

Thesis Title	Optimization of Ferulic Acid Release from Biomass by Chemical Method and Microbial Degradation
Author	Ms. Pimpilai Fusawat
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham

Abstract

Ferulic acid is a phenolic acid existing in plant cell walls and it has many physiological functions including antioxidant, antimicrobial, anticancer and anti-inflammatory activities. The ferulic acid can be released by chemical and enzymatic hydrolysis. In this study, ferulic acid was obtained from lignocellulosic biomass by autoclave assisted alkaline hydrolysis (AAA) and the amount of ferulic acid released from the lignocellulosic biomasses (corn husks and corn cobs) by AAA was compared with microwave assisted alkaline hydrolysis (MAA). The phenolic analysis of lignocellulosic biomass hydrolysate by HPLC showed that when lignocellulosic biomass was hydrolyzed by 0.5 M NaOH for 15 min in the autoclave, the corn husks and corn cobs released high amounts of ferulic acid. The effects of different concentrations of NaOH (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.5 M) and hydrolysis times (5, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min) to release ferulic acid using AAA and MAA were investigated. The results showed that 0.5M NaOH for 60 min in AAA was the optimal hydrolysis condition for releasing of ferulic acid from corn husks (20.4818 ± 0.1304 mg/g_{sample}) and corn cobs (17.0914 ± 0.0132 mg/g_{sample}). While hydrolysis by 1.5 M NaOH for 15 min and 2.5 M NaOH for 15 min in microwave could release high amounts of ferulic acid from corn husks (31.2629 ± 1.1056 mg/g_{sample}) and corn cobs (14.7173 ± 0.0092 mg/g_{sample}), respectively.

The potential of the seven fungal strains and two bacterial strains cultured on agar plates containing ethyl ferulate, carboxymethyl cellulose (CMC) and xylan were

investigated for their ability to produce ferulic acid esterase, cellulase and xylanase, respectively. The results showed that *Aspergillus flavus* cultured in ethyl ferulate, *Aspergillus niger* cultured in CMC, and *Trichoderma reesei* cultured in xylan, revealed the largest clear zones of 1.02, 1.50 and 3.05 cm., respectively. The ferulic acid esterase, cellulase and xylanase activities of these microorganisms cultured in liquid medium containing ethyl ferulate, CMC and xylan were also assayed. The results showed that *A. flavus* cultured in ethyl ferulate presented the highest ferulic acid esterase activity (3412.1889 ± 211.7932 U/gds, 5.0686 ± 0.5433 U/mg protein) and *T. reesei* cultured in CMC exhibited the highest cellulase activity (25.3526 ± 0.5200 U/gds, 3.2383 ± 0.0971 U/mg protein), while the greatest xylanase activity was obtained from *A. niger* (87.2468 ± 1.4815 U/gds, 0.9967 ± 0.0042 U/mg protein) cultured in xylan. In addition, each microorganism was cultured in a liquid medium consisting of corn husks to test their ability in enzyme production. The greatest ferulic acid esterase activities were acquired from *A. flavus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum* and these microorganisms could also produce cellulase and xylanase activities.

The production levels of ferulic acid esterase, cellulase and xylanase from *P. chrysogenum* cultured in liquid medium containing pretreated corn husks were assayed. The results presented that the optimal condition for the ferulic acid esterase production was found at 25 °C, pH 6.0 for 168 h in 2% (w/v) pretreated corn husks. The activities of ferulic acid esterase, cellulase and xylanase produced at these conditions were 1.4983 ± 0.0387 U/ml, 0.4971 ± 0.0196 U/ml and 0.2341 ± 0.0080 U/ml, respectively. While the maximum value of ferulic acid (2.3063 ± 0.0374 mg/g sample) released by the *P. chrysogenum* enzyme was obtained at 18 h in pretreated corn husks.

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อยกรดเฟอรูลิกจากชีวมวล โดยวิธีทางเคมีและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์
ผู้เขียน	นางสาวพิมพ์ไฉล พุสวัศ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. นวสิทธิ์ รักษ์จริยธรรม

บทคัดย่อ

กรดเฟอรูลิกเป็นกรดฟีนอลิกที่อยู่ในผนังเซลล์พืช มีบทบาททางสรีรวิทยาในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ, สารต้านจุลชีพ, สารต้านมะเร็งและสารต้านการอักเสบ การสลายชีวมวลลิกโนเซลลูโลสเพื่อปลดปล่อยกรดเฟอรูลิกสามารถทำได้ด้วยวิธีทางเคมีและการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งในการศึกษานี้กรดเฟอรูลิกจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสจะถูกย่อยด้วยด่างในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ และทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณกรดเฟอรูลิกที่ปลดปล่อยออกมาจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส (เปลือกข้าวโพดและซังข้าวโพด) โดยการย่อยด้วยด่างในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อกับการย่อยด้วยด่างร่วมกับการใช้ไมโครเวฟ ผลการวิเคราะห์ฟีนอลิกด้วยเครื่องลิกวิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสซึ่งย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาทีในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อพบกรดเฟอรูลิกถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณสูง และจากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่แตกต่างกัน (0.25, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.5 โมลาร์) และเวลาในการย่อยที่แตกต่างกัน (5, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที) เพื่อปลดปล่อยกรดเฟอรูลิกในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อและไมโครเวฟ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการปลดปล่อยกรดเฟอรูลิกให้ได้ปริมาณมากจากเปลือกข้าวโพด (20.4818 ± 0.1304 mg/g_{sample}) และซังข้าวโพด (17.0914 ± 0.0132 mg/g_{sample}) คือ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 0.5 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 60 นาที ส่วนการย่อยด้วยด่างร่วมกับการใช้ไมโครเวฟ พบว่ากรดเฟอรูลิกสามารถปลดปล่อยออกมาในปริมาณสูงจากเปลือกข้าวโพด (31.2629 ± 1.1056 mg/g_{sample}) และซังข้าวโพด (14.7173 ± 0.0092 mg/g_{sample}) เมื่อย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 และ 2.5 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ

สำหรับการตรวจสอบเชื้อรา 7 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์, เซลลูเลสและไซลานสโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มีเอทิลเฟอร์เรต (ethyl ferulate), คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) และไซแลน (xylan) เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ พบว่าเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่เลี้ยงในเอทิลเฟอร์เรต *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงใน CMC และ *Trichoderma reesei* ที่เลี้ยงในไซแลนมีขนาดวงใสที่ใหญ่ที่สุดเท่ากับ 1.02, 1.50 และ 3.05 เซนติเมตรตามลำดับ และจากการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์, เซลลูเลสและไซลานสจากเชื้อทั้ง 9 ชนิดในอาหารเหลวที่มีเอทิลเฟอร์เรต CMC และไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่า *A. flavus* ที่เลี้ยงในเอทิลเฟอร์เรตให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์สูงสุด (3412.1889 ± 211.7932 U/gds, 5.0686 ± 0.5433 U/mg protein), *T. reesei* ที่เลี้ยงใน CMC ให้แอกติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด (25.3526 ± 0.5200 U/gds, 3.2383 ± 0.0971 U/mg protein) ขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ไซลานสสูงที่สุด (87.2468 ± 1.4815 U/gds, 0.9967 ± 0.0042 U/mg protein) ได้จากเชื้อ *A. niger* ที่เลี้ยงในไซแลน นอกจากนี้ได้ตรวจสอบศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นองค์ประกอบ พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์สูงสุดได้จากเชื้อ *A. flavus*, *A. niger* และ *Penicillium chrysogenum* และเชื่อดังกล่าวยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลานสได้

เมื่อนำ *P. chrysogenum* มาผลิตเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์, เซลลูเลสและไซลานสในอาหารเหลวที่มีเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์ คืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH 6.0 ทำการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ใน 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เพอรูติกแอซิดเอสเทอร์, เซลลูเลสและไซลานส เท่ากับ 1.4983 ± 0.0387 U/ml, 0.4971 ± 0.0196 U/ml และ 0.2341 ± 0.0080 U/ml ตามลำดับ ส่วนปริมาณของกรดเพอรูติกสูงสุด (2.3063 ± 0.0374 mg/g_{sample}) ที่ถูกปลดปล่อยโดยเอนไซม์จากเชื้อ *P. chrysogenum* พบเมื่อหมักเป็นเวลา 18 ชั่วโมงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว