

210

การใช้เซลล์แสงเพื่อช่วยในการแยกซิลิกาจากแกลบ



นายบัณฑิต ฝั่งสินธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

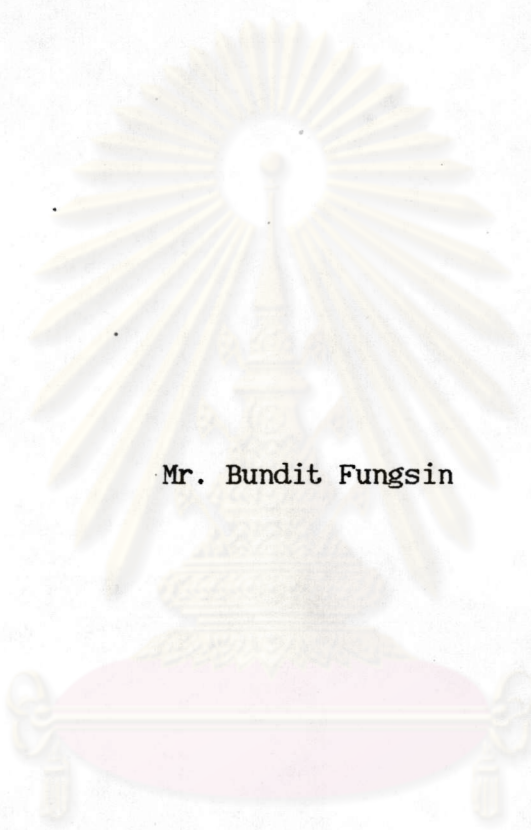
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-869-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Utilization of Cellulase to Facilitate Isolation Silica
from Rice Husk



Mr. Bundit Fungsin

คุณย์วิทยธรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University


1995

ISBN 974-632-869-7


หัวข้อวิทยานิพนธ์
โดย
ภาควิชา
อาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา

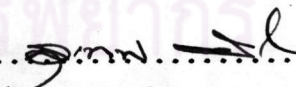
การใช้เซลล์เลสเพื่อช่วยในการแยกซิลิกาจากแกลบ
นายบัณฑิต ผั่งสินธุ์
จุลชีววิทยา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
2538

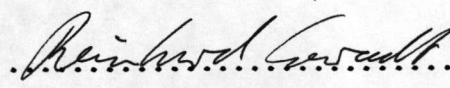
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

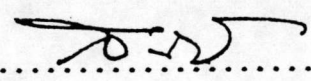

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ กงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)


..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)


..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(Dr. Reinhard Conradt)


..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

บทคัดย่อ : การใช้เซลลูเลสเพื่อช่วยในการแยกซิลิกาจากแกลบ (UTILIZATION OF CELLULOSE TO FACILITATE ISOLATION SILICA FROM RICE HUSK.)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ฉินยานัน, 122 หน้า. ISBN 974-632-869-7

อ.ที่ปรึกษาร่วม : Dr. Reinhard Conradt

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสออกจากแกลบสำหรับการเตรียมซิลิกาได้ อย่างไรก็ตามพบว่าปฏิกิริยาดังกล่าวถูกยับยั้งได้โดยโลหะหรือไอออนที่อยู่ในแกลบเอง การเติมเอริธรีนไดเอมีนเททราอะซีติกแอซิด (EDTA) ที่ 0.2% (w/v) สามารถคิเลตสารดังกล่าวออกและลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ปัจจัยอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพของระบบลดลงคือการดูดซับ (absorption) ของเอนไซม์โดยสารที่อยู่ในแกลบ พบว่าการเติมดีเทอร์เจนท์ ทวิน 80 ที่ 0.1% (v/v) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ 2.84 เท่า ภาวะเหมาะสมสำหรับการย่อยแกลบโดยเซลลูเลส คือ ระบบที่มีแกลบที่เตรียมโดยการใช้กรด 9% (w/v) ในน้ำปอดประจุ EDTA 0.02% (w/v) ทวิน 80 0.1% (v/v) ที่ความเป็นกรดต่าง 4.5-4.8 ภายใต้การเขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิธีการปรับสภาพแกลบที่ให้ผลดีร่วมกับการย่อยด้วยเซลลูเลส จะเป็นการเตรียมด้วยกรด autoclave และการต้มตามลำดับ สำหรับวิธีเตรียมที่ไม่ใช้กรดพบว่า การ autoclave แกลบนาน 2 ชม. ให้ประสิทธิภาพการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 83% ของแกลบที่เตรียมด้วยกรด

ภาวะที่ใช้เลี้ยง *Trichoderma reesei* TISTR 3081 เพื่อการผลิตเซลลูเลสจะใช้กล้าเชื้อที่เป็นชิ้นของรา 5 ชิ้น ในอาหารเพาะเลี้ยง 100 มล. ที่มีเอมิเซล 2% เป็นสารชักนำ โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วันพร้อมการเขย่า 200 รอบต่อนาที ภายใต้ภาวะข้างต้นเชื้อให้แอสติวิตีของเซลลูโลสรวม แอฟฟิเอส เอนโดกลูคาเนส เอ็กโซกลูคาเนส และเบตากลูโคซิเดสเป็น 7.40, 0.9, 0.4, 0.15 และ 0.29 หน่วยต่อมล. อาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งมีเอนไซม์อยู่ด้วยไปย่อยแกลบที่อุณหภูมิห้อง ความเป็นกรดต่าง 4.6-4.8 พบว่าสามารถไฮโดรไลซ์แกลบใกล้เคียงกับกับเอนไซม์ทางพาณิชย์

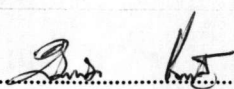
พบว่าการใช้เซลลูเลสในระบบการย่อยแกลบที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีการต่าง ๆ ต่างทำให้ซิลิกาที่ได้หลังการเผา มีสีขาวว่าตลอดจนมีความบริสุทธิ์ที่สูงกว่ากรณีที่ไม่ใช้เอนไซม์ สำหรับวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์แกลบที่ผ่านการแปรสภาพด้วย HCl 1:5 โดยให้แกลบที่มีซิลิกามากกว่า 99% ซึ่งสูงกว่าในกรณีที่ใช้แกลบที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่สัดส่วน 1:4 เสียอีก

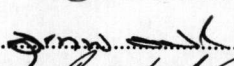
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

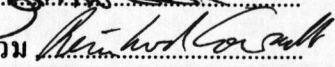
ภาควิชา จลชีววิทยา

สาขาวิชา จลชีววิทยานาเวงอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

C425976 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: CELLULASE / RICE HUSK / SILICA / Trichoderma reesei.

BUNDIT FUNGSIN : UTILIZATION OF CELLULASE TO FACILITATE ISOLATION SILICA FROM RICE HUSK.

THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANIVAVARN, Ph.D.,

THESIS CO-ADVISOR : DR. REINHARD CONRADT.

122 pp., ISBN 974-632-869-7

Perliminary results revealed that the incorporation of cellulase into silica preparation system could hydrolyzed cellulose presence in rice husk and improved purity of silica after ashing. However, such reaction was found inhibit by metals or ions present in the husk itself. Addition of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) at 0.2% (w/v) could chelate such substances and restored activity close to normal. Other factor that affected efficiency of cellulase was the absorption of enzyme by rice husk. It was found that upon the addition of Tween 80, a non ionic detergent at 0.1% (v/v) could increased efficiency of enzyme by 2.84 times. Optimal conditions for cellulase hydrolysis was : 9% (w/v) of rice husk pretreated with acid in deionized water, 0.02% (w/v) EDTA, 0.1% (v/v) Tween 80 pH 4.5-4.8 with agitation rate of 200 rpm at room temperature. Pretreatments of choice for use along with cellulase were : acid, autoclaving and boiling respectively. The best non-acidic pretreatment was autoclaving for 2 hours which gave a 83% of that of acid pretreatment.

Cultivation of Trichoderma reesei TISTR 3081 for cellulase production were carried out by inoculating 5 fungal pellets into 100 ml of production medium supplemented with 2% avicel as cellulase inducer, the system was cultivated by shaking at 200 rpm for 7 days at room temperature. Under such conditions, yield of total cellulase, FPase, endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase were at 7.4, 0.9, 0.4, 0.15 and 0.29 unit/ml. of culture broth respectively. Supernatant from the isolated culture were showed to be able to hydrolyzed rice husk almost as good as commercial enzyme at room temperature, pH 4.6-4.8.

In all pretreated cases, the incorporation of cellulase could enhance the whiteness of silica after ashing in comparison to those without enzyme. The best combination observed was the use of cellulase on husk treated with HCl 1:5, by which a 99% purity was obtained and of higher than those observed in case of 1:4 hydrochloric acid pretreatment.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา.....2538.....

ลายมือชื่อนิติ.....*Gun*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Gun*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Reinhard Conradt*.....



กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเทพ ธานีวัน ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Reinhard Conradt ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมให้ความรู้ทางวัสดุศาสตร์เป็นอย่างดีและให้ความกรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ และ รศ.ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการ และประธานสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา ที่มีส่วนช่วยเหลือ แนะนำการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บริษัทอีสเอเซียติก (ประเทศไทย) จำกัด ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเอ็นไซม์ ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ และขอขอบคุณ คุณชนภา ตั้งบริบูรณ์ แห่งสถาบันวิเคราะห์โลหะ และวัสดุศาสตร์ ที่ช่วยกรุณาวิเคราะห์ค่าพื้นที่ผิวจำเพาะของซิลิกาให้

ขอขอบพระคุณท่านรองผู้ว่าการฯ อาจารย์พูนสุข อัดทะสัมปณะ ท่านผู้อำนวยการสาขา วิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ดร.พงศ์เทพ อันตะริกานนท์ ท่านผู้อำนวยการห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก อาจารย์ประไพศรี สมใจ ตลอดจนพี่ ๆ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ ขอบพระคุณญาติพี่น้อง ซึ่งให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้เขียน จนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และสารเคมี.....	37
3. วิธีดำเนินการทดลอง.....	39
4. ผลการทดลอง.....	53
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	98
เอกสารอ้างอิง.....	105
ภาคผนวก.....	119
ประวัติผู้เขียน.....	122

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 16. เปรียบเทียบค่าแอกติวิตีเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดที่ได้..... จากรา <u>Trichoderma. reesei</u> TISTR 3081	80
ตารางที่ 17. เปรียบเทียบลักษณะและสีของแกลบที่ผ่านการเตรียมด้วย..... วิธีต่าง ๆ	88
ตารางที่ 18. เปรียบเทียบน้ำหนักที่เหลือจากการเตรียมและการเผา..... แกลบชนิดต่าง ๆ	93
ตารางที่ 19. เปรียบเทียบสีของเถ้าแกลบที่ได้จากการเผาแกลบที่ผ่าน..... การเตรียมโดยวิธีต่าง ๆ	94
ตารางที่ 20. แสดงปริมาณของซิลิกาในเถ้าแกลบที่ได้จากการเผา..... แกลบชนิดต่าง ๆ	96
ตารางที่ 21. แสดงค่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area)..... ของเถ้าแกลบหรือซิลิกาที่เตรียมจากการเผาแกลบชนิดต่าง ๆ	97
ตารางที่ 22. ลักษณะของแกลบที่ปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ และซิลิกาที่ได้.....	102

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1. แสดงการเข้าไปสะสมของซิลิกาในข้าวและแหล่งสะสมของ..... ซิลิกาในแกลบ	8
รูปที่ 2. แสดงการแยกองค์ประกอบในเซลล์พืช.....	10
รูปที่ 3. แสดงลักษณะการจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคสในเซลลูโลส.....	11
รูปที่ 4. ลักษณะของไมโครไฟบริล.....	12
รูปที่ 5. โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป.....	13
รูปที่ 6. แสดงลำดับการเข้าทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของ..... ระบบเอนไซม์เซลลูเลส	17
รูปที่ 7. การสังเคราะห์และควบคุมการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในเชื้อรา..... <u>T. reesei</u>	18
รูปที่ 8. แผนผังการผลิตซิลิกาจากแกลบ.....	22
รูปที่ 9. การปรับสภาพแกลบด้วยกรด.....	40
รูปที่ 10. ผลการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกด้วยเอนไซม์..... เซลลูเลส	54
รูปที่ 11. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าในสภาวะ..... ที่ไม่มีแกลบ	55
รูปที่ 12. แสดงผลค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่มีซิลิกา..... ปริมาณต่าง ๆ อยู่ในระบบ	57
รูปที่ 13. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ในระบบการย่อยแกลบ..... ที่มีการเติม EDTA.	58
รูปที่ 14. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส ในระบบการย่อยแกลบ..... ที่เติมแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})	60
รูปที่ 15. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ในการย่อย..... แกลบในช่วงเวลา 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง	61
รูปที่ 16. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ ในระบบการย่อยแกลบที่เตรียม..... ด้วยกรด 3 ระบบคือ เติมหวัน 80, ใช้การลั่น, ระบบควบคุม ไม่ได้เติมหวัน 80	63

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 17. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์, โปรตีน และน้ำตาลรีดิวซ์ในการ..... ย่อยแกลบที่เติมทวิน 80 เปรียบเทียบกับระบบที่ไม่เติม ทวิน 80	64
รูปที่ 18. ผลการย่อยแกลบ 3 ระบบ ซึ่งใช้ปริมาณน้ำจัดอ็อกอน 50 มล.,..... 60 มล., และ 70 มล.	66
รูปที่ 19. แสดงค่าแอกติวิตีเอนไซม์เซลลูเลสและน้ำตาลรีดิวซ์ใน..... การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด แปรผันปริมาณทวิน 80	67
รูปที่ 20. แสดงค่าแอกติวิตีเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยแกลบ..... ที่เตรียมด้วยกรด ที่แปรผันปริมาณ EDTA.	69
รูปที่ 21. แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบ ชนิดที่ไม่ได้..... เตรียมด้วยกรดในน้ำจัดอ็อกอน	70
รูปที่ 22. แสดงค่าแอกติวิตีเอนไซม์ในระบบการย่อยแกลบชนิดที่ไม่ได้..... เตรียมด้วยกรดในน้ำจัดอ็อกอน	71
รูปที่ 23. แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ในระบบการย่อยแกลบที่ไม่ได้..... เตรียมด้วยกรด โดยใช้ซีเตรทบัฟเฟอร์	73
รูปที่ 24. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในระบบการย่อยแกลบที่ไม่ได้..... เตรียมด้วยกรด โดยใช้ซีเตรทบัฟเฟอร์	74
รูปที่ 25. แสดงค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่ไม่ได้เตรียม..... ด้วยกรด โดยใช้ซีเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง	75
รูปที่ 26. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในระบบการย่อยแกลบที่ไม่ได้..... เตรียมด้วยกรดโดยใช้ซีเตรทบัฟเฟอร์ดัดแปลง	76
รูปที่ 27. แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์, โปรตีน ของเอนไซม์..... เซลลูเลสจาก <u>T. reesei</u> ในอาหารที่ใช้เอมิเซล	81
รูปที่ 28. แสดงค่าแอกติวิตีเอนไซม์, เอ็กโซ-กลูคาเนส, เบต้า-..... กลูโคซิเตส และค่า pH ของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก <u>T. reesei</u> ของรูปที่ 27	82

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 29. แสดงค่าแอดติวิตีเอนไซม์, แอปฟีเอสติวิตีและเอนโด- กลูคาเนสของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากรา <u>T. reesei</u> ในอาหารที่ใช้เอวิเซลเป็นแหล่งเซลลูโลส	83
รูปที่ 30. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดด้วย..... เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก <u>T. reesei</u> ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	85
รูปที่ 31. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดด้วย..... เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก <u>T. reesei</u> ที่ค่า pH ต่าง ๆ	86
รูปที่ 32. เปรียบเทียบการย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรด ด้วยเอนไซม์..... เซลลูเลสทางการค้าและเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจาก <u>T. reesei</u>	87
รูปที่ 33. การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วน..... ก่อนน้ำ 1:5 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า	89
รูปที่ 34. การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วน..... กรดก่อนน้ำ 1:5 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นเองจาก <u>T. reesei</u> .	90
รูปที่ 35. การย่อยแกลบที่เตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วน..... กรดก่อนน้ำ 1:6 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า	91
รูปที่ 36. แกลบผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ.....	92
รูปที่ 37. แกลบหรือซิลิกาที่ได้จากแกลบปรับสภาพด้วยวิธีต่าง ๆ.....	95

คำย่อ

ก.	=	กรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
(v/v)	=	ปริมาตร/ปริมาตร
(w/v)	=	น้ำหนัก/ปริมาตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย