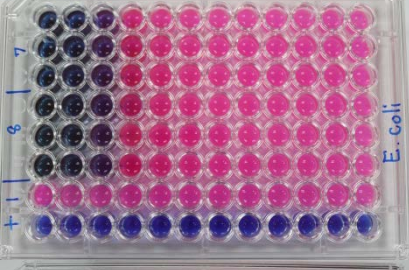
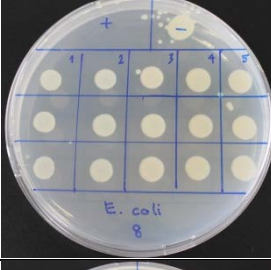
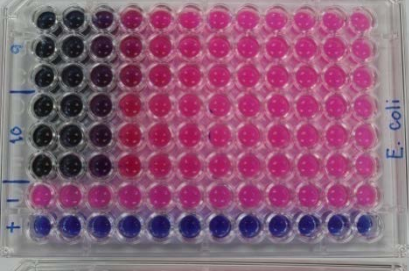
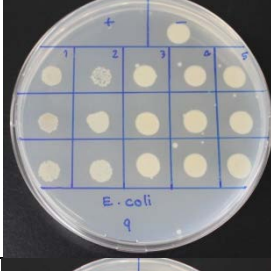
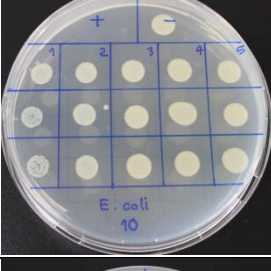
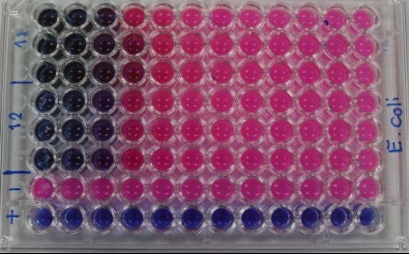
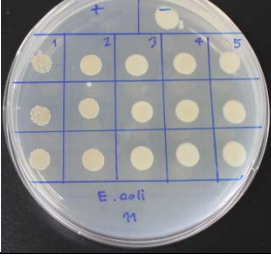
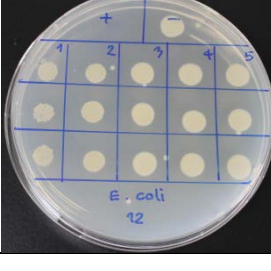
ตารางภาพที่ 1 ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *S. aureus*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		
		
		
		

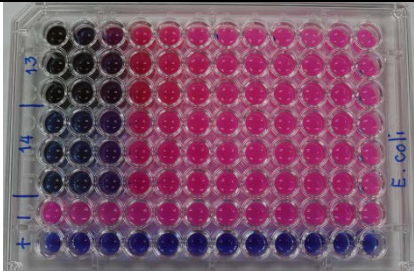
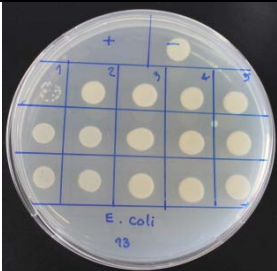
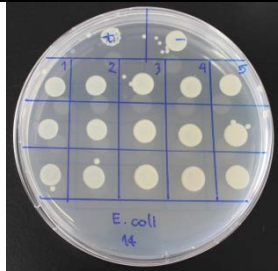
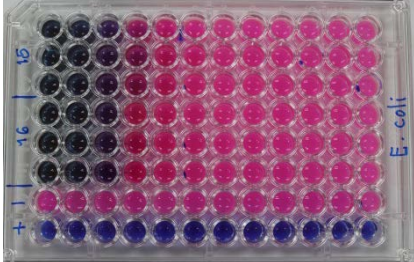
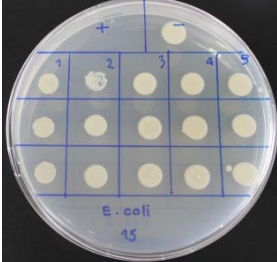
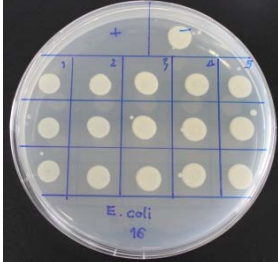
ตารางภาพที่ 1 (ต่อ) ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *S.aureus*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		
		

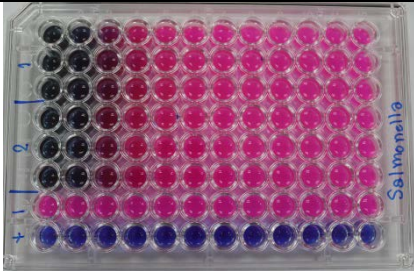
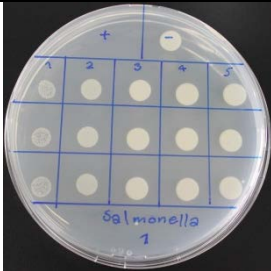
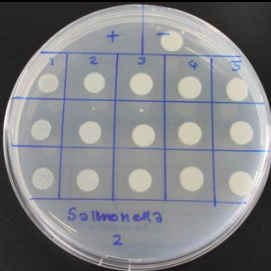
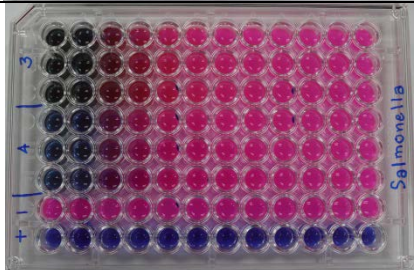
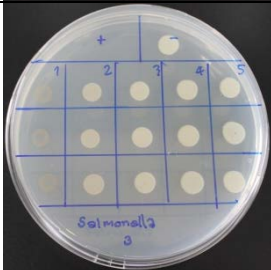
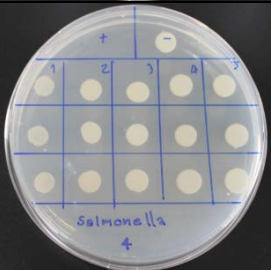
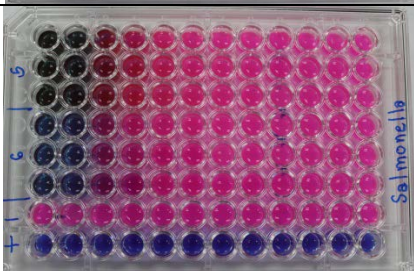
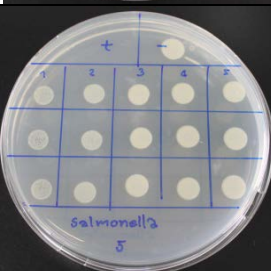
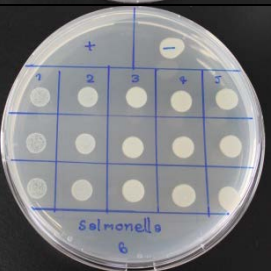
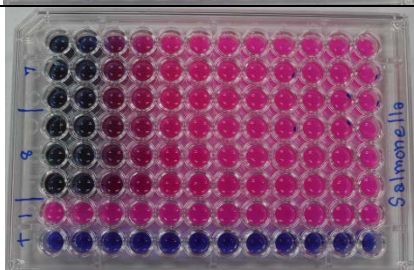
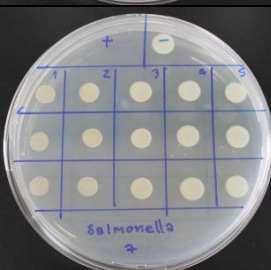
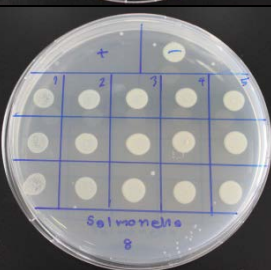
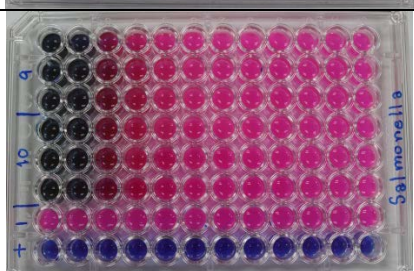
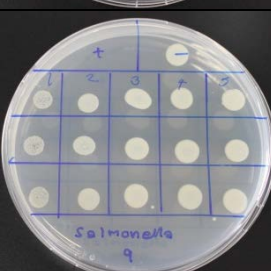
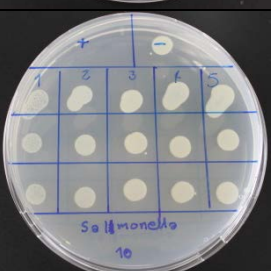
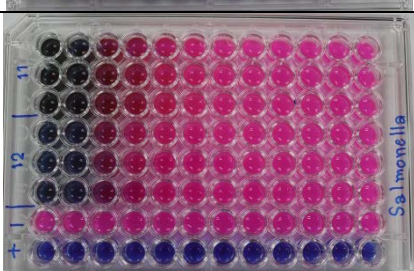
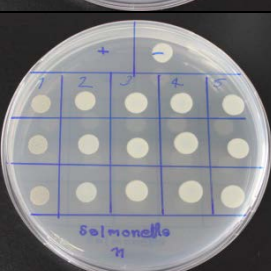
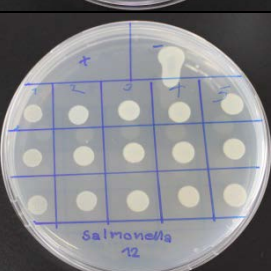
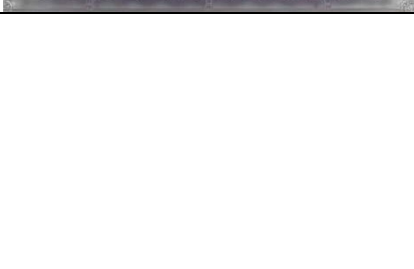
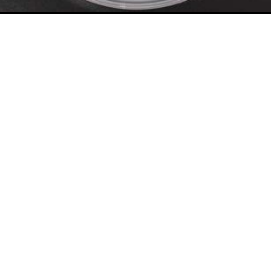
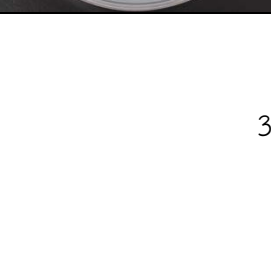
ตารางภาพที่ 2 ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *E.coli*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		
		
		
		
		

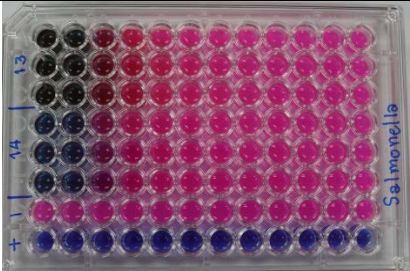
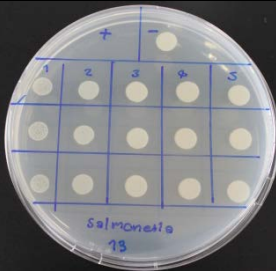
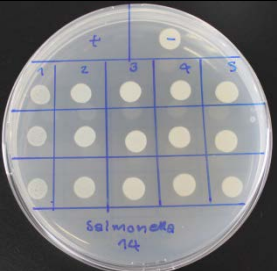
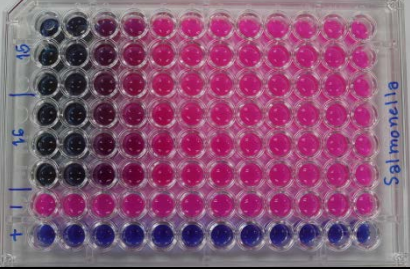
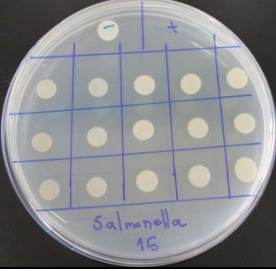
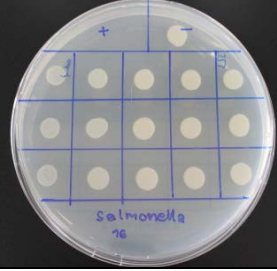
ตารางภาพที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *E.coli*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		

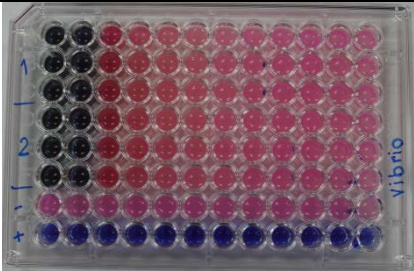
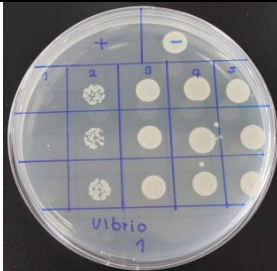
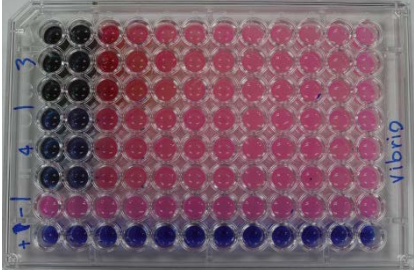
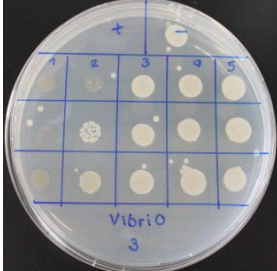
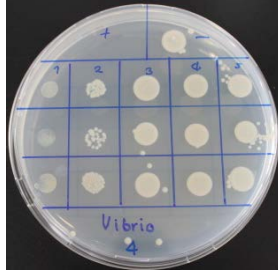
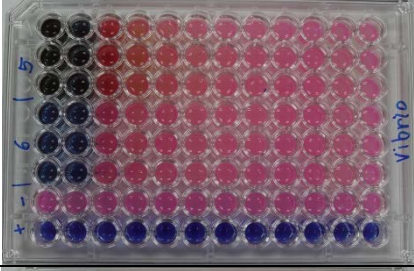
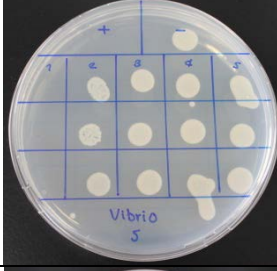
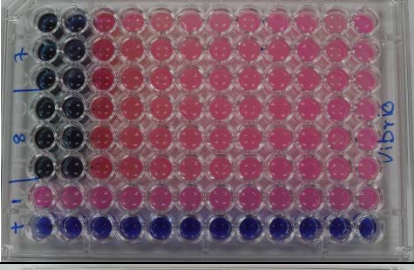
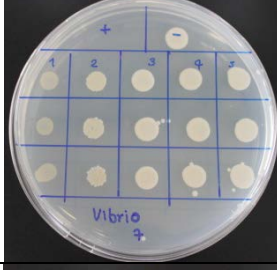
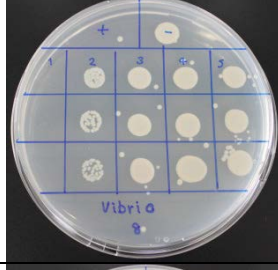
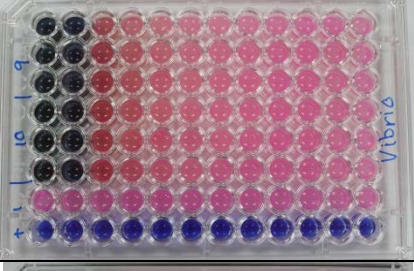
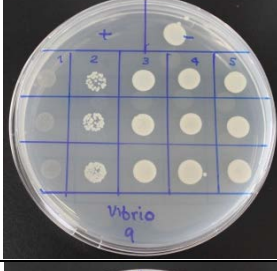
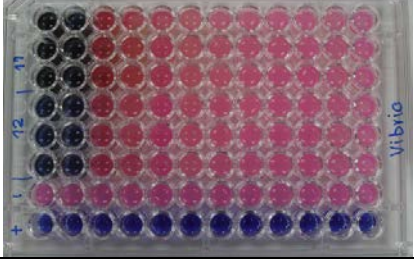
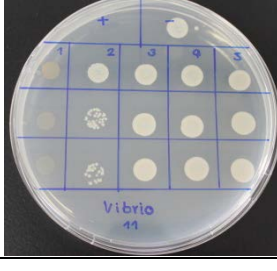
ตารางภาพที่ 3 ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *Salmonella typhimurium*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		
		
		
		
		
		

ตารางภาพที่ 3 (ต่อ) ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *Salmonella typhimurium*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		

ตารางภาพที่ 4 ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *Vibrio cholera*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
		
		
		
		
		
		

ตารางภาพที่ 4 (ต่อ) ผลการตรวจประสิทธิภาพสารทดสอบในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *Vibrio cholera*

ภาพการทดสอบผล MIC	ภาพการทดสอบผล MBC	ภาพการทดสอบผล MBC
