การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

Production of Cellulase and Xylanase from Palm Oil Mill Wastes by *Aspergillus niger* ATCC 6275

bib 66875

อารี กังแฮ

Aree Kunghae

เอนไซม์ - การผลิต x วิจัย
เซลลูเลส - การผลิต x วิจัย
ไซลาเนส - การผลิต - วิจัย

เลขหมู่ QP609.C37 A64 2536 ค 2
เลขทะเบียน 032843
19 ก.ค. 2536

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2536

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

ผู้เขียน นางสาวอารี กังแฮ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)
	.....กรรมการ
	(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

ผู้เขียน นางสาวอารี กังแฮ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2535

บทคัดย่อ

น้ำทิ้งรวมและกากปาล์มเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์จากการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง ตามลำดับ เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ Cellulase และ xylanase ของเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงแบบอาหารเหลวในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าการเติมกากปาล์มบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยด่าง (NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล) กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน (121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง) หรือกากปาล์มบดละเอียดด้วย ball mill ไม่มีผลแตกต่างต่อการผลิตเอนไซม์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากปาล์มบด เท่ากับร้อยละ 1.0 การเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนในรูปของ NH_4NO_3, $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ (ไนโตรเจนร้อยละ 0.015) ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมโพลีเปปโตนไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ค่ากิจกรรม xylanase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติม NH_4NO_3 ให้ได้ระดับความเข้มข้น 0.60 กรัม/ลิตร อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ ได้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุด เท่ากับ 1.34 และ 17.93 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 23 กรัม/ลิตร และมีปริมาณโปรตีนของมวลชีวภาพเท่ากับร้อยละ 21

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงแบบอาหารแข็งในกากปาล์ม พบว่าการใช้กากปาล์ม

ที่ผ่านการบดด้วย ball mill ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้กากปาล์มที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ กากปาล์มบดที่ผ่านการแปรสภาพด้วยด่าง และกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยความร้อน ตามลำดับ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือยูเรียร้อยละ 2.0 รองลงมาตามลำดับ คือการใช้ยูเรียร้อยละ 1.0 และการใช้รำข้าวสาลีในอัตราส่วน กากปาล์ม : รำข้าวสาลี 2 : 1 เชื้อให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 และ 60 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต CMCase และ xylanase ของเชื้อ คืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม และพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5-5.0 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เชื้อผลิตเอนไซม์ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุด เท่ากับ 23.8 และ 282.9 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนของมวลชีวภาพเท่ากับร้อยละ 17.70 ต่อน้ำหนักแห้ง

ดังนั้นกิจกรรมของ CMCase และ xylanase ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งในกากปาล์ม จะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ประมาณ 17 เท่า และ 15 เท่าตามลำดับ

Thesis title Production of Cellulase and Xylanase from Palm Oil Mill Wastes by *Aspergillus niger* ATCC 6275

Author Miss Aree Kunghae

Major program Biotechnology

Academic year 1992

Abstract

Investigations were carried into the use of effluent and palm cake from palm oil mill for the production of cellulase and xylanase using submerged and solid-state cultivation of *Aspergillus niger* ATCC 6275

Submerged cultivation of *A. niger* in palm oil mill effluent revealed that the addition of ground palm cake pretreated with alkali (0.3 N NaOH), heat (121 °C for 1 hr) or ball milling did not improve enzyme production. The addition of different nitrogen sources (0.015% nitrogen) in the form of NH_4NO_3, $NaNO_3$ and $(NH_4)_2SO_4$ was found to stimulate CMCase as well as xylanase formation. In the presence of 0.60 g/l NH_4NO_3, maximal activities were obtained with values of 1.34 and 17.93 U/ml respectively together with a dry biomass of 23 g/l containing 21% protein.

The optimization for CMCase and xylanase production from palm cake using the solid-state cultivation technique revealed that ball-milled pretreated palm cake exhibited higher enzyme

activities compared to ground, alkali or heat pretreated ground palm cake. The optimal nitrogen source was 2% urea, followed by 1% urea and a 2:1 mixture of palm cake and wheat bran. Optimal initial moisture contents were 50% in the case of CMCase and 60% for xylanase; with a temperature optimum of 35 °C for CMCase and room temperature (30 °C) for xylanase. The activities of both enzymes dropped sharply above 40 °C. The optimal inoculum size was 10^8 spores/g palm cake and an initial pH of 4.5-5.0. Under these optimum conditions, *A. niger* ATCC 6275 produced the highest CMCase activity of 23.3 U/g and xylanase activity of 282.9 U/g palm cake.

The production of CMCase and xylanase achieved from solid state cultivation of palm cake was far superior to the submerged cultivation using palm oil mill effluent and was 17 fold higher for CMCase and 16 fold in the case of xylanase.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ดร.สุกัญญา จันทะชุม กรรมการผู้แทนภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณ บริษัทเร็กซ์ออยล์ (ไทยแลนด์) จำกัด และโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวัตถุดิบ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ขอขอบพระคุณพี่ ๆ และขอบคุณน้อง ๆ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณ คุณสมศักดิ์ ฤทธิบูรณ์ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อารี กังแฮ

สารบาญ

	หน้า
รายการตาราง	ช
รายการรูป	ฌ
1. บทนำ	1
2. การตรวจเอกสาร	3
1. ที่มาและองค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม	3
2. ลิกโนเซลลูโลส	4
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส	11
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราในอาหารเหลวและอาหารแข็ง	13
4.1 แหล่งคาร์บอน	13
4.2 แหล่งไนโตรเจน	20
4.3 เกลือแร่	23
4.4 การแปรสภาพ (pretreatment) วัตถุดิบ	23
4.5 พีเอช	27
4.6 อุณหภูมิ	29
4.7 การให้อากาศ	29
4.8 การกวน	31
4.9 ปริมาณความชื้น	31
4.10 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	32
3. วัตถุประสงค์	35
4. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	36
วัสดุ	36
อุปกรณ์	37

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการ	38
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	40
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	42
5. ผลการทดลองและวิจารณ์	44
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	44
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	66
6. สรุป	92
7. เอกสารอ้างอิง	93
8. ภาคผนวก	103
ก อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	104
ข วิธีการวิเคราะห์	105
1. ความชื้น	105
2. น้ำหนักเซลล์แห้ง	105
3. ปริมาณโปรตีนของมวลชีวภาพ	106
4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสและไซโลส	108
ค ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ	113

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้ง	5
2	องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มจากส่วนน้ำทิ้งของหม้อฆ่าเชื้อ (condensate) และส่วนที่ออกจากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter) หรือเครื่องเหวี่ยง (centrifuge)	6
3	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้ง (POME) จากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ต่อน้ำหนักแห้ง)	7
4	เปรียบเทียบองค์ประกอบของแร่ธาตุของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ต่อน้ำหนักแห้ง)	8
5	องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดในปาล์ม (ต่อน้ำหนักแห้ง)	9
6	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Penicillium funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว	14
7	กิจกรรมเซลลูเลสของ *Cellulomonas* sp. ATCC 21399	16
8	กิจกรรมเซลลูเลสและโปรตีนของ *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ต่าง ๆ	17
9	การผลิตเอนไซม์โดย isolate cf-27 ระหว่างการเจริญในอาหารที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน	18
10	การผลิตเอนไซม์โดยการหมักกากปาล์มแบบอาหารแข็ง	19
11	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมเซลลูเลสของ *Penicillium funiculosum* UV-49	22

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	วิธีการแปรสภาพเซลลูโลส	24
13	การผลิตเซลลูเลสโดย *Trichoderma reesei* 2 สายพันธุ์ (QMY 1 และ Rut C-30) บนฟางข้างสาลี (WS) และ aspen pulp ที่เตรียมโดยกระบวนการ chemithermomechanical (CTMP)	25
14	พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	28
15	กิจกรรมเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสของเชื้อรา	34

ตารางภาคผนวกที่

ค1	ผลของการเติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	113
ค2	ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	114
ค3	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	115
ค4	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	116

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ค5	ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	117
ค6	ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	118
ค7	ผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A.niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	119
ค8	ผลของการให้อากาศต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	120
ค9	ผลของการแปรสภาพกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	121
ค10	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	122
ค11	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	123
ค12	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	124
ค13	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	125

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
ค14	ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	126
ค15	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	127

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	Time course ของการผลิตเอนไซม์ CMCase จากการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ	45
2	Time course ของการผลิตเอนไซม์ xylanase จากการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ	46
3	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ	47
4	ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	49
5	ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	50
6	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ที่เติมกากปาล์มที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	51
7	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	52

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
8	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	53
9	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ	55
10	ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	56
11	ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0	57
12	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	59
13	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในฟลาสก์ ภายใต้สภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม	60
14	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	61

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	62
16	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการให้อากาศในอัตราต่าง ๆ	64
17	ผลของการให้อากาศต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร	65
18	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มในถังหมักขนาด 2 ลิตร และมีการให้อากาศ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที	67
19	ผลของการใช้กากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิต เอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	68
20	ผลของการใช้กากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิต เอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงใน กากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	69
21	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่ผ่าน การแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ	71

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	ผลของชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	72
23	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	73
24	ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม เป็นเวลา 9 วัน (รูป ก) และ 3 วัน (รูป ข) สำหรับค่าสูงสุดของ CMCase และ xylanase ตามลำดับ	75
25	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	76
26	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	77
27	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม ที่ระดับความชื้นเริ่มต้นต่าง ๆ	79
28	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	80
29	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม	81

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
30	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	82
31	ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง	83
32	ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง	84
33	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม โดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่าง ๆ	86
34	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง	87
35	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง	88
36	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ	89
37	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม	91
รูปผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	111
ข2	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	112

บทนำ

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) มีชื่อทางพฤษศาสตร์ว่า *Elaeis quineensis* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา ปาล์มน้ำมันเข้ามาในทวีปเอเชียครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซีย จากนั้นจึงนำเข้ามายังประเทศมาเลเซีย ซึ่งกลายเป็นผู้ส่งออกปาล์มน้ำมันรายใหญ่ที่สุดของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531) สำหรับประเทศไทยนำเข้ามาปลูกครั้งแรกเป็นไม้ประดับที่สถานีการยางคอหงส์ จังหวัดสงขลาและสถานีกสิกรรมพริ้ว จังหวัดจันทบุรี โดยเรียกว่ามะพร้าวหัวลิง ส่วนทางใต้เรียกว่าหมากมัน ในปี พ.ศ. 2511 มีการปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าครั้งแรกที่จังหวัดกระบี่และจังหวัดสตูล โดยนำพันธุ์มาจากมาเลเซียทั้งหมด ต่อมาปลูกกันอย่างแพร่หลายในอีกหลายจังหวัด ได้แก่ ตรัง สุราษฎร์ธานี ชุมพร ภูเก็ต สงขลา และประจวบคีรีขันธ์ นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 เป็นต้นมา พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นร้อยละ 12.29 ต่อปี (ชวาลวุฒ ไชยนุวัติ, 2534) จนกระทั่งปี พ.ศ.2533 มีพื้นที่ปลูกน้ำมันทั้งสิ้น 861,630 ไร่ ซึ่งนอกจากมีปลูกทางภาคใต้แล้วยังมีปลูกทางภาคตะวันออกและภาคตะวันตกอีกด้วย ข้อมูลจากคณะสำรวจที่ประสานงานโดยกรมส่งเสริมการเกษตร พบว่าปี พ.ศ. 2534 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน 975,500 ไร่ ได้รับผลผลิตเฉลี่ย 2,160 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี คิดเป็นผลผลิตปาล์มสดทั้งทะลายประมาณ 1,408,420 ตันหรือสกัดเป็นน้ำมันปาล์มดิบได้ 255,910 ตัน แบ่งเป็นน้ำมันจากผลปาล์ม 239,430 ตัน และจากเมล็ดในปาล์มจำนวน 16,480 ตัน

ปี พ.ศ.2529 มีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบ 34 โรงและโรงงานกลั่นน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 13 โรง (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531) การผลิตน้ำมันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นผลที่ตามมา คือมีวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันเพิ่มขึ้น วัสดุเศษเหลือเหล่านี้ส่วนที่เป็นของแข็ง ได้แก่ ทะลายเปล่า (empty bunches) เปลือกผลปาล์ม (pericarp fibre) กะลาผลปาล์ม (palm shell) กากเนื้อผลปาล์ม (palm kernel cake) และส่วนที่เป็นของเหลว คือน้ำทิ้ง (effluent)

วัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงเช่น

ทะลายเปล่าใช้เป็นเชื้อเพลิง (Kirkaldy and Sutanto,1976) คลุมต้นไม้ เป็นปุ๋ยโปแตส และในส่วนของเส้นใยใช้ทำกระดาษ (Okiy,1987) จากการสำรวจโรงงานปาล์มน้ำมันในเขตจังหวัดภาคใต้ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) มีการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์โดยตรง คือ ทะลายปาล์มเปล่า เส้นใย และเศษกะลาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อกำเนิดไอน้ำ เถ้าจากการเผาทะลายปาล์มเปล่าใช้เป็นปุ๋ย กากผลปาล์มเป็นอาหารสัตว์ เส้นใยจากกากผลปาล์มใช้เพาะเห็ด และสลัดจ์ใช้เป็นวัสดุคลุมดินและปุ๋ย ส่วนน้ำทิ้งใช้รดต้นปาล์มในกรณีที่โรงงานมีสวนปาล์มเอง และนอกจากนี้เศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์บางกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อราสามารถย่อยสลายได้และผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า คือมวลชีวภาพ (biomass) (Greenshields, 1981; Barker and Worgan, 1981; Barker, *et al.*, 1981; Moi, 1987 และ Okiy, 1987) แก๊สชีวภาพ (Chua and Gain, 1986; Cheah, *et al* .,1988) และเอนไซม์ (Cheah and Oil, 1984; Cheah and Ooi, 1985; Cheah, *et al* .,1988 และ Agamuthu and Tan, 1985)

งานวิจัยนี้จึงนำวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์มมาเป็นสับสเตรตเพื่อการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 จึงนับเป็นแนวทางการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง

การตรวจเอกสาร

1. ที่มาและองค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จังหวัดสตูล และจังหวัดสุราษฎธานี แบ่งได้ 2 ประเภท คือการผลิตแบบไม่ใช้น้ำและแบบใช้น้ำ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) การผลิตแบบไม่ใช้น้ำ ใช้ความร้อนจากฟืนในการอบผลปาล์ม วัสดุเศษเหลือมีเพียงอย่างเดียว คือกากปาล์มซึ่งขายเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ Bek-Nielson (1987) พบว่ากากปาล์มที่ได้มีน้ำมันเหลืออยู่ร้อยละ 6-8 ส่วนการผลิตแบบใช้น้ำ มีการใช้ไอน้ำในการอบทะลายปาล์มหรือผลปาล์มเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาลิโปไลซีส (lipolysis reaction) ที่จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์ม และไอน้ำยังทำให้ผลปาล์มอ่อนนุ่มสะดวกต่อการหีบและชั้วผลหลุดจากทะลายได้ง่าย จากกระบวนการผลิตจะมีน้ำทิ้งจาก 2 ขั้นตอน คือน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อและน้ำทิ้งจากเครื่องแยกไขมัน น้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อมีประมาณ 200 ลิตรต่อ 10,000 กิโลกรัมทะลายปาล์ม คิดเป็นร้อยละ 2 (ปริมาตรโดยน้ำหนัก) ของทะลายปาล์ม Hwang และคณะ (1978) รายงานว่าปริมาณน้ำทิ้งทั้งหมดเป็นร้อยละ 60 ของปริมาณทะลายปาล์ม และมีน้ำมันร้อยละ 2 ปนอยู่ในน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ Okiy (1987) รายงานว่าน้ำเสียคิดเป็นร้อยละ 13 ของผลปาล์มสดทั้งทะลาย ส่วน Cheah และคณะ (1988) รายงานว่าน้ำทิ้งมีปริมาณ 2.5-3.0 เท่าของปริมาณน้ำมันที่ผลิตได้

นอกจากนี้ยังมีวิธีการสกัดน้ำมันโดยการทอดผลปาล์ม วิธีการริเริ่มและใช้กันเฉพาะที่โรงงานแห่งหนึ่งในจังหวัดตรัง และที่โรงงานต้นแบบในโครงการพระราชดำริที่จังหวัดกระบี่ (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ,2531) แต่น้ำมันที่ผลิตได้มีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานเนื่องจากกรดสูงและสีดาย เนื่องจากไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิการทอดผลปาล์มได้ ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงเป็นกระบวนการทอดผลปาล์มในสุญญากาศ (โครงการส่งเสริมอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มขนาดเล็กอันเนื่องมาจากพระราชดำริ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2534) เป็นการทอดโดยใช้ความร้อนจากน้ำมันเทอร์มันออยล์ (thermal oil) และทำ

การทอดภายใต้สุญญากาศ 600 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งอุณหภูมิการทอดจะต่ำเหลือเพียง 90-100 องศาเซลเซียส และไม่มีอากาศ (ออกซิเจน) ในระหว่างการทอด อีกทั้งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ตลอดเวลาด้วย จึงทำให้น้ำมันปาล์มมีสีได้มาตรฐาน ทอดได้ครั้งละ 1 ตันผลปาล์มสด ใช้เวลาทอด 92 นาทีต่อครั้ง ผลปาล์มที่ทอดแล้วนำมาหีบน้ำมันปาล์มได้ประสิทธิภาพสูงถึงร้อยละ 33 ของน้ำหนักผลปาล์มสด และกากปาล์มมีลักษณะเป็นแผ่นสีสวยและแห้งสนิท

คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์มจากบ่อรวบรวมน้ำเสีย (ตารางที่ 1) องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม จากส่วนน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อ (condensate) และส่วนที่ออกจากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter) หรือเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ ของโรงงานมีค่า BOD (biochemical oxygen demand) และCOD (chemical oxygen demand) สูง รวมทั้งค่ากรดไขมันระเหย ปริมาณของแข็งทั้งในรูปสารที่ระเหยได้และสารแขวนลอย (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ,2533) พารามิเตอร์เหล่านี้ล้วนบ่งชี้ให้เห็นแนวโน้มที่น้ำทิ้งเหล่านี้จะก่อให้เกิดปัญหาด้านมลภาวะ นอกจากนี้น้ำทิ้งประกอบด้วยอินทรียสารและแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สำคัญ (Okiy, 1987) แสดงดังตารางที่ 3 และ Hwang และคณะ (1987) ได้แสดงองค์ประกอบของแร่ธาตุในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม (ตารางที่ 4) ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดในปาล์ม (Okiy, 1987) แสดงดังตารางที่ 5

2. ลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

2.1 เซลลูโลส

เป็นสารประกอบพวกโพลีแซคคาไรด์ที่มีมากในผนังเซลล์ของพืช โครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยกลูโคสหลายๆหน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาว

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้ง

Parameters	1	2	3	4	Ranges	Reference*
Color	Dark brown	Dark brown	Dark brown	Dark brown	Dark brown	Dirty
pH	4.05	4.45	4.34	4.62	4.05-4.62	3.0-4.5
BOD	>50,000	54,750		60,000	54,750-60,000	22,500-38,000
COD	115,934	83,916	82,013	80,523	80,523-115,934	42,000-81,300
Volatile acid (as acetic acid)	5,870	3,128	4,883	5,438	3,128-5,870	2,100-5,700
Alkalinity (as $CaCO_3$)	200	68.5	80.5	180	68-200	270-650
Grease		16.7	2,449	1,165	16-2,449	18,000-52,700**
Total solids (TS)	88,508	61,222	49,453	82,582	49,453-88,508	37,800-71,600
Volatile solids(VS)	81,872	52,655	42,063	76,004	42,063-81,872	31,200-56,700
Suspended solid(SS)	52,000	30,000	18,500	27,800	18,500-52,000	12,700-51,000
Nitrogen ammonia	53.5	27.3	27.9	61.8	27-61	17-31
organic		551.6	817	1,172	551-1,172	670-900

หมายเหตุ ค่าทุกค่ามีหน่วย มก./ล. ยกเว้นสีและพีเอช

1,2,3 และ 4 โรงงานปาล์มน้ำมันที่จังหวัดสงขลา สตูล สุราษฎร์ธานี และกระบี่ ตามลำดับ

* Edewor. J.O. 1986. J.Chem.Tech. Biotechnol. 36 : 212-218

** เป็นค่า oil

ที่มา : พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม จากส่วนน้ำทิ้งของหม้อฆ่าเชื้อ (condensate) และส่วนที่ออกจากเครื่องสกัดแยกน้ำมัน (decanter) หรือเครื่องเหวี่ยง (centrifuge)

Parameter	1		2		3		Reference*	
	Condensate	Decanter effluent	Condensate	Centrifugal effluent	Condensate	Sludge	Condensate	Sludge
Color	Blackish brown	brown	Orange brown	Blackish brown	Dark brown	Brown		
pH	5.12	4.61	5.35	4.89	4.89	4.84	4.6	4.6
BOD	31,620	21,000	22,800	45,375	41,985	68,550	23,300	23,600
COD	75,696	38,246	45,360	67,567	80,146	105,955	51,000	76,500
Volatile acid (as acetic acid)	3,150	1,838	998	2,273	7,125	5,355		
Alkalinity(as $CaCO_3$)	1,576	480	37.5	86.5	320	200		
Grease			20.9	4.7	1,165	1,103		
Total solids(TS)	54,546	25,634	26,367	47,242	76,733	118,570	43,500	42,800
Volatile solids(VS)	44,354	23,056	24,415	39,617	67,635	108,590		
Suspended solids(SS)	2,600	2,900	6,100	20,300	3,050	40,000	6,800	27,500
Nitrogen ammonia	43.5	23.0	7.7	22.8	66.3	61.6		
organic	-	-	22.4	518.5	1,287	1,352		
Total			30.1	541.3	1,353	1,413	600	600

หมายเหตุ ค่าทุกค่ามีหน่วย มก./ล. ยกเว้นสีและพีเอช

1,2,3 คือ โรงงานปาล์มน้ำมันที่จังหวัดสงขลา สตูล และกระบี่ ตามลำดับ

* Barker & Worgan. 1981. Eur. J. Appl. Microbiol. Boitechnol. 11: 234-240

ที่มา : พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้ง (POME) จากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ต่อน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	ร้อยละ
ether extract	31.60
protein (Nx 6.25)	8.20
ash	14.10
fibre	11.90
N-free extract	34.20
P	0.24
K	0.99
Ca	0.97
Mg	0.30
Na	0.08
gross energy (Kcal/100g)	454.00

ที่มา : Okiy (1987)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบองค์ประกอบของแร่ธาตุของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)

mineral	Muthuajah (1976)* sludge	Rajagopalan & Webb (1975)* sludge	Wood (1977)* mixed effluent	Hwang และคณะ(1978) sludge	condensate
N	2.08	1.66	1.60	1.73	1.83
P	0.42	0.31	0.28	0.31	0.36
K	3.96	-	4.15	3.10	3.09
Na	-	-	0.10	0.06	0.05
Mg	1.04	0.01	0.77	1.88	2.41
Ca	0.42	0.78	0.77	0.21	0.33
Cr	-	-	0.0005	-	-
Mn	-	0.008	0.008	-	-
Fe	-	-	0.31	0.10	0.04
Co	-	-	0.0003	-	-
Cu	-	0.003	0.0003	0.05	0.07
Zn	-	0.006	0.005	0.025	0.035
Cd	-	-	$3x10^{-5}$	-	-

* มีการนำมาคิดคำนวนใหม่

- ไม่ได้วิเคราะห์ผล

ที่มา : Hwang และคณะ (1978)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของกากเมล็ดในปาล์ม (palm kernel cake) (ต่อน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	ร้อยละ
oil	14.3
protein	17.6
ash	3.0
fibre	15.7
nitrogen-free extract	49.4
gross energy (Kcal/100g)	396.7

ที่มา : Okiy (1987)

ด้วยพันธะแบบ bata-glucosidic มีโครงสร้างทางเคมีเป็น $[C_6H_{10}O_5]_n$ (Goodwin and Mercer, 1972) และโมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงกันอยู่เป็นมัด ๆ (fibril) และเมื่อนำแต่ละมัดมาขยาย พบว่าประกอบด้วยส่วนที่อยู่รวมกันเป็นกระจุก เรียกว่า crystalloid และส่วนที่อยู่รวมกันแบบหลวม ๆ เรียกว่า amorphous regions (Goksoyr and Eriksen,1980) เซลลูโลสไม่ละลายน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารละลายด่าง แต่ละลายในกรด เมื่อสลายตัวโดยสมบูรณ์ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นไดแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์อื่นๆ

2.2 เฮมิเซลลูโลส

เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก คือ ดี-ไซโลส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส และแอล-อะราบิโนส โดยมีสายโซ่ (side chain) คือ 4-O-methyl-D-glucuronic acid เชื่อมกันด้วยพันธะ beta-glucosidic การแบ่งชนิดของเฮมิเซลลูโลสจึงแบ่งตามชนิดของน้ำตาล ได้แก่ ไซแลน แมนแนน กาแลคแทน และอะราบิแนน เป็นต้น

Goodwin และ Mercer (1972) รายงานว่า ไซแลนของพืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน จะต่างกันเฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่งของสายโซ่ ซึ่งมีสายโซ่ ได้แก่ D-xylopyranose, L-arabinose, furanose หรือ D-glucoronic และคุณสมบัติโดยทั่วไปของไซแลน คือไม่ละลายน้ำ ละลายในด่างได้ดีกว่าในกรด

2.3 ลิกนิน

เป็นพวก polyphenylpropanoid ที่มาจากการ polymerize ของ p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol หรือ sinapyl alcohol พันธะที่พบภายในโครงสร้างหลักนั้นมีมากกว่า 10 ชนิด และพันธะที่สำคัญ คือพันธะเอสเตอร์ (C-O-C) ซึ่งจะทนต่อการถูกย่อยสลายด้วยกรด นอกจากนี้ยังพบพันธะคาร์บอน (C-C) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง เป็นเหตุให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง

3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

3.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีน มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีน เท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์หรือโลหะอื่นในการเข้าทำปฏิกิริยา เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ส่วน ซึ่ง Enari (1983) รายงานไว้ดังนี้

3.1.1 endoglucanase (1,4-beta-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย beta-1,4 glucosidic linkage แบบสุ่มได้กลูโคส เซลโลไบโอส เซลโลไตรโอส ไม่ย่อยเซลโลไบโอส แต่ย่อยเซลโลเดกซ์ตริน เซลลูโลสที่ทำให้ฟองตัวด้วยกรดฟอสฟอริก คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) และไฮดรอกซีเอทธิลเซลลูโลส (HEC) และสามารถย่อยเซลลูโลสรูปผลึก (crystalline cullulose) ได้ด้วย ความจำเพาะของเอนไซม์ไม่สูงมากนัก วิเคราะห์เอนไซม์นี้ได้โดยใช้ CMC และ HEC เป็นสับสเตรต

3.1.2 cellobiohydrolase (1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end ของเส้นสาย ได้เซลโลไบโอส มีความจำเพาะสูงกว่า endoglucanase ย่อยเซลโลเดกซ์ตรินแต่ไม่ย่อยเซลโลไบโอส การวิเคราะห์เอนไซม์นี้ใช้สำลี อวิเซล และ amorphous cellulose เป็นสับสเตรต

3.1.3 beta-glucosidase (beta-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอส และเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้กลูโคส แต่ไม่ย่อยเซลลูโลส หรือ เซลโลเดกซ์ตริน วิเคราะห์เอนไซม์นี้โดยใช้เซลโลไบโอส p-nitrophenyl- beta-D-glucoside หรือซาลิซิน (salicin) เป็นสับสเตรต

Toussaint และBataille (1985) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสประกอบด้วยเอนไซม์ที่ทำกิจกรรม 3 อย่าง คือ cellobiohydrolase (CBH) Cx

activity ซึ่งมี endo-beta-1,4 glucanase และ exo-beta-1,4 glucan glucohydrolase เพื่อที่จะย่อยเซลลูโลสรูปผลึกได้เซลโลไบโอส จากนั้น beta-glucosidase เปลี่ยนเซลโลไบโอสได้กลูโคส

3.2 เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส

เป็นเอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขาและประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์มีอยู่หลายชนิดด้วยกัน จากองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่ส่วนใหญ่เป็นพวก ดี-ไซแลน เอนไซม์หลักที่สำคัญต่อการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (Rogalski, *et al.*, 1985)

3.2.1 endo-1,4-beta-D-xylanase (1,4-beta-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) ทำการย่อยสลายพันธะ 1,4-glucosidic ของ beta-D-xylopyranoside ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไซแลนและให้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอส วิเคราะห์เอนไซม์นี้ด้วยไซแลน

3.2.2 exo-1,4-beta-D-xylosidase (1,4-beta-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37) ย่อยสลายไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์และไซโลไบโอสออกมาได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลส การทดสอบเอนไซม์นี้ใช้ p-nitrophenyl-beta-D-xyloside เป็นสับสเตรต

นอกจากเอนไซม์กลุ่มหลัก 2 กลุ่มใหญ่ๆแล้ว เพื่อให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์อีกหลายชนิด ได้แก่

3.2.3 L-arabinanase เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลาย (1->3) และ (1->5)-2-L-arabino-furanosyl residue แล้วให้แอล-อะราบิโนสออกมา เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเป็นทั้ง exo- และ endo-L-arabinanase เอนไซม์กลุ่มนี้จำเพาะต่อสับสเตรตที่อยู่ในรูปของ furanoside แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่อยู่ในรูป pyranoside (Kaji, *et al.*,1967)

3.2.4 D-galactanase เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อย D-galactan และ L-arabino-D-galactan

3.2.5 D-mannanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย (1->4) beta-D-mannanopyranosyl linkage ของดี-แมนแนน, ดี-กลูโค-ดี-แมนแนน และดี-กาแลคโต-ดี-แมนแนน

3.2.6 acetyl esterase ในโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสตรงตำแหน่งของคาร์บอนตัวที่ 2 และ 3 ของสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสจะมีกลุ่มของ acetyl เกาะอยู่ ในการย่อย acetyl ออกจากสายโพลีเมอร์ของไซโลสจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ esterase เข้าช่วย

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง

4.1 แหล่งคาร์บอน

มีการผลิตเซลลูเลสโดยใช้เซลลูโลสในธรรมชาติ เช่น ฟางข้าวสาลี (Doppelbauer, *et al.*, 1987) กากชานอ้อย (Kawamori, *et al.*, 1986) เศษกระดาษหนังสือพิมพ์ (Shu Chen and Wayman, 1991) และน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อโรงงานน้ำมันปาล์ม (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534)

Joglekar และ Karanth (1984) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อ *Penicillium funiculosum* UV-49 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่ากิจกรรมของ carboxymethylcellulase activity (CMCase) และ filter paper activity (FPA) ดีเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มี susceptible cellulose (CP100, CP123, solka floc SW40 และ solka floc BW200) เป็นแหล่งคาร์บอน โดย CP-100 เป็นสับสเตรตที่ดีที่สุด (ตารางที่ 6) ส่วนการเจริญในฝ้าย กระดาษกรอง กากชานอ้อย ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการบำบัดด้วยด่าง ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ ในพวกเซลลูโลสรูปผลึกมีเพียง Avicel PH 101 ที่ให้ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ดีพอควร คือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 12 วัน ให้ค่ากิจกรรม

ตารางที่ 6 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Penicillium funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว

Carbon Source	Activity at given time period			
	8 day		12 day	
	CMCase (IU/ml)	FPA (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	FPA (IU/ml)
Susceptible cellulose				
CP.100	10.0	1.3	13.3	1.4
CP.123	10.0	0.9	8.7	1.1
Solka floc SW 40	5.0	0.7	7.5	0.8
Solka floc BW 200	4.5	0.5	8.7	1.2
Crystalline cellulose				
Avicel PH 101	7.3	1.0	8.0	0.8
Cotton	1.5	0.1	1.3	0.1
Soluble carbon				
Sodium salt of CMC	2.3	0.2	2.3	0.2
Filter paper				
Whatman No. 1	0.7	0.1	0.8	0.1
Natural cellulose				
Bagasse	0.8	0.1	-	0.1
Alkali-treated substrates				
Cotton	2.7	4.0	4.0	0.5
Bagasse	3.6	0.3	3.7	0.3
Fillter paper	0.7	-	2.8	0.3

ที่มา : Joglekar และ Karanth (1984)

CMCase และ FPA เท่ากับ 0.8 และ 0.8 ยูนิต/มล. ตามลำดับ

Chahal (1985) เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma reesei* QMY 1 ในอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีต่างกัน คือร้อยละ 1.0 (เซลลูโลสร้อยละ 0.4) และร้อยละ 5.0 (เซลลูโลสร้อยละ 2.0) พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุดในฟางข้าวสาลีร้อยละ 1.0 เท่ากับ 1.65 ยูนิต/มล. ได้ผลผลิตของเซลลูเลสเท่ากับ 412 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟางข้าวสาลีเป็นร้อยละ 5.0 เวลาการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 7 วัน เป็น 11 วัน กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเป็น 6.0 ยูนิต/มล. แต่ผลผลิตของเซลลูเลสลดลงเป็น 300 ยูนิต/กรัมเซลลูโลส ซึ่งการลดลงของผลผลิตอาจจะเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นน้อยในสารละลายที่เข้มข้นมาก

Wase และคณะ (1985) เลี้ยง *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 แบบอาหารเหลวในฟลาสก์โดยใช้ฟางข้าวบดความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 5.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ ฟางข้าวบดร้อยละ 4.0 ให้กิจกรรมของ beta-D-glucosidase, endo-1,4-beta-D-glucanase และ D-xylanase สูงสุดในวันที่ 6 หรือ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 5.88, 3.24 และ 67.65 ยูนิต/มล. ตามลำดับ

Cheah และ Ooi (1985) เลี้ยง *Cellulomonas* sp. ATCC 21399, *T. reesei* 3 สายพันธุ์ และเชื้อรา cf-27 ใน steriliser condensate medium และ Mandel minimal medium พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสที่ได้จากเชื้อ *Cellulomonas* sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดมีค่าต่ำมาก (ตารางที่ 7) ส่วนค่า FPA ที่ได้จาก *T. reesei* มีค่าค่อนข้างต่ำโดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงใน steriliser condensate medium (ตารางที่ 8) ส่วนเชื้อรา cf-27 มีค่ากิจกรรม CMCase เท่ากับ 11.38 และ 11.05 ยูนิต/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 30.3 และ 19.7 ตามลำดับ

Cheah และคณะ (1988) ผลิตเซลลูเลสจากกากปาล์ม โดยเลี้ยงเชื้อรา cf-27 ในอาหารเหลว (ตารางที่ 9) และอาหารแข็ง (ตารางที่ 10) พบว่าเชื้อนี้ไม่

ตารางที่ 7 กิจกรรมเซลลูเลสของ *Cellulomonas* sp. ATCC 21399

medium	cellulase activity [c]	
	filter peper activity[d]	CM-cellilase activity[e]
minimal medium[a]	8.5×10^{-3}	0.75
sterilliser condensate medium [b]	1.1×10^{-3}	0.39

[a] minimal medium ประกอบด้วย basal salts mixture (Han and Srinivasan, 1968) เติมด้วยยีสต์สกัดร้อยละ 0.005 กระดาษกรอง Whatman No.1 0.2 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอน

[b] steriliser condensate medium : steriliser condensate (เจือจาง 5 เท่า) + ยูเรีย 0.3 กรัม/ลิตร + $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 1.2 กรัม/ลิตร + $MgSO_4$ 0.6 กรัม/ลิตร + กระดาษกรอง Whatman No.1 0.2 กรัม

[c] cellulase activity วัดเป็น μmole glucose/ml culture filtrate/hr

[d] reducing sugar หาโดยวิธี ferricyanide (Bergmeyer,*et al.*,1984)

[e] reducing sugar หาโดยวิธี Miller (1959)

ที่มา : Cheah และ Ooi (1985)

ตารางที่ 8 กิจกรรมเซลลูเลสและโปรตีนของ *T. reesei* สายพันธุ์ต่าง ๆ

อาหาร[a]	cellulase activity[b]			% crede protein ในมวลชีวภาพ			
	QM9414	QM9123	NQ14	QM9414	QM9123	NQ14	control[c]
Mandels minimal medium	0.56	0.41	0.32	20.3	19.1	17.8	
SC เจือจาง 5 เท่า	0.10	0.10	0.08	12.9	9.7	10.6	0.6
SC เติมไนโตรเจน[d]	0.06	0.04	0.06	28.5	28.5	16.9	0.4
SC เติมไนโตรเจน, ฟอสเฟต[e] และซัลเฟต[f]	0.08	0.03	0.04	27.5	20.0	17.2	1.25

[a] อาหารทุกสูตรมีเซลลูโลสร้อยละ 0.75 เป็นแหล่งคาร์บอน

[b] FP unit ต่อ ml culture filtrate เหมือนใน Mandels และคณะ (1976)

[c] ไม่มีการถ่ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ

[d] เติมไนโตรเจน คือ ยูเรีย 0.3 กรัม/ลิตร และ $(NH_4)_2 SO_4$ 1.4 กรัม/ลิตร

[e] เติมฟอสเฟต คือ KH_2PO_4 12 กรัม/ลิตร

[f] เติมซัลเฟต คือ $MgSO_4$ 0.6 กรัม/ลิตร

ที่มา : Cheah และ Ooi (1985)

ตารางที่ 9 การผลิตเอนไซม์โดย isolate cf-27 ระหว่างการเลี้ยงในอาหารที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

enzyme	enzyme activity[1]	
	CPM[2]+fibre[3]	SC[4]+fibre
Filter paper activity (FPase)[5] (FP unit/ml)	0.51	0.43
CMC Cellulase (CMCase) (µ moles glucose/ml/mim)	29.8	30.60
Cotton-Wool activity (CWase) (µ moles glucose/ml/hr)	3.6	4.90
Avicelase activity (µ moles gludose/ml/hr)	5.3	8.80
% crude protein	14.7	15.3

[1] กิจกรรมของเอนไซม์ทำการวิเคราะห์เมื่อทำการเลี้ยงได้ 7 วัน

[2] CPM = Mandels minimal medium

[3] ความเข้มข้นของเส้นใยในอาหารร้อยละ 3 ปริมาณโปรตีนของเส้นใยร้อยละ 11

[4] SC = sterilliser condensate meidium

[5] filter peper activity ในกระดาษกรอง (FP units/ml culture filtrate (Mandels, *et al.*,1976)

ที่มา : Cheah และคณะ (1988)

ตารางที่ 10 การผลิตเอนไซม์โดยการหมักกากปาล์มแบบอาหารแข็ง[1]

enzyme	Isolate cf-27	*T. reesei*		
		QM 9414	MCG 77	Rutc-30
FPase	0.0	0.97	0.61	2.34
CWase	0.0	25.31	30.50	44.07
CMCase	2.88	16.74	20.90	32.88
beta-glucosidase[2]	0.0	0.08	0.11	0.05
xylanase[3]	0.0	111.20	184.00	97.70

[1] กากปาล์มที่มีการเพิ่ม 10 x Mandels minimal medium โดยอัตราส่วน fibre : medium = 1:1 หลังการเลี้ยง 7 วัน กิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นต่อ 1 มล.ของสารที่สกัด

[2] กิจกรรมคิดจาก p-nitrophenol เป็นไมโครโมลที่ปล่อยต่อมล.ต่อนาที

[3] กิจกรรมคิดจากไซโลสเป็นไมโครโมลต่อมล.ต่อนาที

ที่มา : Cheah และคณะ(1988)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่ *T. reesei* สายพันธุ์ QM 9414, MCG 77 และ Rut C-30 สามารถผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสได้สูงระหว่างการเจริญบนกากปาล์ม

การเติมกลูโคสร้อยละ 0.01-0.02 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยในการเจริญของเชื้อในช่วงต้น แต่ไม่เพิ่มการผลิตเอนไซม์ (Shewale and Sadana, 1978) ส่วนการใช้กลูโคสร้อยละ 1.0 เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา cf-27 พบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสถูกยับยั้ง (Cheah and Ooi, 1984)

4.2 <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

Coutts และ Smith (1976) เลี้ยงเชื้อ *Sporotrichum thermophile* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ $NH_4H_2PO_4$, $NaNO_3$, NH_4NO_3 และยูเรีย พบว่า $NaNO_3$ และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และ $NaNO_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสไม่แตกต่างกัน

Raimbault และ Alazard (1980) หมัก *A. niger* ในแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ายูเรียในอัตราส่วนร้อยละ 40-50 ของไนโตรเจนทั้งหมดจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา ซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน การใช้คาร์โบไฮเดรตมีมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนของยูเรียเพิ่มขึ้น และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลต่อพีเอช คือการใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อราเจริญจะเกิดกรดอย่างรวดเร็ว ทำให้การเจริญหยุดชะงัก

นอกจากนี้ Forage และ Righelato (1979) ชี้ให้เห็นว่าการลดลงของพีเอช เมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนขึ้นกับการสะสมอนุมูลของซัลเฟอร์

Barker และคณะ (1981) เลี้ยง *Aspergillus oryzae* ในน้ำทิ้งจากการอบทะลายปาล์มและสลัดจ์ เติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปเพื่อให้ได้อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เติมเท่ากับ 20:1 และอัตราส่วนทั้งหมดของคาร์บอนต่อไนโตรเจนประมาณ 14:1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยไม่มีการควบคุมพีเอช ได้เซลล์ที่มี crude protein ร้อยละ 39.6

*Stewart และ Parry (1981) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการ

032843

เจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Aspergillus fumigatus* IMI 246651 คือ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 1.5 กรัม/ลิตร และรองลงมา คือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร

Joglekar และ Karanth (1984) เลี้ยง *Penicillium funiculosum* UV-49 ในอาหารเหลว พบว่ายูเรียและ $NaNO_3$ (ไนโตรเจน 0.5 กรัม/ลิตร) ดีกว่า $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 และดีกว่าเคซีนและเปลือกถั่วลิสง (ตารางที่ 11) หากเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากกว่า 0.5 กรัม/ลิตร พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่วนการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์กิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นถึง 1-1.2 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามการเพิ่มไนโตรเจนเป็นการเพิ่มต้นทุน และไนโตรเจนมากกว่า 2 กรัม/ลิตร จะเพิ่มปัญหา คือทำให้ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์

Mitchell และคณะ (1988) ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยูเรียที่ใช้ทดแทน $(NH_4)_2SO_4$ บางส่วน โดยเลี้ยง *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae* บนแป้งมันสำปะหลังในจานเพาะเชื้อ พีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 พบว่าการเติมยูเรียมีผลต่อพีเอชเริ่มต้นของอาหาร และแทบไม่มีผลต่อการเจริญของ *A. oryzae* แต่ยูเรียมีผลต่อการเจริญของ *R. oligosporus* เมื่อใช้ส่วนผสมเป็น $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.75 และยูเรียร้อยละ 0.25 อัตราการเจริญของโคโลนีสูงสุดเป็น 1 มม./ชั่วโมง และอัตราการเจริญของโคโลนีลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มสัดส่วนของยูเรีย

Gomes และคณะ (1989) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยเชื้อ *Gliocladium virens* พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ดีที่สุด คือ bacto-peptone เข้มข้นร้อยละ 0.2 อาจจะเนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ และถ้าความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.4 จะยับยั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เบญจวรรณ ชิตมณี (2534) พบว่าการใช้ NH_4NO_3 เข้มข้นร้อยละ 0.02 ร่วมกับโปรติโอสเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.025 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการใช้ NH_4NO_3

100 0.02
16

ตารางที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมเซลลูเลสของ *Penicillium funiculosum* UV-49

Nitrogen source	Activities	Activity at given time period		
		7 day (IU/ml)	10 day (IU/ml)	13 day (IU/ml)
$(NH_4)_2SO_4$	CMCase	6.0	4.0	7.0
	FPA	0.3	0.5	0.6
Urea	CMCase	10.7	10.0	17.5
	FPA	0.6	1.4	1.2
NH_4NO_3	CMCase	7.0	6.4	8.0
	FPA	0.5	0.7	0.7
$NaNO_3$	CMCase	9.3	11.2	15.0
	FPA	0.8	1.0	1.1
Casein	CMCase	14.0	12.8	16.0
	FPA	0.8	1.1	0.8
Groundnut cake	CMCase	11.0	7.0	10.7
	FPA	0.5	0.8	0.7

ที่มา : Joglekar และ Karanth (1984)

เพียงอย่างเดียว ในการเลี้ยงเชื้อ *Cladosporium* sp.

4.3 เกลือแร่

Desrochers และคณะ (1981) ทดสอบผลของความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ร้อยละ 0.13, 0.20 และ 0.27 ต่อการผลิต beta-glucosidase ของเชื้อ *Schizophyllum commune* พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือร้อยละ 0.20

Gomes และคณะ (1989) พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่เพิ่มการผลิตเซลลูเลสของเชื้อ *G. virens* คือร้อยละ 1.0

4.4 การแปรสภาพ (pretreatment) วัตถุดิบ

เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสไม่ได้ประกอบด้วยเซลลูโลสเพียงอย่างเดียว แต่มีสารอื่นปนอยู่ด้วย เช่น ลิกนิน เพคติน และเฮมิเซลลูโลส เป็นต้น ซึ่งการแปรสภาพเป็นการทำให้เซลลูเลสย่อยสลายได้ง่ายขึ้น วิธีการแปรสภาพมีหลายวิธีด้วยกัน (ตารางที่ 12) ได้แก่ วิธีกลซึ่งเป็นการทำให้อนุภาคของลิกโนเซลลูโลสมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวและลดปริมาณเซลลูโลสรูปผลึก (Jones, *et al.*, 1980) วิธีเคมีโดยใช้กรดแก่หรือด่างแก่ NaOH ทำให้เกิดการฟองตัว ทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ ส่วนกรดทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ (Moo-Young, *et al.*, 1978) วิธีการใช้ตัวทำละลายเพื่อกำจัดลิกนินและตัวขัดขวางที่เป็นรูปผลึกออกจากเซลลูโลส และการใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแปรสภาพวัตถุดิบ

Chahal (1985) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแบบอาหารแข็งจากเชื้อ *Trichoderma reesei* 2 สายพันธุ์ (QMY 1 และ Rut C-30) โดยใช้ฟางข้าวสาลี (WS) และ aspen pulp ที่เตรียมโดยกระบวนการ chemical-thermomechanical จึงเรียกว่า chemithermomechanical pulp (CTMP) การแปรสภาพสับสเตรตด้วย NaOH (ร้อยละ 4 น้ำหนัก/น้ำหนัก) ด้วยความชื้นร้อยละ 33.3 ที่ 121 องศาเซลเซียส (เป็นเวลา 20 นาทีสำหรับ WS และ 60 นาที สำหรับ CTMP) โดยไม่มีการล้างออก เปรียบเทียบกับการใช้สับสเตรตที่ไม่มีการแปรสภาพ (ตารางที่ 13) พบว่าในสับสเตรตทั้งสองที่ผ่านการแปรสภาพ สายพันธุ์ QMY 1 ให้กิจกรรมและผลผลิตของเซลลูเลสสูงสุด

ตารางที่ 12 วิธีการแปรสภาพเซลลูโลส

Physical	Chemical	Solvent	Combination
Ball milling	KOH	Strong mineral acids	Hot-ball milling
Hammer milling	NaOH	Quaternary ammonium bases	NaOH-ball milling
Two roll milling	NH_3 liquid	Aprotic solvents	NO_2 -irradiation
Weathering	NH_3 gas	Metal complexes	
Boiling	HCl		
Hing pressure steam	CH_3COOH		
Gamma radiation	H_2SO_4		
Electron irradiation	SO_2		
Photo-oxidation	NaS		
Wetting	NO_2		
Pyrolysis	H_3PO_4		

ที่มา : Jones และคณะ (1980)

ตารางที่ 13 การผลิตเซลลูเลสโดย *T. reesei* 2 สายพันธุ์ (QMY 1 และ Rut C-30) บนฟางข้าวสาลี (WS) และ aspen pulp ที่เตรียมโดยกระบวนการ chemi-thermomechanical (CTMP)

	Mutant			
	QMY-1		Rut-C 30	
Substrate[a](day)	Cellulase titer IU/ml	Cellulase yield (IU/g of cellulose)	cellulase titer IU/ml	cellulase yield IU/g of cellulose)
Treated WS				
9	0.7	35	0.6	30
16	4.4	220	1.6	80
18	7.8	390	2.6	130
20	8.1	405	6.2	310
26	8.5	425	5.2	260
30	7.2	350	4.6	230
Untreated WS				
9	1.7	85	1.1	55
16	2.3	115	2.6	130
18	2.4	120	2.3	140
20	2.1	105	3.1	155
26	2.2	110	3.2	160
30	1.9	95	4.2	210

ตารางที่ 13 (ต่อ)

	Mutant			
	QMY-1		Rut-C 30	
Substrate[a](day)	Cellulase titer IU/ml	Cellulase yield (IU/g of cellulose)	cellulase titer IU/ml	cellulase yield IU/g of cellulose)
Treated CTMP				
9	1.5	45	0.9	27
16	4.7	142	5.3	161
18	3.9		4.5	136
20	6.3	191	6.6	200
26	6.0	182	6.5	197
30	6.2	88	4.8	145
Untreated CTMP				
9	2.2	67	1.9	57
16	5.3	161	4.1	124
18	3.3		4.1	124
20	5.0	151	5.8	176
26	5.6	170	6.0	182
30	7.2	218	5.0	152

[a] ปริมาณเซลลูโลสของ WS และ CTMP เป็นร้อยละ 40 และ 66 ตามลำดับ ในแต่ละฟลาสก์มีสับสเตรต 5 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง สับสเตรตผ่านการบำบัดด้วย NaOH ร้อยละ 4 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สำหรับ WS และ 60 นาที สำหรับ CTMP ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 1:2

ที่มา : Chahal (1985)

มากกว่า 8 ยูนิต/มล. และมากกว่า 400 ยูนิต/กรัมของเซลลูโลส ตามลำดับ และสายพันธุ์ Rut C-30 มีกิจกรรมและผลผลิตของเซลลูเลสเป็น 6.2 ยูนิต/มล. และ 310 ยูนิต/กรัมของเซลลูโลส การผลิตเซลลูเลสของทั้งสองสายพันธุ์ลดลง เมื่อใช้ฟางข้าวที่ไม่ผ่านการแปรสภาพ ส่วนการแปรสภาพ CTMP ด้วยด่างอ่อน ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้น CTMP ที่ไม่ผ่านการแปรสภาพจึงเป็นสับสเตรตที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.5 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรก พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้พีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้พีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา

Mandels และ Weber (1969) และ Neudoerffer และ Smith (1970) รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นด่างและเป็นกลางไม่เป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตเซลลูเลสของเชื้อรา เพราะการผลิตเซลลูเลสมีปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 14

Lonsane และคณะ (1985) รายงานการควบคุมพีเอชในอาหารแข็งมักไม่ค่อยทำกัน มักใช้สารที่มีคุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ที่ดี และใช้ประโยชน์จากการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็งให้อยู่ในช่วง 4.5-5.0 ในขณะที่ปรับปริมาณความชื้นให้ได้ตามต้องการ และ Lonsane และคณะ (1992) กล่าวว่าการควบคุมพีเอชในช่วงของการหมัก

ตารางที่ 14 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus fumigatus IMI 246651	6.0	Stewart และ Parry (1981)
Aspergillus terreus	5.0	D-souza และคณะ (1982)
Aspergillus fumigatus IMI 255091	5.0	Wase และคณะ (1985)
Penicillium funiculosum UV-49	4.5	Joglekar และ Karanth (1984)
Trichderma reesei	5.8	Chahal (1985)
Trichoderma reesei D1-6 และ *Aspergillus wentii* Pt 2804	4.8	Panda (1989)

มักใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมากกว่าเกลือแอมโมเนีย

4.6 อุณหภูมิ

ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทลงสู่อาหาร ทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักต่างๆ จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ *A. aculeaus* เพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ 30 องศาเซลเซียส (Murao, *et al.*, 1979) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *A.niger* ในการหมักอาหารแข็งที่มีมันสำปะหลังเป็นสับสเตรตอยู่ระหว่าง 35-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงจะยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของไมซีเลียม (Raimbault and Alazard, 1980)

Stewart และ Parry (1981) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิต exo- และ endoglucanase ของเชื้อ *A. fumigatus* IMI 246651 คือ 35-45 องศาเซลเซียส และจากการเลี้ยง *A. niger* JB 1984 พบว่าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่งโมงแรก จากนั้นจะลดลง และอัตราการสร้างโปรตีนสูงในระหว่าง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นกัน นั่นคือการสร้างโปรตีนที่สูงจะทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Essifie, *et al.*, 1986)

Gomes และคณะ (1992) รายงานถึงระดับความเหมาะสมของอุณหภูมิต่อการผลิต FPase, xylanase และ beta-glucosidase โดยเชื้อ *T. viride* พบว่ามีการสังเคราะห์ FPase, xylanase และ beta-glucosidase สูงสุดที่อุณหภูมิ 32, 34 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4.7 การให้อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนวัตถุดิบ หรือสารอาหารใด ๆ ไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการหมักและชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและ

ไซลาเนสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ วิธีการที่จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศเพียงพอ ทำได้โดยการให้อากาศระหว่างการหมัก ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะมากน้อยเพียงใด ขึ้นกับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวนรอบของการเขย่าหรือการกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

การหมักแบบอาหารแข็ง การให้อากาศมีบทบาท 2 ประการ คือเป็นแหล่งให้ออกซิเจนกับจุลินทรีย์ และเพื่อกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ไอน้ำ และสารที่ระเหยได้อื่นๆ (secondary volatile metabolites) (Chahal, 1983) อากาศที่ให้มักอิ่มตัวด้วยน้ำหรืออาจปราศจาก CO_2 โดยการผ่านสารละลาย KOH (Maheva, *et al.*, 1984) และอัตราการให้อากาศขึ้นกับธรรมชาติของจุลินทรีย์ ความต้องการออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ปริมาณความร้อนที่เกิดจากเมทาบอลิซึมที่ปลดปล่อยออกมา ความหนาของชั้นของสับสเตรตที่ใช้ คาร์บอนไดออกไซด์และสารที่ระเหยได้ที่ปลดปล่อยออกมา และช่องอากาศในสับสเตรต อัตราการให้อากาศต่ำจะมีคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าการให้อากาศสูง ซึ่งจะมีผลต่อบรรยากาศโดยรวมในถังหมัก ทำให้ไม่มีศักยภาพในการผลิต แต่อัตราการให้อากาศสูงจะทำให้ความชื้นของสับสเตรตและความชื้นสัมพัทธ์สูญเสียได้มาก อาจจะทำให้สับสเตรตแห้งหรือต้องใช้ตัวปรับความชื้นสัมพัทธ์ (humidifier) (lonsane, *et al.*, 1985)

Pyc และคณะ (1977) พบว่าอัตราการให้อากาศ 0.2-1.0 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ไม่มีผลต่อกิจกรรมเซลลูเลสของเชื้อ *Aspergillus wentii* และ Wase และคณะ(1985) รายงานว่าอัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น (1.0,1.5 และ 2.0 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) มีผลให้เชื้อ *A. fumigatus* ผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเล็กน้อยในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นการสร้างเอนไซม์ลดลง และลดลงรวดเร็วมากขึ้นเมื่อให้อากาศสูงขึ้น

Panda (1989) เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *T.reesei* D1-6 และ *A. wentii* Pt 2804 โดยให้อากาศ 0.2-1.4 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศจนถึง 1 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที หลังจากนั้น

พบว่ากิจกรรมมีค่าค่อนข้างคงที่

4.8 การกวน

การกวนเป็นการทำให้อาหาร จุลินทรีย์และอากาศผสมกันอย่างทั่วถึง และช่วยให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กลง ในการหมักแบบอาหารเหลว ระบบการกวนที่มีประสิทธิภาพจะทำให้การละลายได้ของออกซิเจนในอาหารเหลวมีปริมาตรเท่า ๆ กันทุกจุดในถังหมัก ส่วนความต้องการการกวนในอาหารแข็ง ขึ้นกับชนิดของกระบวนการ การออกแบบถังหมักและผลิตภัณฑ์ การกวนจะมีผลให้การมีรูพรุนของสับสเตรตลดลง ทำให้อนุภาคของสับสเตรตอัดกันแน่น ทำลายการยึดจับสับสเตรต และทำลายไมซีเลียมของเชื้อรา ดังนั้นการกวนจึงมักทำเป็นคราว ๆ มากกว่าทำตลอดเวลา (Lonsane, *et al.*, 1992) การที่ไมซีเลียมถูกทำลาย ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ลดลง (Panda, 1989)

4.9 ปริมาณความชื้น

ความชื้นเป็นตัวควบคุมและทำให้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งดำเนินไปได้ ความชื้นที่มากเกินไปทำให้สับสเตรตอัดกันแน่น ป้องกันการแทรกซึมของออกซิเจน และทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียที่เจริญได้เร็ว ความชื้นที่น้อยจะยับยั้งการเจริญ กิจกรรมของเอนไซม์และการนำไปใช้ประโยชน์ได้ (accessibility) ของสารอาหาร

Raimbault และ Alazard (1980) ศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นในการหมักแบบอาหารแข็งต่อการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *A. niger* โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 35-60 พบว่าปริมาณความชื้นร้อยละ 55 ทำให้การเจริญและการสร้างโปรตีนสูงสุด รองลงมาคือปริมาณความชื้นร้อยละ 60 แสดงให้เห็นว่าน้ำที่เพียงพอมีความจำเป็นต่อการพัฒนาที่ดีของเชื้อรา แต่ถ้าน้ำมากเกินไป จะลดรูพรุนและการพาออกซิเจนในมวลสารน้อยลง และอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียได้

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อการเจริญของ *A. oryzae* NRRL 2160 โดยใช้สับสเตรต 10 กรัม (แกลบ : รำข้าว เท่ากับ 7:3) บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มที่ 27 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าปริมาณความชื้นมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยกิจกรรมของ

เอนไซม์มีค่าสูงสุดที่ความชื้นร้อยละ 35-40 โดยสัมพันธ์กับค่า water activity (Aw) เท่ากับ 0.982-0.986 และความชื้นที่มากเกินไปมีผลให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้ลดลง

4.10 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum side)

Battaglino และคณะ (1991) ศึกษาขนาดของเชื้อเริ่มต้น (10^4, 10^5 และ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรต) ต่อการเจริญของเชื้อ *A. oryzae* ในอาหารแข็ง (แกลบ:รำข้าว เท่ากับ 7:3) พบว่าการเพิ่มขนาดเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรต ทำให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ofuya และ Ukpong (1988) ที่รายงานว่าความเข้มข้นของอะไมเลส เซลลูเลส และอะไมโลกลูโคซิเดสเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 4 เท่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นจาก $7x10^4$ เป็น $3.5x10^5$ เซลล์

Joglekar และคณะ (1983) เลี้ยง *Penicillium funiculosum* ในถังหมัก พบว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วในถังหมักและมีผลให้เกิดมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามเวลา มีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มเร็วมากในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง โดยจะให้ค่า exo-,endo-beta-D-glucanase และ beta-glucosidase ภายใน 72 ชั่งโมง เป็น 3, 26 และ 9 ยูนิต/มล. ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) เลี้ยง *G. virens* ในฟลาสก์เพื่อการผลิตเซลลูเลสและไซลาเนสในฟางข้าวสาลีที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ พบว่าเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ภายใน 24 ชั่วโมงของการบ่ม การเปลี่ยนแปลงพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการบ่ม 1 วัน และลดลงในวันที่ 2 วันที่ 3 ไมซีเลียมจะเกิดการสลายตัวเอง (autolysis) ปลดปล่อยเอนไซม์ลงสู่อาหาร พีเอชเพิ่มขึ้น ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง คือ 5-6 วัน ส่วนการเลี้ยงในถังหมัก พบว่าระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของเชื้อลดลง การใช้แอมโมเนียและการลดลงของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (ลิกโนเซลลูโลสกับไมซีเลียม) ลดลงอย่างรวดเร็วมากภายใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และลดลงช้ามากหรือหยุดในช่วงที่มีการเจริญคงที่ และการใช้ลิกโนเซลลูโลสก็ช้าด้วย

ซึ่งอาจเนื่องมาจากการมีน้ำตาลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้ง หรือเนื่องจากการขาดสารอาหารในการเลี้ยงเป็นผลให้การเจริญของเชื้อราช้าและลดการใช้เซลลูโลส และจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ค่า FPase beta-glucosidase และ xylanase 0.33, 1.52, 30.45 ยูนิต ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในถังหมักได้ FPase, beta-glucosidase และ xylanase เป็น 0.25, 0.77 และ 24.04 ยูนิต ตามลำดับ

Gomes และคณะ (1989) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ FPase, CMCase และ xylanase สูงสุดใน *T. reesei* MCG 77 แต่กิจกรรมของ beta-glucosidase ของ *A. terreus* และ *A. niger* สูงกว่าของ *T. reesei* MCG 77 3.2 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ถึงแม้ว่า *T. viride, G. virens* และ *Aspergillus* ทั้งสองสายพันธ์จะผลิต FPase ได้น้อย แต่สามารถผลิต CMCase, beta-glucosidase และ xylanase ได้มากพอควร เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าค่าของพีเอชในทุกเชื้อ ยกเว้น *T. phaseolina* ลดลงรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 หรือ 3 จากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่พีเอชของ *T. phaseolina* เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ตลอดการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักแห้งทั้งหมดลดลงในระหว่างการหมักของทุกเชื้อและลดลงมากที่สุดใน *T. reesei* MCG 77 ลดลงน้อยสุดใน *A. niger* และ *T. phaseolina* ปริมาณโปรตีนมากที่สุดใน *T. reesei* MCG77 ในทุกขั้นตอนของการหมัก โดยการผลิตจะเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 2-3 โดยหลังจากวันที่ 4 ปริมาณโปรตีนจะไม่มีการผลิตเพิ่มขึ้นในเชื้อ *T. viride, T. harzianum* และ *G. virens* สันนิษฐานว่าอาจจะขาดสารอาหารบางอย่างในการเลี้ยงเนื่องจากการเจริญอย่างรวดเร็วของไมซีเลียม

ตารางที่ 15 กิจกรรมเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสของเชื้อรา

Organism	days	FPase (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	beta-glucosidase (IU/ml)	xylanase (IU/ml)	soluble protein (IU/ml)	pH
T.reesei MCG 77	6	1.07	4.20	0.94	27.99	1.50	5.55
T.viride	6	0.19	2.85	0.81	19.87	0.43	5.49
T.harzianum	6	0.17	2.47	0.58	19.44	0.35	5.25
G.virens	4	0.15	2.30	0.49	16.96	0.35	5.13
	6	0.14	1.87	0.84	14.39	0.26	5.26
A.terreus	6	0.29	3.25	3.03	10.83	0.43	5.50
A.niger	6	0.03	1.37	1.16	4.99	0.45	4.95
T. phaseolina	6	0.04	1.49	0.46	5.09	0.23	5.64

ที่มา : ดัดแปลงจาก Gomes และคณะ (1989)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากเชื้อรา *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม
3. เพื่อศึกษาหามวลชีวภาพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* ATCC 6275 ในอาหารเหลวและอาหารแข็ง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัตถุดิบ

น้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเร็กซ์ออยล์ (ไทยแลนด์) จำกัด ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เป็นน้ำทิ้งรวมที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้วด้วยเครื่องแยกน้ำมัน (decanter) เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งรวมข้ามคืนในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เย็นลง จากนั้นบรรจุขวดขนาด 2.5 ลิตร ขวดละประมาณ 1.5 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ตลอดการทดลอง

น้ำทิ้งรวมมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 ปริมาณแร่ธาตุในน้ำทิ้งรวม (วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer) มีแคลเซียม แมกนีเซียม ปริมาณร้อยละ 0.04 และ 0.07 ตามลำดับ ปริมาณเหล็ก แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 108.61, 6.76 และ 1.02 ส่วนในล้านส่วน (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ

กากปาล์มได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช ตำบลพะตง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา บดกากปาล์มด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ (ของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มม. (20 mesh) เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง

กากปาล์มมีปริมาณแร่ธาตุ (วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer) ดังนี้ แคลเซียม แมกนีเซียม ปริมาณร้อยละ 0.36 และ 0.34 ตามลำดับ ปริมาณเหล็ก แมงกานีส และทองแดง เท่ากับ 314.23, 85.56 และ 26.53 ส่วนในล้านส่วน (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ

จุลินทรีย์

Aspergillus niger ATCC 6275 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Profressor Susumu Oi, Osaka City University ประเทศญี่ปุ่น เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยง

เชื้อที่อุณหภูมิห้อง 4-5 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่ แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือนและนำสปอร์มาใช้ในการทดลองเมื่อต้องการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก) ประกอบด้วย น้ำทิ้งรวม 1 ลิตรที่เติม $CaCL_2$ 0.3, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3, KH_2PO_4 1.0, K_2HPO_4 1.0, โพลีเปปโตน 0.25, ยีสต์สกัด 1.0, NH_4NO_3 0.44, กลูโคส 2.0 กรัม และ Tween 80 1.0 มล. ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วย NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมลงในกากปาล์มในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข) ประกอบด้วย โพลีเปปโตน 1.0, ยีสต์สกัด 0.5, โปรตีโอสเปปโตน 0.5 และกลูโคส 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร วัดค่าพีเอชได้ 6.1

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ และโปรตีน (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่งของบริษัท Sartorius

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Model HM-7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronic จำกัด

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของบริษัท Bausch & Lomb Model Spectronic 20

เครื่องเขย่า

เครื่องเหวี่ยง Type H-103 NR ของบริษัท Kokusan Ensinki จำกัด

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์ของ บริษัท Olympus จำกัด

ถังหมักขนาด 2 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ยี่ห้อ Eyela ของบริษัท Tokyo Rikakikai จำกัด

เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) ของบริษัท Lab-Line Instruments

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เครื่องบดอาหารสัตว์ ของบริษัท Retsch Gmbh Model 5657 HAAN

เครื่อง Atomic Absorption Model GBC 901

วิธีการ

การวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช วัดด้วยเครื่องวัดพีเอช วัดค่าพีเอชของอาหารเหลวโดยตรง ส่วนในอาหารแข็งวัดโดยใช้อาหาร 5 กรัม เติมน้ำ 10 มล. คนให้เข้ากัน และวัดค่าพีเอช

2. นับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 หยดลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า

3. ความชื้น ชั่งตัวอย่างให้มีน้ำหนักแน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) (ภาคผนวก ข)

4. น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมด ปิเปตตัวอย่างอาหาร 10 มล. ใส่หลอดตัวอย่าง ปั่นแยกเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และอบที่ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) (ภาคผนวก ข)

5. โปรตีนของเชื้อรา วิเคราะห์ตามวิธี Micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1984)

6. กิจกรรมของเอนไซม์

6.1 กิจกรรมของเอนไซม์ carboxymethylcellulase (CMCase) ตามวิธีของ Mandels และ Weber (1969)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลาย CMC เข้มข้น ร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการ

เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid reagent (DNS) ลงไป 3 มล. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก เติมน้ำกลั่น 6 มล. ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วแต่ไม่บ่ม โดยจะเติมสารละลาย DNS 3 มล. ลงไปทันที นำไปต้มและทำตามวิธีการข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ ก่อนการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. ที่เติม DNS reagent 3 มล.

1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

6.2 กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase ตามวิธีของ Tang และคณะ (1987)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลายไซแลน (Larchwood) เข้มข้น ร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มล. ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก เติมน้ำกลั่น 6 มล. ผสมให้เข้ากัน สำหรับชุดควบคุมและ blank ทำเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร เทียบค่าไซโลสจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ xylanase ในการเลี้ยงเชื้อในกากปาล์มแบบอาหารแข็ง คำนวณต่อกรัมโดยใช้สูตร

$$\text{ยูนิต/กรัม} = \frac{\text{ยูนิตทั้งหมด}}{\text{กรัมของกากปาล์มเริ่มต้น}}$$

วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน completely randomized design (CRD) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Irristate Version 90-1 (1990)

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

ก. <u>การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์</u>

เลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก 50 มล. ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 7.5×10^5 เซลล์/มล. เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที สุ่มตัวอย่างในวันที่ 2, 3, 4 และ 6 ของการหมัก แยกเซลล์โดยนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่มีความเร็ว 2,800 xg (4,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ xylanase

ปัจจัยต่าง ๆ ที่ศึกษา มีดังนี้

1.1 <u>แหล่งคาร์บอนและเปรียบเทียบวิธีการแปรสภาพ</u>

เติมกากปาล์มร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก กากปาล์มที่เติมผ่านการแปรสภาพ 4 วิธี คือ การบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์, การใช้ด่าง (NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล) โดยเติมลงไปในปริมาณ 1.0 มล./กรัมกากปาล์ม) การใช้ความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และการบดด้วยเครื่อง ball mill (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Tosco Co. Ltd. ประเทศญี่ปุ่น) เปรียบเทียบกับชุดที่

ไม่มีการเติมกากปาล์มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน สุ่มตัวอย่างในวันที่ 2, 3, 4 และ 6 หลังการหมัก

1.2 ความเข้มข้นของกากปาล์ม

ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากปาล์มที่คัดเลือก (จากข้อ 1.1) โดยเติมกากปาล์มเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.15 กรัม/ลิตร ชนิดของไนโตรเจน ได้แก่ NH_4NO_3 (0.44 กรัม/ลิตร), $NaNO_3$ (0.94 กรัม/ลิตร), $(NH_4)_2SO_4$ (0.73 กรัม/ลิตร) และศึกษาผลของการเติมโพลีเปปโตน (0.25 กรัม/ลิตร) เพียงอย่างเดียว หรือเติมร่วมกับ NH_4NO_3, $NaNO_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เปรียบเทียบกับการไม่เติมไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือก (จากข้อ 1.3) โดยให้มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0, 0.08, 0.15, 0.30, 0.44, 0.60 และ 0.74 กรัม/ลิตร

ข. การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

1.5 การให้อากาศ

ศึกษาผลของการให้อากาศที่อัตรา 0.8, 1.0, 1.2 และ 1.4 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที

การเตรียมหัวเชื้อ เตรียมหัวเชื้อโดยการเติมสปอร์ $7.5x10^5$ สปอร์/มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (จากข้อ ก) ปริมาตร 130 มล. ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. วางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (จากข้อ

ก) ปริมาตร 1.3 ลิตร เติมหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ในปริมาณร้อยละ 10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ให้อากาศในอัตราที่ต้องการศึกษา กวนที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที สุ่มตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800 *xg* (4,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายใสไปวัดค่าพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ xylanase และปริมาณโปรตีนของเชื้อรา

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

เลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่บรรจุกากปาล์ม 5 กรัม (พีเอชเดิมของกากปาล์มเท่ากับ 4.6) ที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ให้มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 วัดค่าพีเอชได้ 4.9 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 1.0×10^6 สปอร์/กรัมกากปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างทรีตเมนต์ละ 2 ฟลาสก์ ทุก 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน นำตัวอย่างไปสกัดด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรต วางฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800 *xg* (4,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 50 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวัดค่าพีเอช และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CMCase และ xylanase

ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

2.1 วิธีการแปรสภาพกากปาล์ม

ทำการแปรสภาพกากปาล์มด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และใช้กากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพเป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อ

2.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ใช้กากปาล์มที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2.1) ในการเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบผลของการใช้ไนโตรเจน 2 ชนิด คือ รำข้าวสาลีและยูเรีย โดยเติมรำข้าวสาลี ในอัตรา

ส่วนกากปาล์ม: รำข้าวสาลี เท่ากับ 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 และเติมยูเรียลงในกากปาล์มในความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ช)

2.3 ความชื้นเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อในกากปาล์ม (จากข้อ 2.1) ที่เติมไนโตรเจนที่คัดเลือกไว้ (จากข้อ 2.2) ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 40, 50 และ 60

2.4 อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากข้อ 2.2) ที่ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม (จากข้อ 2.3) ที่อุณหภูมิห้อง, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

2.5 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น

ศึกษาผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้น โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 2.4) ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6, 10^7 และ 10^8 สปอร์/กรัมสับสเตรต

2.6 พีเอชเริ่มต้น

ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้น (ก่อนการฆ่าเชื้อ) โดยทำการปรับพีเอชของกากปาล์มที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 เป็น 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ในขั้นตอนการปรับความชื้น หลังการฆ่าเชื้อกากปาล์มที่ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6, 4.0, 4.5, 4.9 และ 5.4 ตามลำดับ

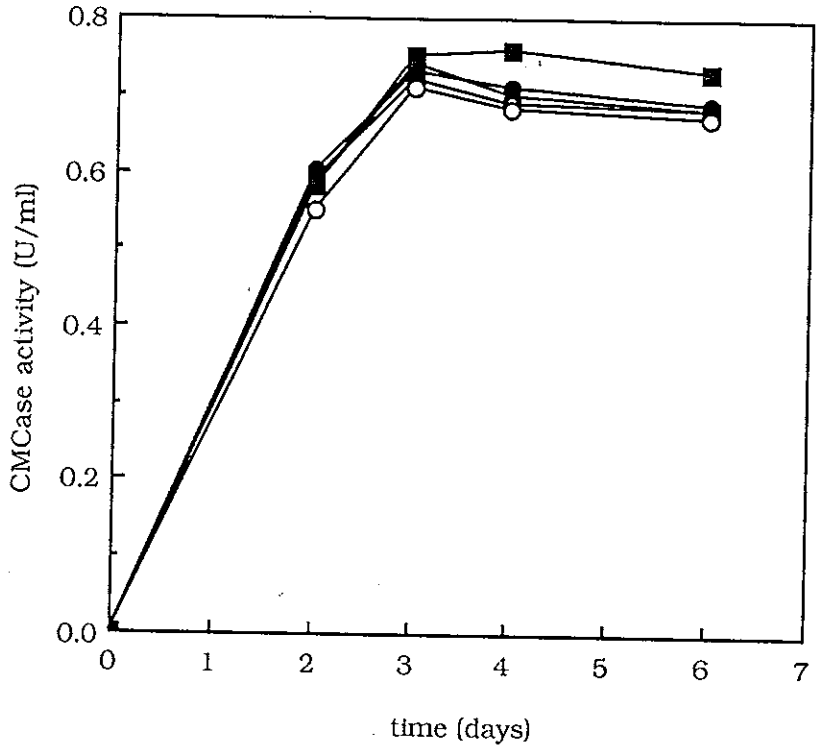
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

1.1 แหล่งคาร์บอนและเปรียบเทียบวิธีการแปรสภาพ

ผลของการเติมกากปาล์มที่แปรสภาพด้วยการบด, การใช้ด่าง และการใช้ความร้อนเพื่อการเพิ่มปริมาณลิกโนเซลลูโลสต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase (รูปที่ 1) และ xylanase (รูปที่ 2) พบว่าการเติมกากปาล์มที่ผ่านการบดด้วย ball mill ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 0.76 และ 12.95 ยูนิต/มล. หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งสูงกว่าชุดอื่น ๆ เล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) การบดด้วย ball mill ช่วยลดขนาดของอนุภาคและลดส่วนของ crystalloid ซึ่งเป็นส่วนที่ย่อยยากของเซลลูโลส (Jones, *et al.*, 1980) การบดด้วยเครื่องบดเป็นการลดขนาดของอนุภาค ส่วนด่างทำให้เกิดการพองตัว ทำให้ลิกนินและเฮมิเซลลูโลสละลายน้ำได้ (Mandels and Sternberg, 1976) การเติมกากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการอื่น ๆ ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุด หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นการเติมกากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน ไม่มีผลแตกต่างต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ อาจเนื่องจากกากปาล์มที่เติมมีปริมาณน้อย (เข้มข้นร้อยละ 0.5) จึงเลือกกากปาล์มบดที่บดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ในการทดลองขั้นต่อไป

การเปลี่ยนแปลงพีเอช (รูปที่ 3) พบว่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วมากในช่วง 3 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะลดลงอีกเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่ หลังการเลี้ยงเชื้อ มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5, 4.3, 4.2, 4.2 และ 4.2 สำหรับอาหารที่ไม่เติมกากปาล์ม และที่เติมกากปาล์มบด กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยด่าง ความร้อน และ ball mill ตามลำดับ



รูปที่ 1 Time course ของการผลิตเอนไซม์ CMCase จากการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ

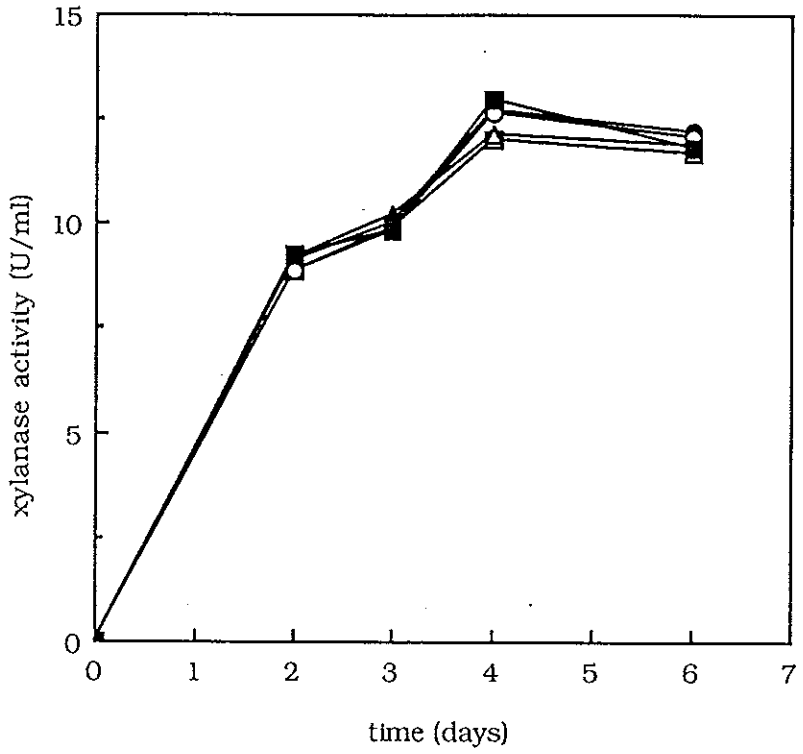
—□— ไม่เติมกากปาล์ม

—△— กากปาล์มบด

—●— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH

—○— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน

—■— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill



รูปที่ 2 Time course ของการผลิตเอนไซม์ xylanase จากการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ

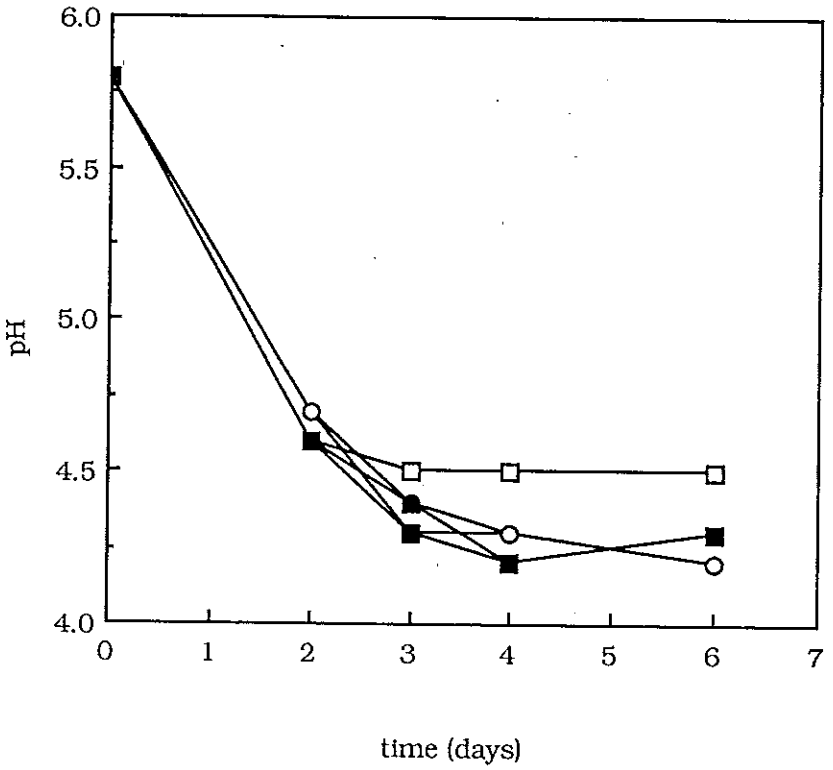
—□— ไม่เติมกากปาล์ม

—△— กากปาล์มบด

—●— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH

—○— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน

—■— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ

—□— ไม่เติมกากปาล์ม

—△— กากปาล์มบด

—●— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH

—○— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน

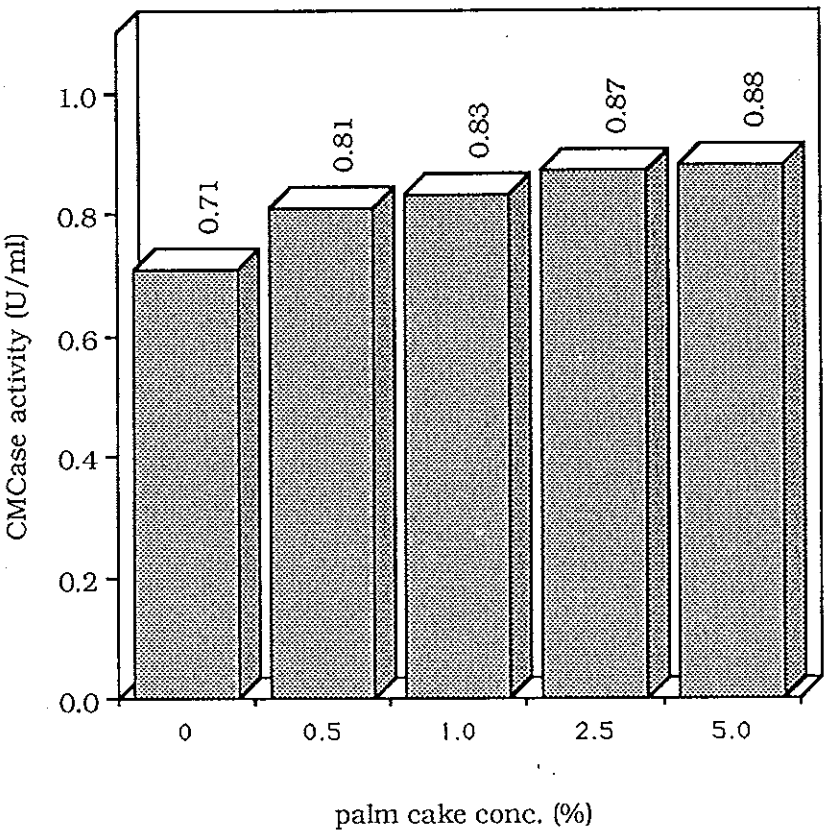
—■— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill

1.2 ความเข้มข้นของกากปาล์ม

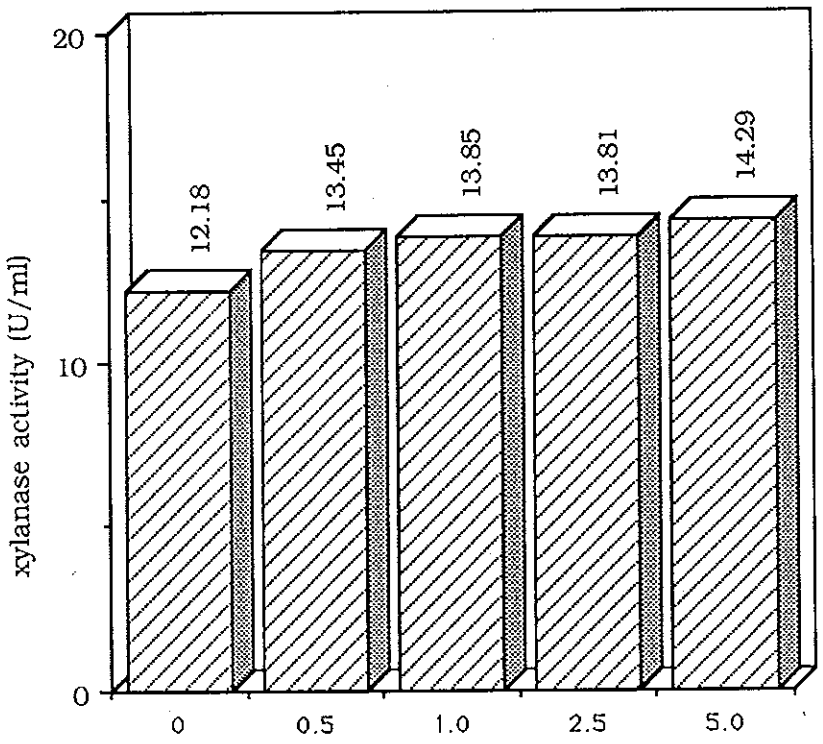
ผลของความเข้มข้นของกากปาล์ม (ร้อยละ 0-5) ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ แสดงในรูปที่ 4 และ 5 พบว่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของกากปาล์มที่สูงขึ้น และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ในเวลา 4 วันหลังการหมัก การเติมกากปาล์มปริมาณร้อยละ 1.0 ให้ค่ากิจกรรม CMCase (0.83 ยูนิต/มล.) และ xylanase (13.85 ยูนิต/มล.) สูงกว่าการไม่เติมกากปาล์มอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมกากปาล์มร้อยละ 2.5 และ 5.0 (ภาคผนวก ค) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Stewart และ Parry (1981) และ Mandel และ Weber (1969) ที่พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซลลูโลสสำหรับการผลิตเซลลูเลสเท่ากับร้อยละ 1.0 และร้อยละ 0.5-1.0 ตามลำดับ แต่ Wase และคณะ (1985) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟางข้าวบดต่อการผลิตเอนไซม์ คือร้อยละ 4.0 และที่ร้อยละ 5.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากการถ่ายเทมวลสารถูกจำกัด ส่วนการเติมกากปาล์มร้อยละ 1.0-5.0 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน อาจเกิดจากการดูดซับเอนไซม์โดยเซลลูโลส (Stewart and Parry, 1981) จึงสรุปว่าการเติมกากปาล์มร้อยละ 1.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ก เพียงพอสำหรับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ (รูปที่ 6) พบว่าพีเอชมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3-4 วันของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นพีเอชมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยพีเอชสุดท้ายของการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากปาล์มร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มีค่าเท่ากับ 4.5, 4.6, 4.7, 4.5 และ 4.8 ตามลำดับ

1.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

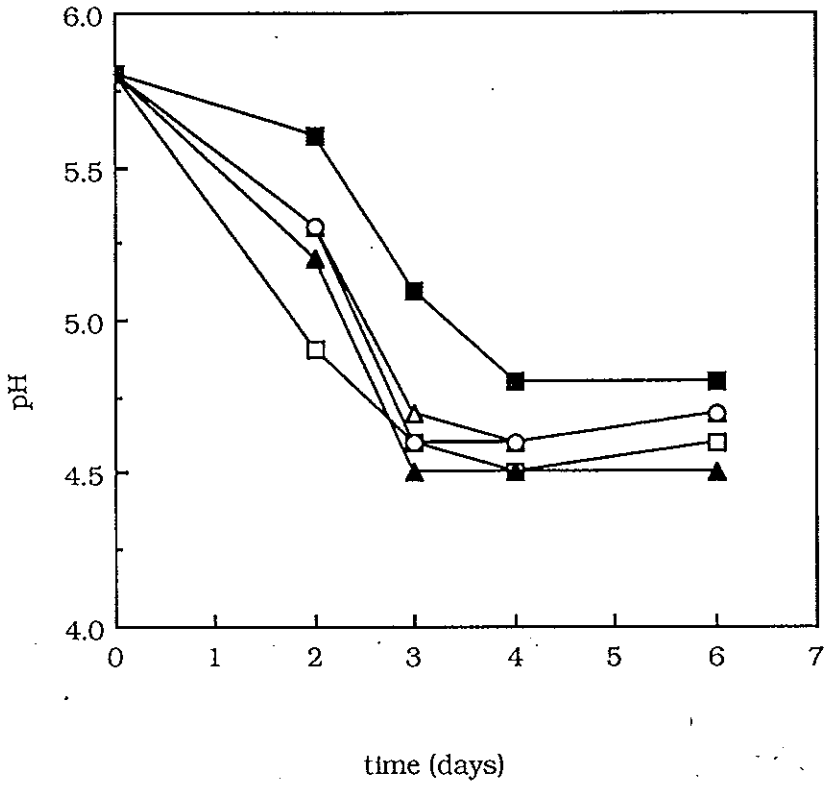
ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ (รูปที่ 7 และ 8) พบว่าการใช้ NH_4NO_3, หรือ $NaNO_3$ หรือ $(NH_4)_2SO_4$ ให้ค่ากิจกรรม CMCase ใกล้เคียงกัน ส่วนกิจกรรม xylanase มีค่าสูงใกล้เคียงกันเมื่อใช้ NH_4NO_3 หรือ $NaNO_3$ การใช้ NH_4NO_3 ร่วมกับโพลีเปปโตนให้ค่ากิจกรรม xylanase สูงกว่าการใช้ $NaNO_3$ ร่วมกับโพลีเปปโตน



รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ที่เติมกากปาล์มที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

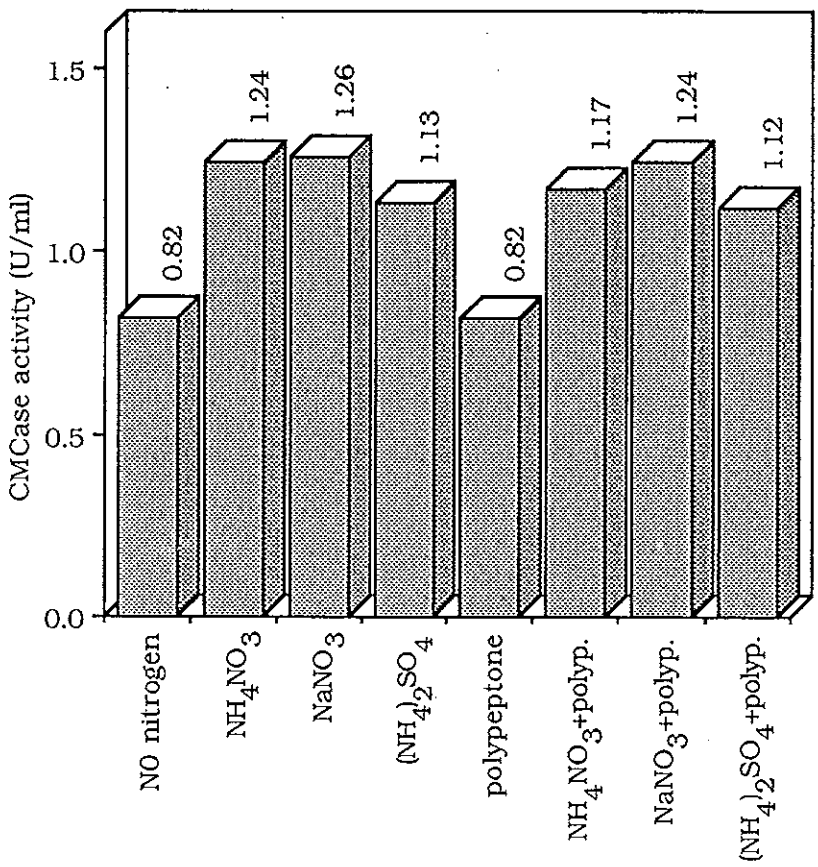
—□— ความเข้มข้นร้อยละ 0

—△— ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

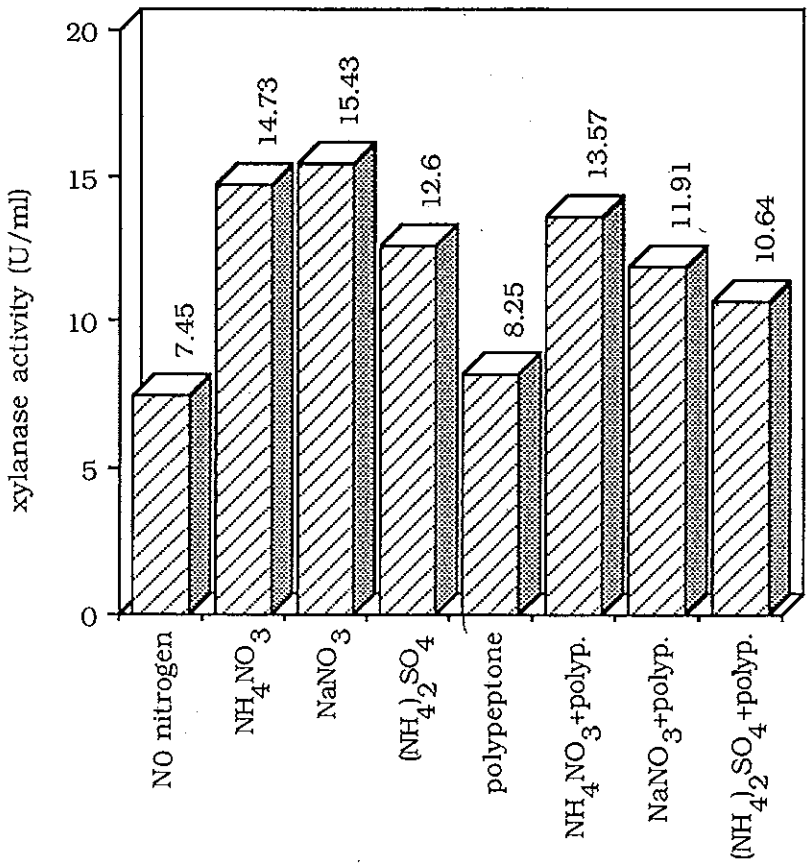
—○— ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

—▲— ความเข้มข้นร้อยละ 2.5

—■— ความเข้มข้นร้อยละ 5.0



รูปที่ 7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 4 วัน



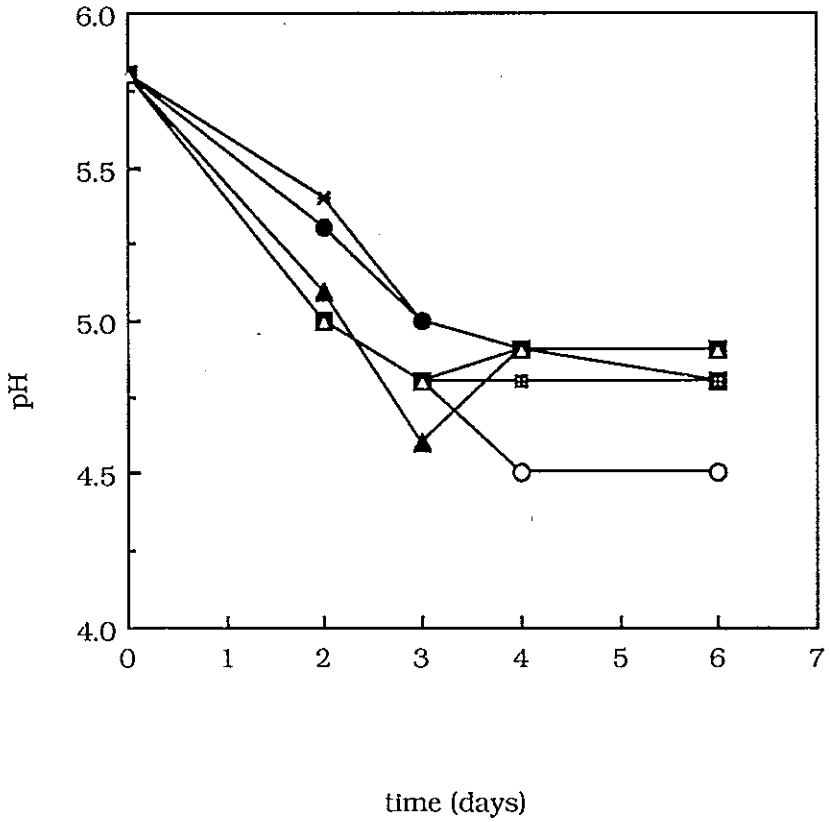
รูปที่ 8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 4 วัน

แต่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้ NH_4NO_3 เพียงอย่างเดียว ดังนั้น NH_4NO_3 จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับ *A. niger* ATCC 6275 ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase เท่ากับ 1.24 และ 14.68 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *A. fumigatus* IMI 246651 (Stewart and Parry 1981) แต่แตกต่างจาก *P. funiculosum* UV-49 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือยูเรีย หรือ $NaNO_3$ (Joglekar and Karanth, 1984) ส่วนการใช้โพลีเปปโตนเพียงอย่างเดียว ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase ไม่แตกต่างจากการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และการเติมร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ก็ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมไนโตรเจนอนินทรีย์เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากรายงานของเบญจวรรณ ชิตมณี (2534) คือการใช้ NH_4NO_3 ร่วมกับโปรติโอสเปปโตนให้ค่ากิจกรรม CMCase สูงกว่าการใช้ NH_4NO_3 อย่างเดียวในการเลี้ยงเชื้อ *Cladosporium* sp.

การเปลี่ยนแปลงพีเอช (รูปที่ 9) พบว่าพีเอชลดลงในระหว่างการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อและมีค่าต่ำสุดเป็น 4.8-4.9 ยกเว้นการใช้ $NaNO_3$ ร่วมกับโพลีเปปโตนซึ่งให้ค่าพีเอชต่ำสุดเป็น 4.5

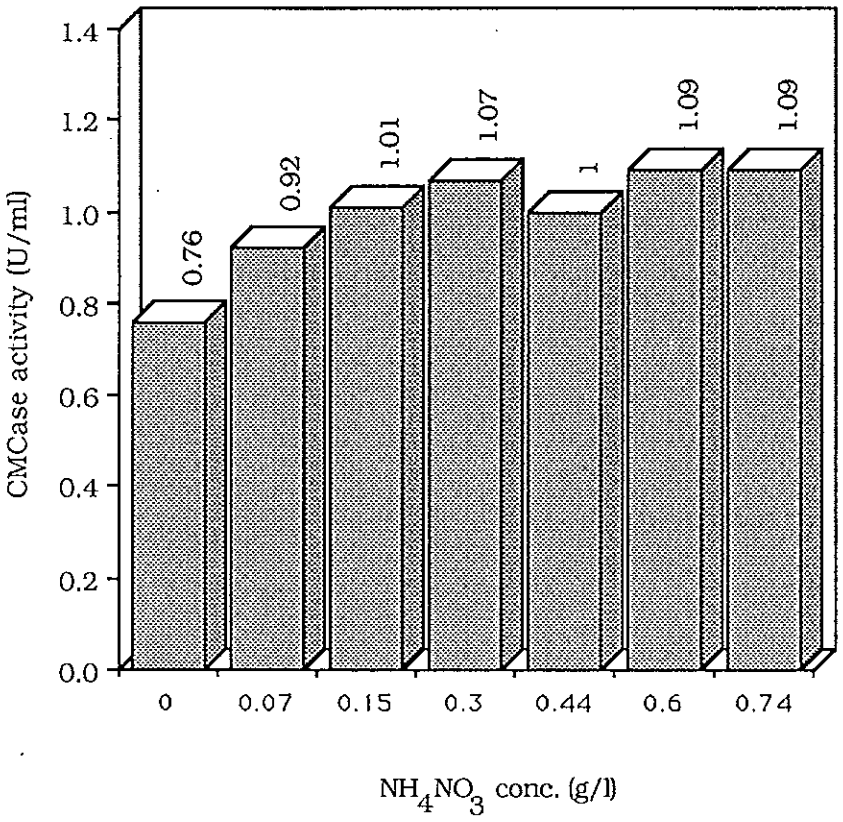
1.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลของความเข้มข้นของไนโตรเจนต่อการสร้างเอนไซม์ (รูปที่ 10 และ 11) พบว่าความเข้มข้นของ NH_4NO_3 มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อได้ 3 วัน ความเข้มข้นที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 0.15 กรัม/ลิตร มีผลให้ค่ากิจกรรม CMCase (1.01 ยูนิต/มล.) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ค) การใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.15-0.74 กรัม/ลิตร ให้ค่าที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการใช้ $NaNO_3$ (0.5-4.0 กรัม/ลิตร) สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (endoglucanase และ cellobiohydrolase) จากเชื้อ *Sporotrichum thermophile* ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน (Coutts and Smith, 1976) ส่วนค่ากิจกรรม xylanase มีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของ NH_4NO_3 ที่เพิ่มขึ้น และสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นเท่ากับหรือสูงกว่า 0.60

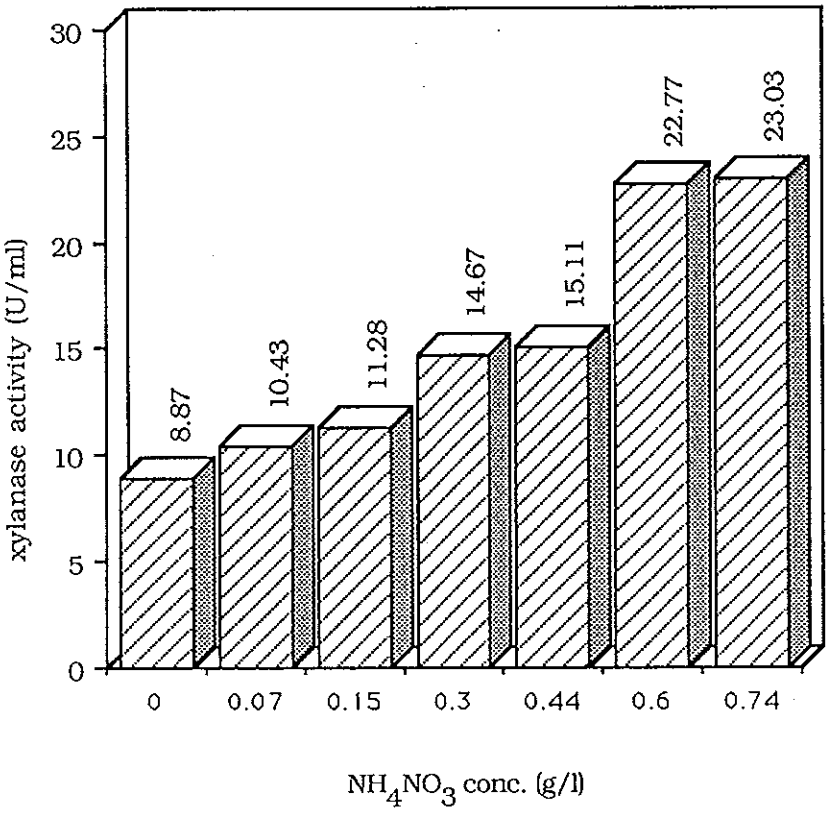


รูปที่ 9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

- ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
- NH_4NO_3
- $NaNO_3$
- $(NH4)_2SO_4$
- โพลีเปปโตน
- NH_4NO_3 + โพลีเปปโตน
- $NaNO_3$ + โพลีเปปโตน
- $(NH_4)_2SO_4$ + โพลีเปปโตน



รูปที่ 10 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 3 วัน



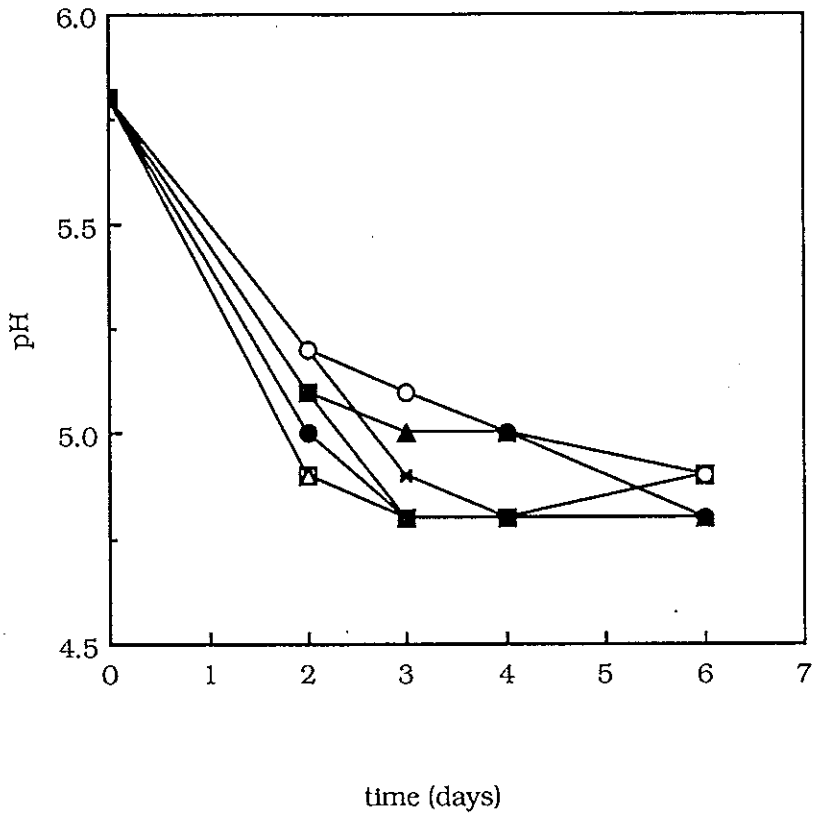
รูปที่ 11 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0 เป็นเวลา 4 วัน

กรัม/ลิตร คือมีค่าเท่ากับ 22.77-23.03 ยูนิต/มล. (ภาคผนวก ค) ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงช้ากว่า (รูปที่ 12) อย่างไรก็ตามพีเอชสุดท้ายมีค่าใกล้เคียงกับการใช้ NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ดังนั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NH_4NO_3 สำหรับการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 เท่ากับ 0.6 กรัม/ลิตร

การผลิตเอนไซม์ CMCase และ xylanase จาก *A. niger* ATCC 6275 ภายใต้สภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในฟลาสก์ (รูปที่ 13) พบว่าหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 2 วัน ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดในวันที่ 3 และ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.01 และ 22.07 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการเลี้ยงเชื้อ *G. virens* ในฟางข้าว (ที่ผ่านการแปรสภาพด้วยไอน้ำ) เข้มข้นร้อยละ 1.0 คือเชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนถึงจุดสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก โดยในวันที่ 3 เส้นใยจะสลายตัวเองและเอนไซม์ถูกขับออกมาในอาหาร (Gomes, *et al.*, 1989) ค่ากิจกรรม xylanase จาก *G. virens* เท่ากับ 30.45 ยูนิต/มล. ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลองนี้ ระหว่างการเจริญของ *A. niger* ATCC 6275 พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน ค่าต่ำสุด เท่ากับ 4.9 ที่เวลา 6 วัน จากการสังเกตการเจริญของเชื้อในฟลาสก์ พบว่าเชื้อมีการเจริญและมีมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นมากภายใน 1 วัน เซลล์มีความหนาแน่นมากในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นน้ำหมักมีความหนืดลดลง อาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ (Gomes, *et al.*, 1989)

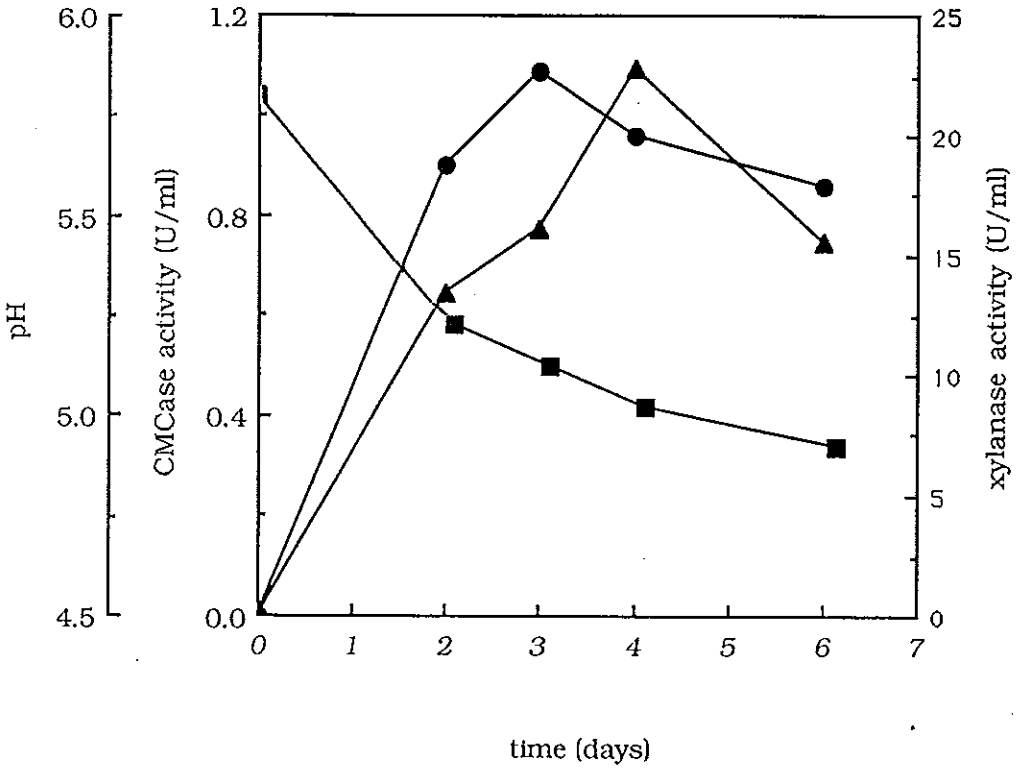
1.5 <u>การให้อากาศ</u>

ผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในถังหมัก (รูปที่ 14 และ 15) พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที โดยให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 1.34 และ 17.93 ยูนิต/มล. ตามลำดับ (หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน) และการให้อากาศในอัตราที่สูงเกินไป (1.4 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากการที่ไมซีเลียมถูกทำลายซึ่งเป็นผลให้การสร้าง



รูปที่ 12 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติม NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

- ไม่เติม NH_4NO_3
- 0.07 กรัม/ลิตร
- 0.15 กรัม/ลิตร
- 0.30 กรัม/ลิตร
- 0.44 กรัม/ลิตร
- 0.60 กรัม/ลิตร
- 0.74 กรัม/ลิตร

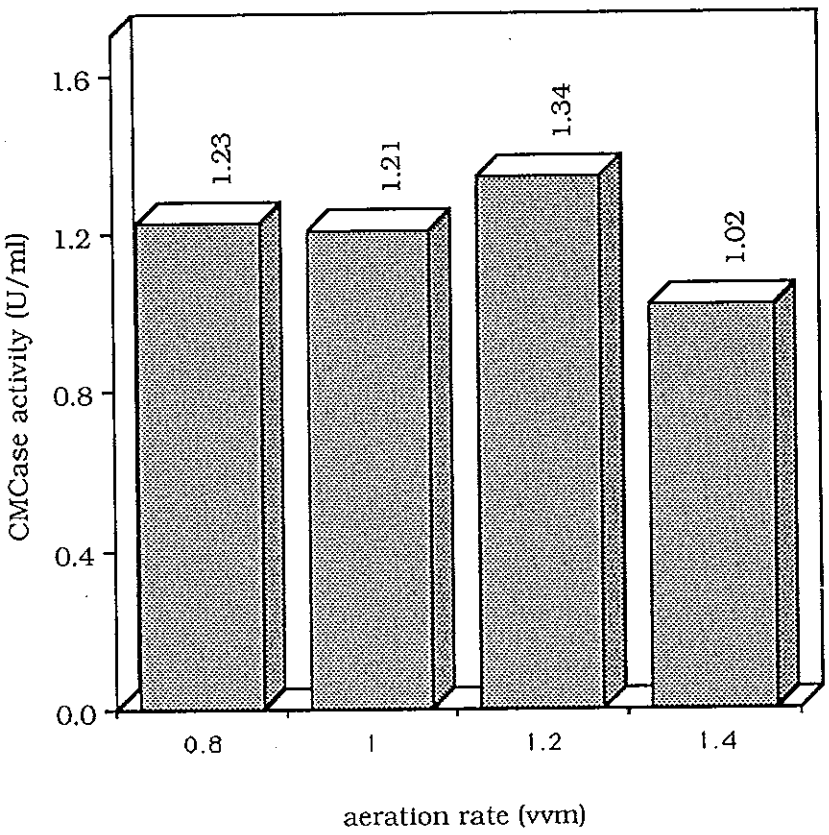


รูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในฟลาสก์ ภายใต้สภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

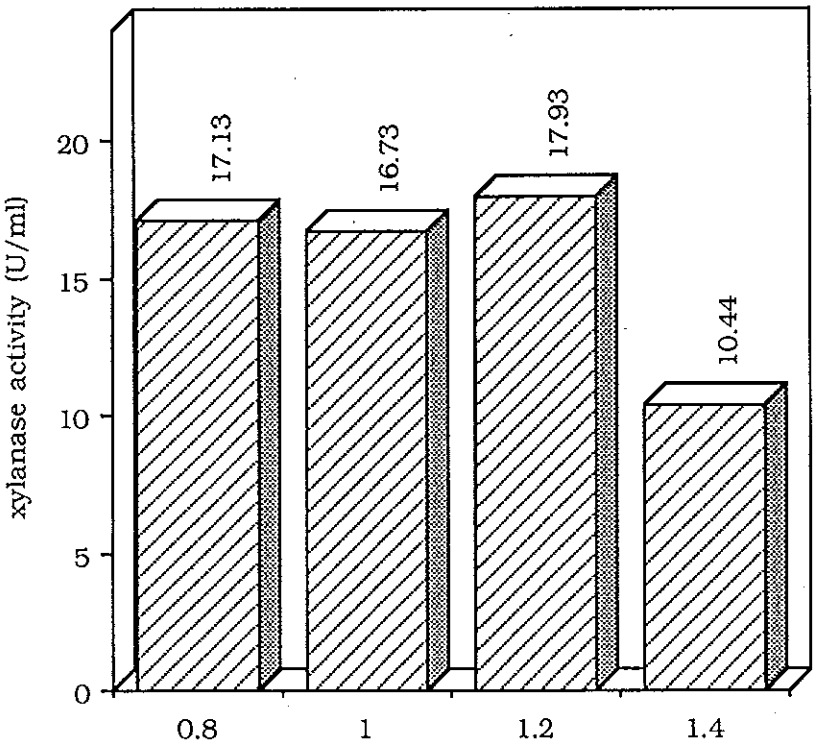
—●— กิจกรรมเอนไซม์ CMCase

—▲— กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase

—□— พีเอช



รูปที่ 14 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 6 วัน



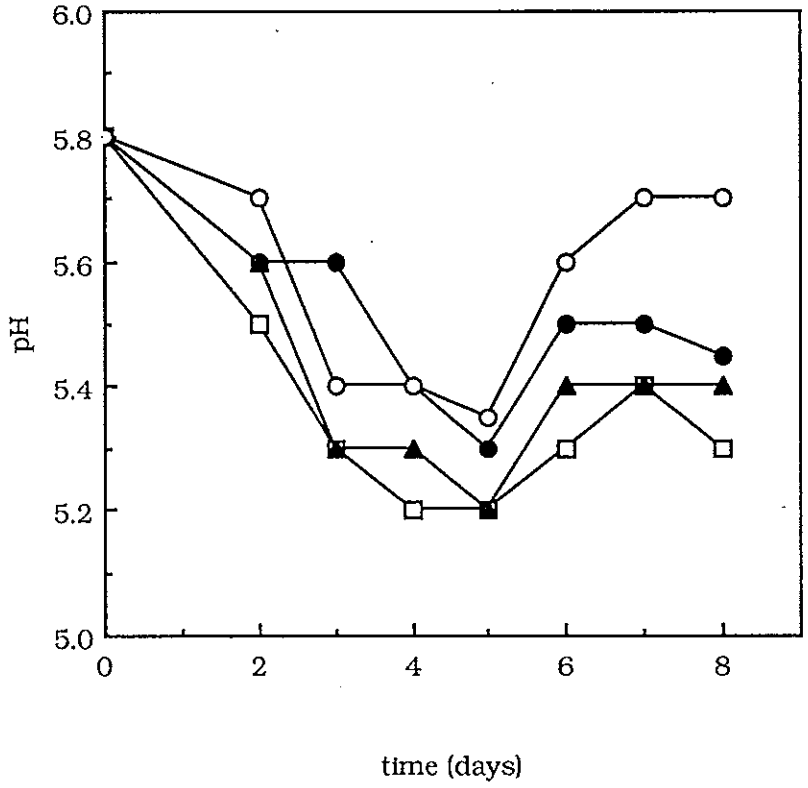
รูปที่ 15 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 6 วัน

เอนไซม์หยุดชะงักและเป็นการกระตุ้นให้มีการปลดปล่อยสารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) (Wase, *et al.*, 1985)

อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ผลการทดลองสอดคล้องกับผลของ Wase และคณะ (1985) ซึ่งรายงานว่าอัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น (1.0, 1.5 และ 2.0 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) มีผลให้ *A. fumigatus* ผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเล็กน้อยในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นการสร้างเอนไซม์ลดลง และลดลงรวดเร็วมากขึ้นเมื่อให้อากาศในอัตราที่สูงขึ้น ส่วน Panda (1989) พบว่ากิจกรรมของเซลลูเลสเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น (0.2-1.0 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) หลังจากนั้นกิจกรรมมีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงอัตราการให้อากาศ 1.4 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ในระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเจริญของเชื้อ พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3-4 วันแรก (รูปที่ 16) หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ (2-3 วัน) และเพิ่มขึ้นอีก

ผลของการให้อากาศที่อัตราต่าง ๆ ต่อปริมาณเซลล์ (ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (รูปที่ 17) พบว่าการให้อากาศในอัตรา 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (23 กรัม/ลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) หลังจากเลี้ยงเชื้อ 2 วัน แสดงให้เห็นว่า *A. niger* ATCC 6275 มีการเจริญและสร้างเซลล์ได้รวดเร็วมากภายในระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นความหนืดของน้ำหมักเริ่มลดลง หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 4 วัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าการเจริญจะเกิดขึ้นรวดเร็วมากในถังหมักและมีผลให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นหนาแน่นภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้นตามเวลา มีค่าสูงสุดที่ 72-96 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลง (Joglekar, *et al.*, 1983) การเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมเป็นเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนของมวลชีวภาพร้อยละ 21

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ พีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งในการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (ใช้กากปาล์มบดร้อยละ 1.0, NH_4NO_3 เข้มข้น 0.6 กรัม/ลิตร ลงในน้ำทิ้งรวม และอัตราการให้อากาศในอัตรา 1.2



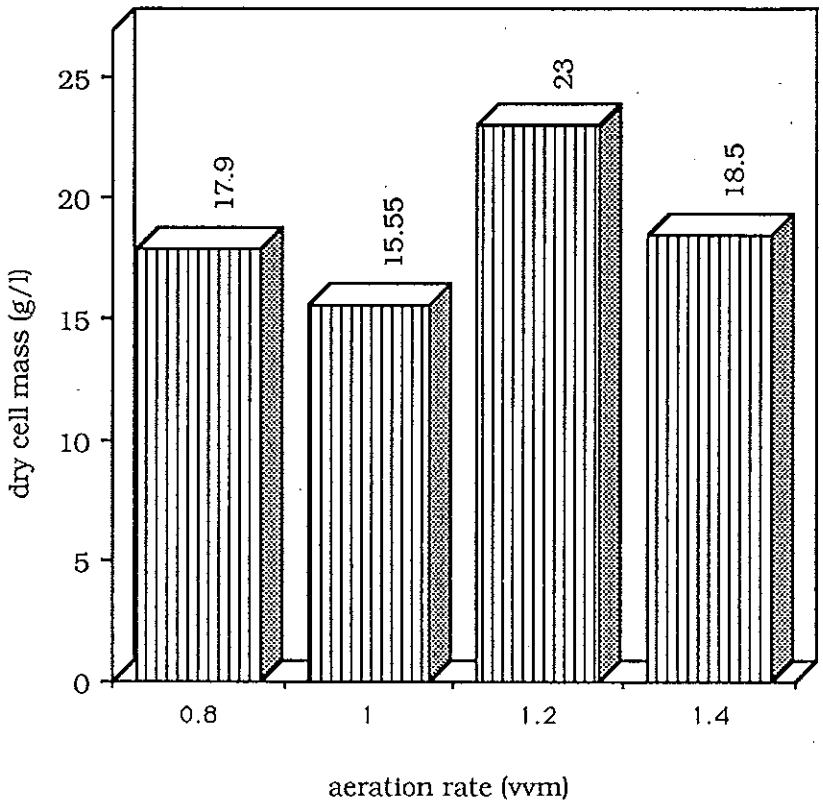
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการให้อากาศในอัตราต่าง ๆ

—□— 0.8 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที

—▲— 1.0 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที

—●— 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที

—○— 1.4 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที



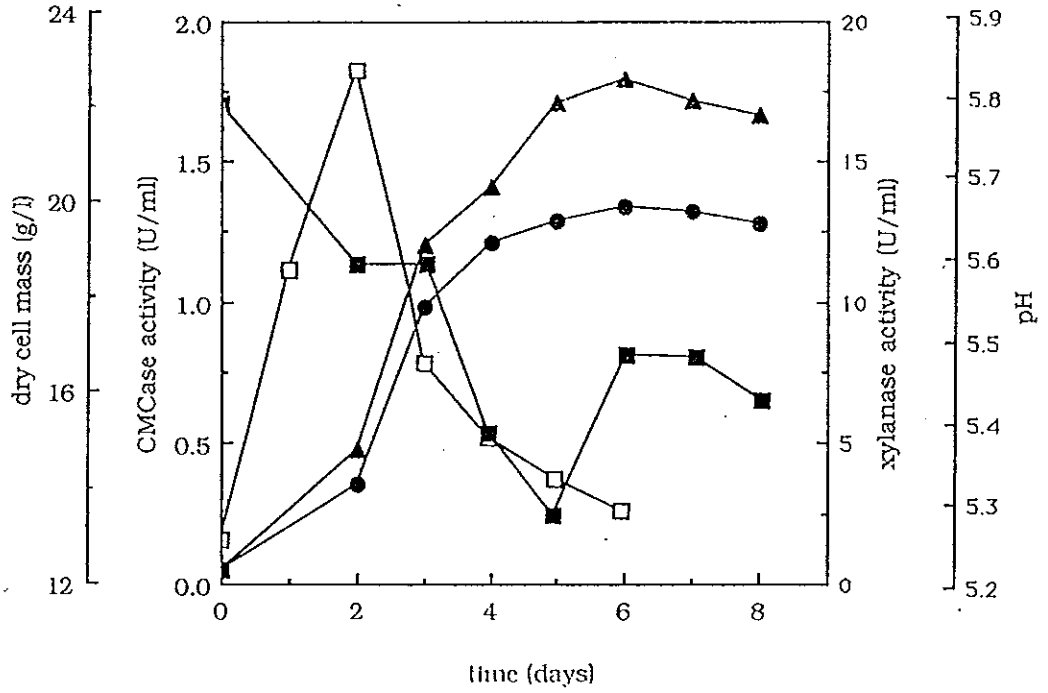
รูปที่ 17 ผลของอัตราการให้อากาศต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน

ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) ในถังหมัก แสดงในรูปที่ 18 ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ มีค่าเท่ากับ 1.34 และ 17.93 ยูนิต/มล. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ (รูปที่ 13) กิจกรรม CMCase มีค่าสูงกว่า ในขณะที่กิจกรรม xylanase มีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงในฟลาสก์เล็กน้อย การเลี้ยงเชื้อในถังหมักให้กิจกรรมของเอนไซม์ alfa-mannanase (Panda, 1989) รวมทั้ง FPase, xylanase และ beta-glucosidase (Gomes, *et al.*, 1992) ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ในสภาวะเดียวกัน ค่ากิจกรรม xylanase จาก *A. niger* ATCC 6275 สูงกว่าค่าที่ได้จาก *G. virens* (16.69 ยูนิต/มล.) *A. terreus* (10.83 ยูนิต/มล.) *T. phaseolina* (5.09 ยูนิต/มล.) และ *A. niger* (4.99 ยูนิต/มล.) แต่ต่ำกว่า xylanase ของเชื้อ *T. reesei* MCG 77 (27.99 ยูนิต/มล.) *T. viride* (19.87 ยูนิต/มล.) และ *T. harzianum* (19.44 ยูนิต/มล.) ส่วนค่ากิจกรรม CMCase จาก *A. niger* ATCC 6275 จะต่ำกว่าที่ได้จากทุกเชื้อข้างต้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.30, 3.25, 1.49, 1.37, 4.20, 2.85 และ 2.47 ยูนิต/มล. ตามลำดับ (Gomes, *et al.*, 1989)

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

2.1 วิธีการแปรสภาพกากปาล์ม

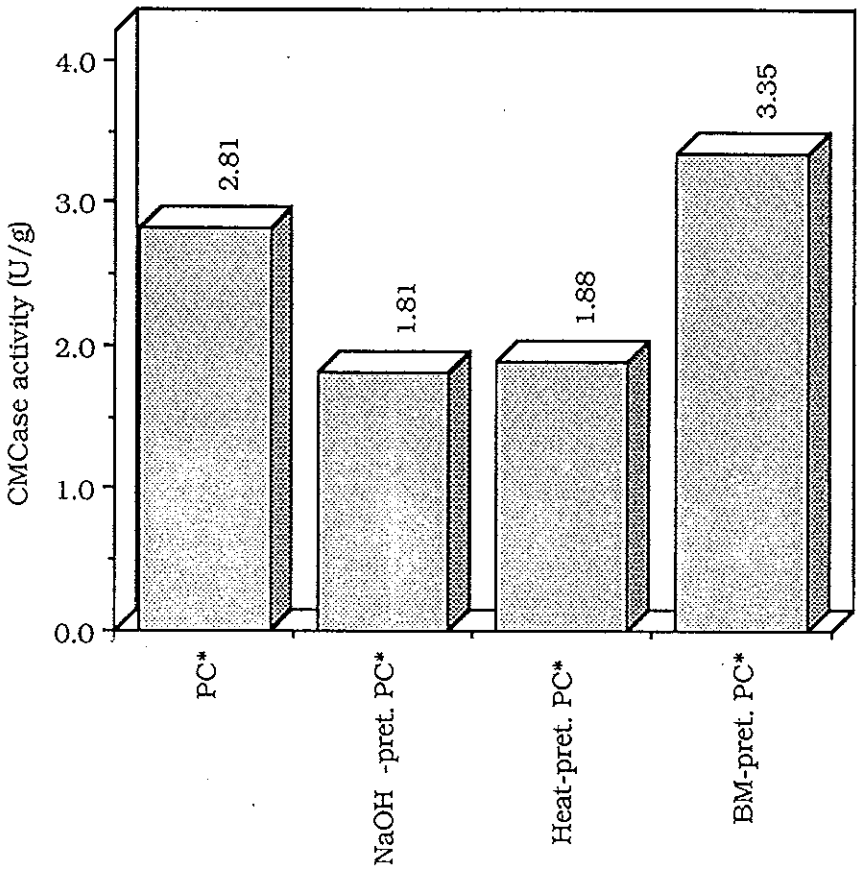
ผลการแปรสภาพกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ (รูปที่ 19, 20) พบว่าการใช้กากปาล์มที่ผ่านการบดด้วย ball mill ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 3.65 และ 21.61 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ รองลงมา ตามลำดับ คือการใช้กากปาล์มที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ (ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase เท่ากับ 2.91 และ 14.79 ยูนิต/กรัม รองลงมา ตามลำดับ) การใช้กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยด่างและด้วยความร้อน การบดด้วย ball mill ให้ผลดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mandels



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมของโรงงานน้ำมันปาล์มในถังหมักขนาด 2 ลิตร และมีการให้อากาศ 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที

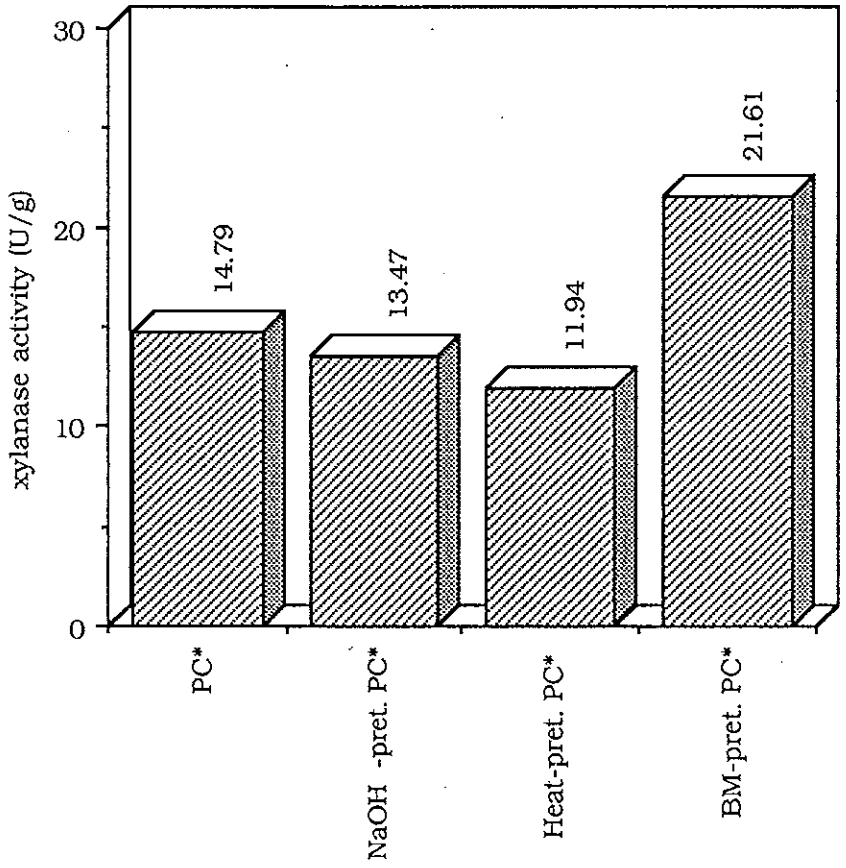
—●— กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase —□— น้ำหนักเซลล์แห้ง

—▲— กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase —■— พีเอช



รูปที่ 19 ผลของการใช้กากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

*PC	กากปาล์มบด
NaOH-pret. PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH
Heat-pret. PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน
BM-pret. PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill



รูปที่ 20 ผลของการใช้กากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

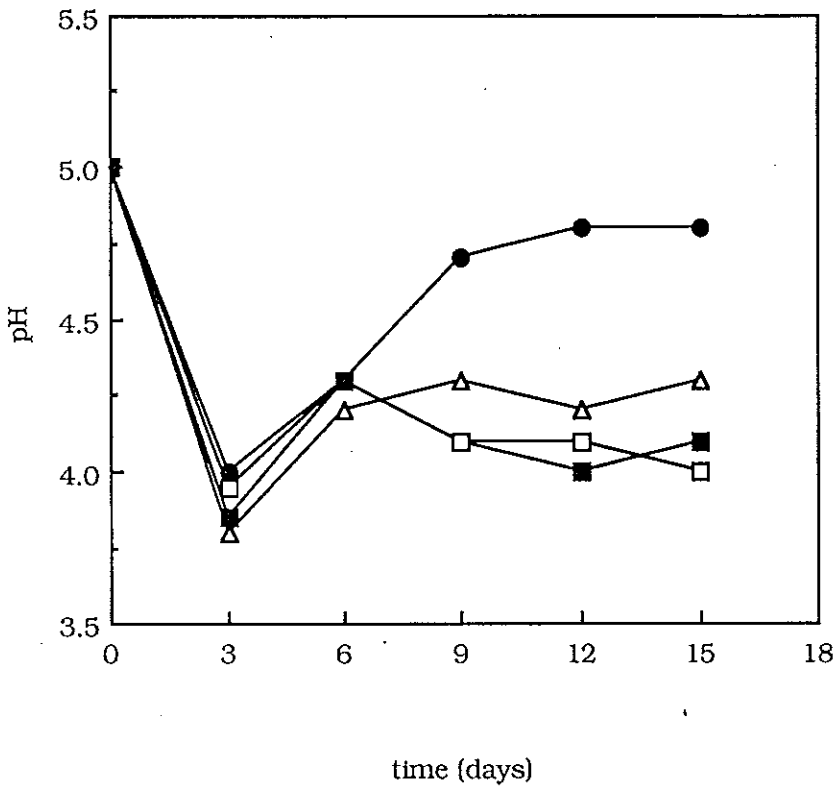
*PC	กากปาล์มบด
NaOH-pret. PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH
Heat-pret PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน
BM-pret. PC	กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill

และ Sternberg (1976) การที่วิธีการแปรสภาพด้วยด่างหรือความร้อนไม่มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน อาจเนื่องจากกากปาล์มที่นำมาเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้ ผ่านการให้ความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตมาแล้ว เช่นเดียวกับการใช้ Aspen pulp ที่แปรสภาพโดยกระบวนการ chemical-thermomechanical ด้วยด่างซึ่งไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Chahal, 1985) ถึงแม้ว่าการบดด้วย ball mill จะเป็นวิธีการที่ดี แต่จะสิ้นเปลืองพลังงานมาก (Ghose and Ghose, 1979) และเนื่องจากไม่มีเครื่องมือ (ball mill) จึงเลือกใช้กากปาล์มบดในการทดลองขั้นต่อไป

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์มที่แปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ (รูปที่ 21) พบว่า หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน พีเอชของกากปาล์มลดลงจาก 5.0 เป็น 3.8-4.0 จากนั้นพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีการใช้กากปาล์มที่ผ่านการบดด้วย ball-mill ซึ่งเพิ่มขึ้นจนมีพีเอชประมาณ 4.8 หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน สำหรับการใช้กากปาล์มบดและกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยด่าง และความร้อน จะมีค่าพีเอชในช่วง 4.0-4.3

2.2 ชนิดและแหล่งไนโตรเจน

เมื่อใช้รำข้าวสาลีหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบผลกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ช (ชุดควบคุม)ซึ่งมีไนโตรเจน 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบ คือโพลีเปปโตน ยีสต์สกัด และโปรตีโอสเปปโตน (รูปที่ 22, 23) พบว่าค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของยูเรียและรำข้าวสาลีที่เพิ่มขึ้น การใช้ยูเรียร้อยละ 1.0 และการใช้กากปาล์ม: รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 4:1 ให้ค่ากิจกรรม CMCase ที่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) ส่วนค่ากิจกรรม xylanase แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ยูเรียร้อยละ 1.0 และการใช้กากปาล์ม:รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 5:1 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างยูเรียกับรำข้าวสาลีพบว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า โดยมีค่ากิจกรรม CMCase (22.69 ยูนิต/กรัม) และ xylanase (183.70 ยูนิต/กรัม) สูงสุดเมื่อใช้ยูเรียร้อยละ 2.0 ค่ากิจกรรม CMCase ที่สูงรองลงมาตามลำดับ ได้จากการ



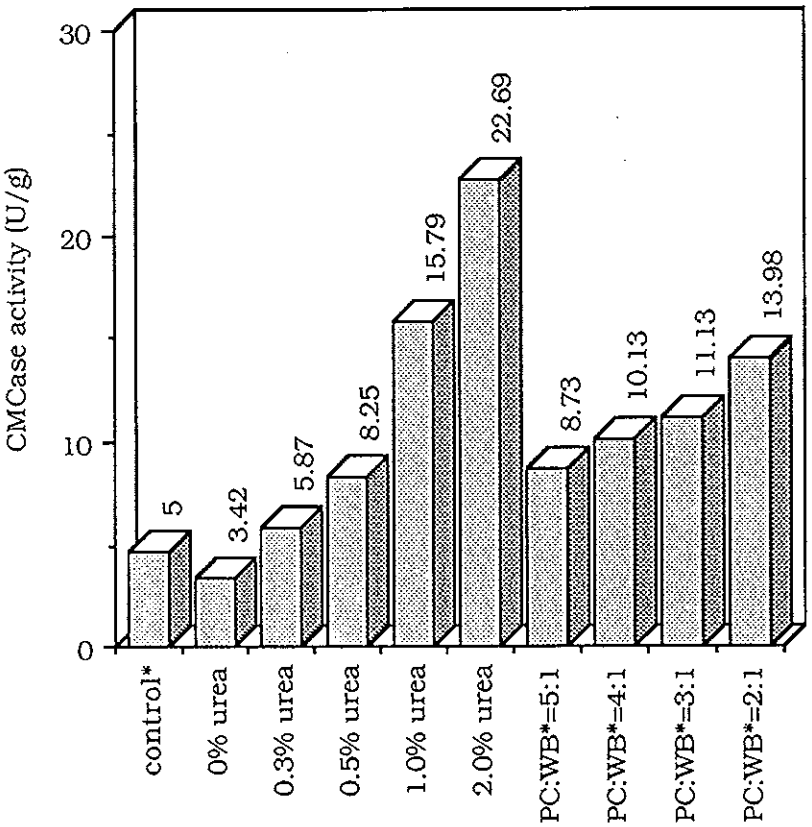
รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ

—△— กากปาล์มบด

—■— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH

—□— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน

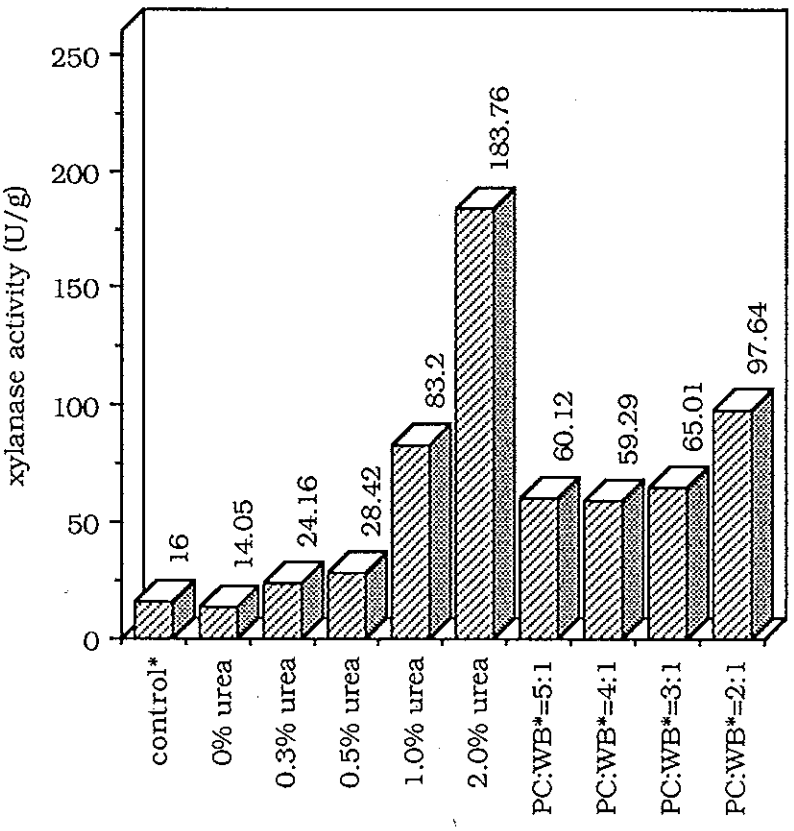
—●— กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill



รูปที่ 22 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

*control กากปาล์ม + อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ซ

PC : WB กากปาล์ม : รำข้าวสาลี



รูปที่ 23 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

* control กากปาล์ม + อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข

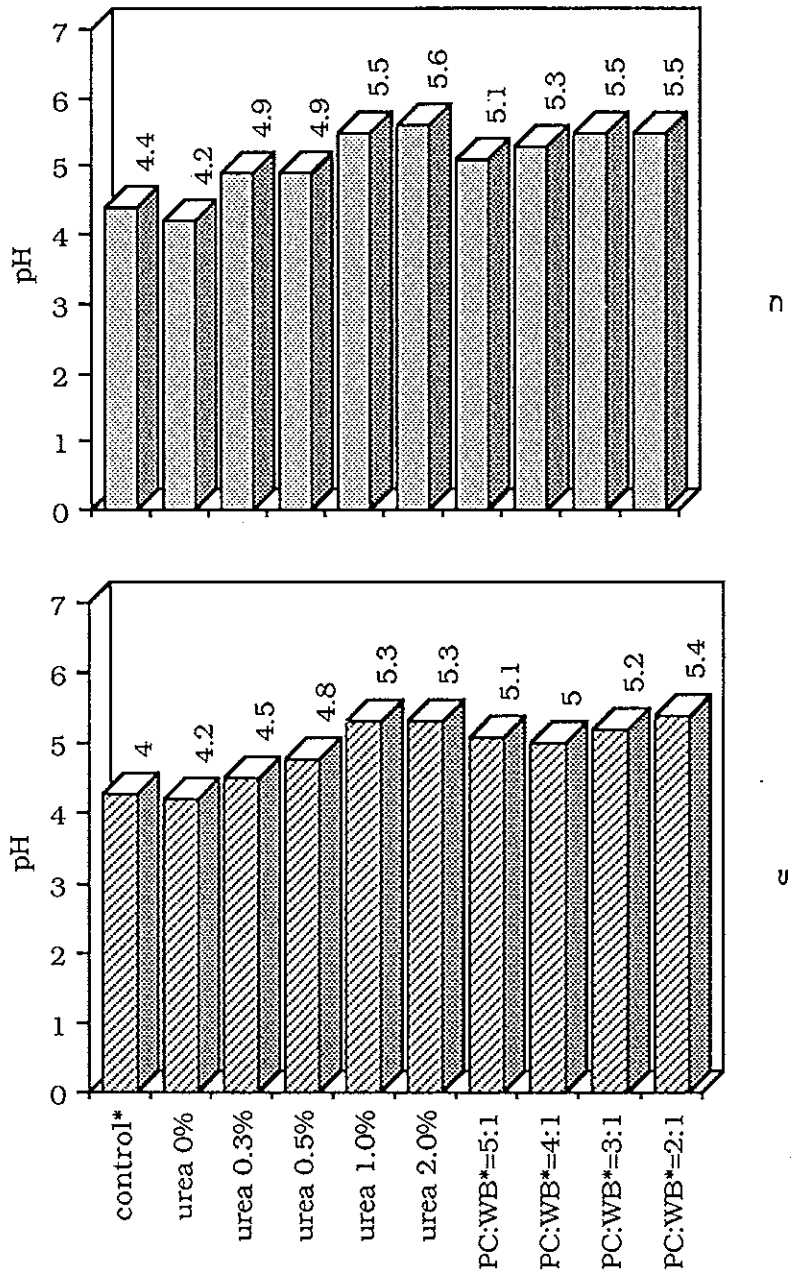
PC : WB กากปาล์ม : รำข้าวสาลี

ใช้ยูเรียร้อยละ 1.0 (15.79 ยูนิต/กรัม) และการใช้กากปาล์ม:รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 2:1 (13.98 ยูนิต/กรัม) ส่วนค่ากิจกรรม xylanase ที่สูงรองลงมาได้จากการใช้กากปาล์ม:รำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 2:1 (97.64 ยูนิต/กรัม) และการใช้ยูเรียร้อยละ 1.0 (83.20 ยูนิต/กรัม) จะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจน มีผลต่อค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase มาก อาจเนื่องจากในกากปาล์มมีปริมาณไนโตรเจนน้อยมาก จากการสังเกตการเจริญของเชื้อ การใช้ยูเรียร้อยละ 2.0 มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ แต่หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน และการเพิ่มไนโตรเจนมากเกินไป ค่าพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูงซึ่งไม่เหมาะในการผลิตเอนไซม์ (Joglekar and Karanth, 1984) จึงคิดว่าการใช้ยูเรียร้อยละ 2.0 เพียงพอในการผลิตเอนไซม์ทั้งสอง

การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่ใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ (รูปที่ 24) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 3 วัน จากพีเอชเริ่มต้น 5.0 พีเอชลดลงมากในชุดควบคุมและที่ไม่เติมหรือเติมยูเรียปริมาณน้อย (ร้อยละ 0.3 และ 0.5) มีค่าพีเอชในช่วง 4.2-4.8 ส่วนในกรณีที่เติมยูเรียในความเข้มข้นสูงขึ้น (ร้อยละ 1.0 และ 2.0) และการผสมรำข้าวสาลีในกากปาล์มมีผลให้พีเอชเพิ่มขึ้นสูงกว่าพีเอชเริ่มต้นมีค่าในช่วง 5.0-5.5

2.3 <u>ความชื้นเริ่มต้น</u>

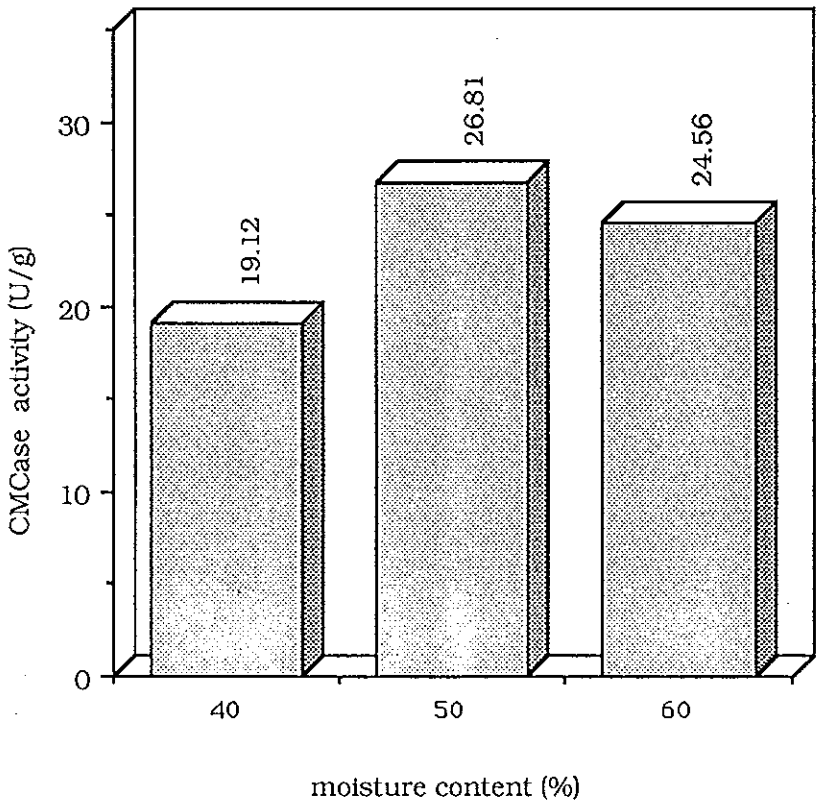
ผลของความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 40, 50 และ 60) ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 (รูปที่ 25, 26) พบว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ให้ค่ากิจกรรม CMCase สูงสุด (26.81 ยูนิต/กรัม) หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อ 12 วัน สูงกว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 อย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) และที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ค่ากิจกรรม CMCase ลดลงเล็กน้อย แต่กิจกรรม xylanase ยังคงเพิ่มขึ้น (218.35 ยูนิต/กรัม) และมีค่าสูงกว่าที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม กิจกรรม xylanase สูงสุดที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมสูงสุดหลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน ค่าความชื้นที่ได้ใกล้เคียงกับความชื้นที่เหมาะสม (ร้อยละ 55) ที่ทำให้



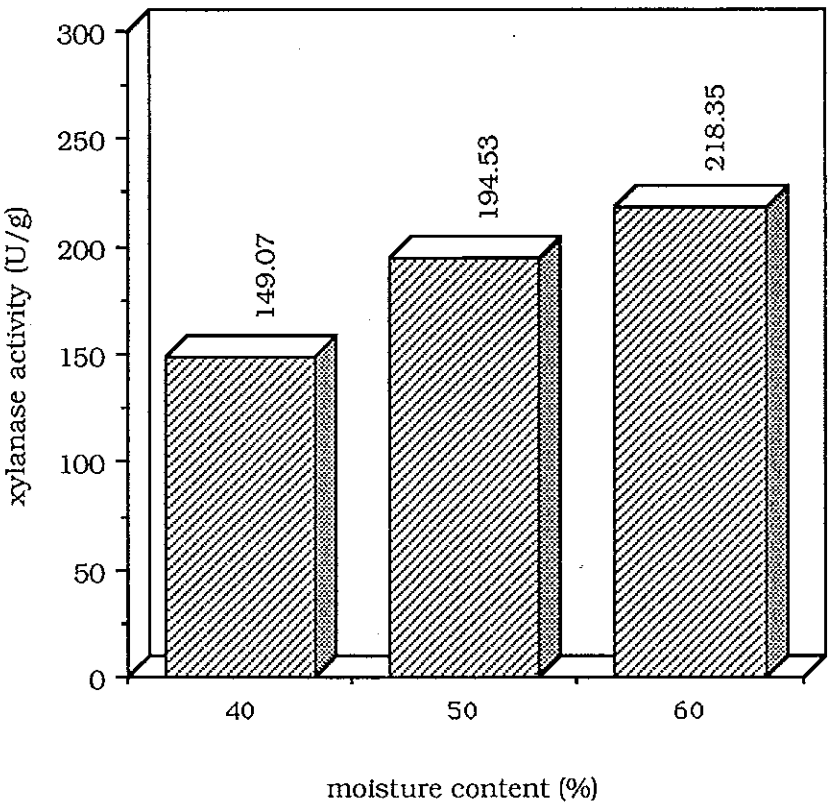
รูปที่ 24 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มเป็นเวลา 9 วัน (รูป ก) และ 3 วัน (รูป ข) สำหรับค่าสูงสุดของ CMCase และ xylanase ตามลำดับ

*control กากปาล์ม + อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ข

PC : WP กากปาล์ม : รำข้าวสาลี



รูปที่ 25 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 26 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

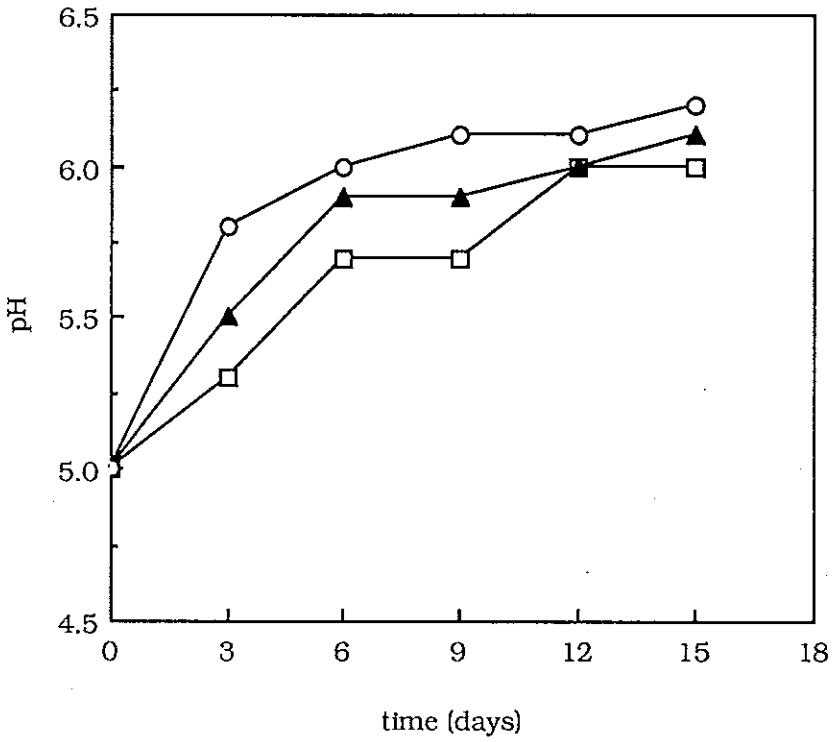
การเจริญและการสร้างโปรตีนของ *A. niger* สูงสุด (Raimbault and Alazard, 1980) จากการทดลองนี้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต CMCase และ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม คือความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50-60 ส่วนการเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 27) พบว่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก การเพิ่มขึ้นของพีเอชลดลงในช่วง 6-15 วัน พีเอชสุดท้ายเป็น 5.9, 6.0 และ 6.1 ที่ความชื้นเริ่มต้น ร้อยละ 40, 50 และ 60 ตามลำดับ

2.4 อุณหภูมิ

จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง, 35 และ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 28, 29) พบว่ากิจกรรม/CMCase สูงสุดที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสูงสุด (21.60 ยูนิต/กรัม) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรม xylanase มีค่าลดลงตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น โดยค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิห้อง (262.21 ยูนิต/กรัม) และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (250.92 ยูนิต/กรัม) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จึงอยู่ในช่วงอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ถึง 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต FPase (32 องศาเซลเซียส) xylanase (34 องศาเซลเซียส) และ beta-glucosidase (31 องศาเซลเซียส) แต่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (35-45 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญและการผลิต exo- และ endoglucanase ของ *A. fumigatus* (Stewart and Parry, 1981) และต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (35-40 องศาเซลเซียส) ต่อการเจริญของ *A. niger* ในการหมักแบบอาหารแข็ง (Raimbault and Alazard, 1980) ในการเลี้ยงเชื้อพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรกของการหมัก(พีเอช 6.2-6.6) หลังจากนั้นพีเอชลดลงและค่อนข้างคงที่หลังการหมักเป็นเวลา 12 วัน (รูปที่ 30)

2.5 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น

ปริมาณสปอร์เริ่มต้นมีผลต่อการเพิ่มค่ากิจกรรม CMCase แต่ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรม xylanase (รูปที่ 31, 32) ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^8 สปอร์/กรัม

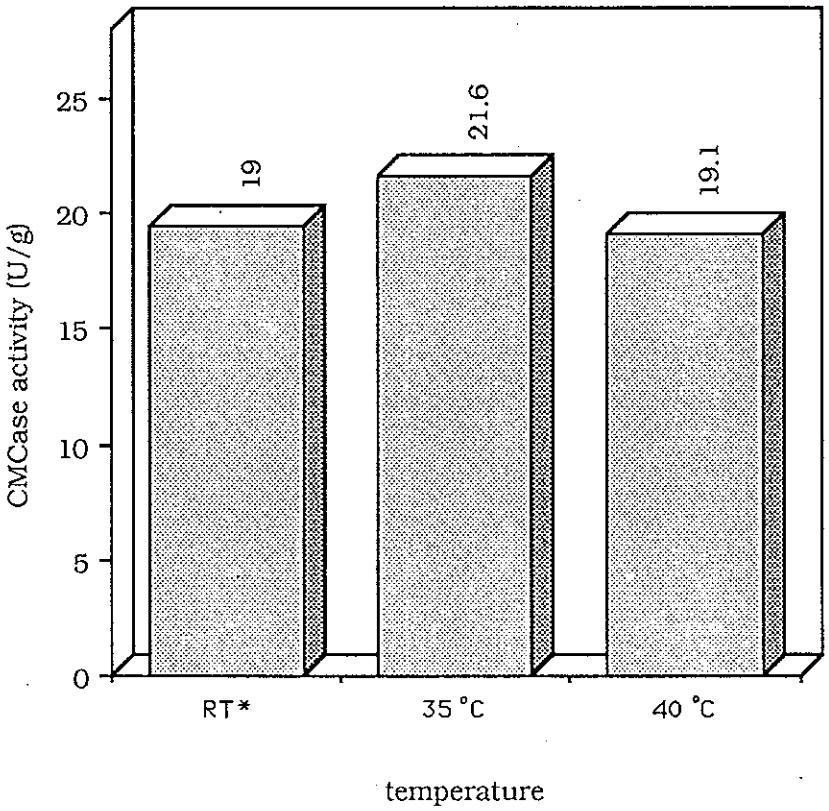


รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่ระดับความชื้นเริ่มต้นต่าง ๆ

—□— ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40

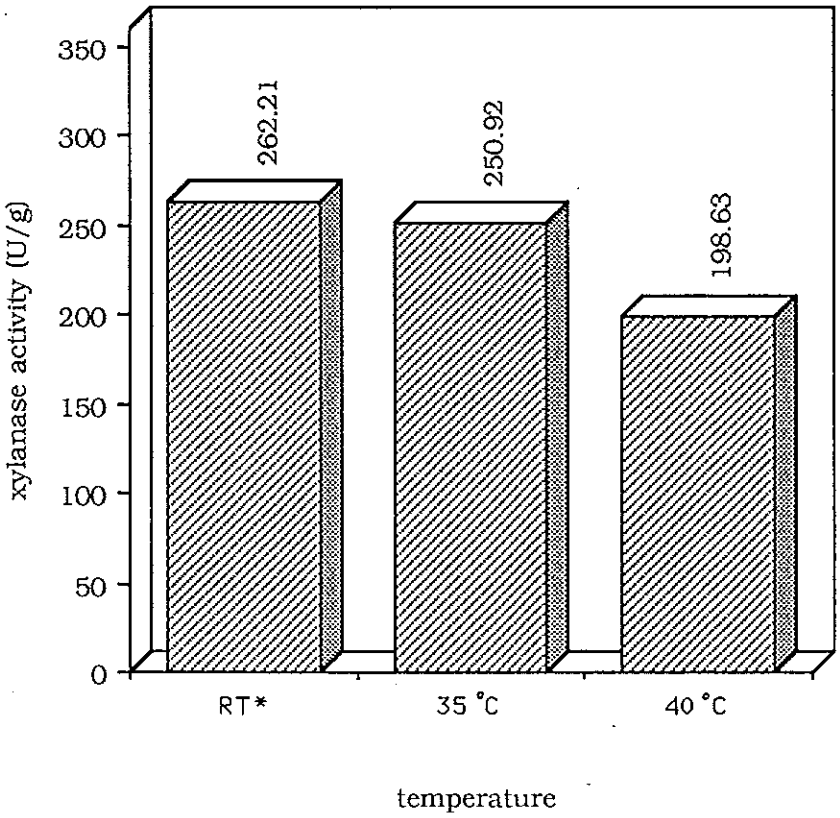
—▲— ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50

—○— ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60



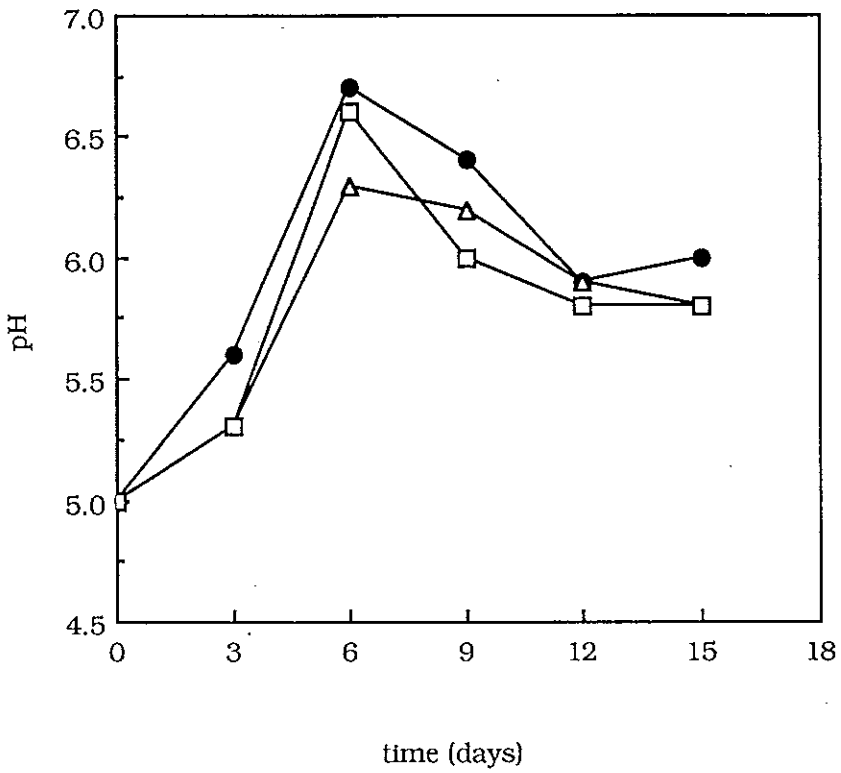
รูปที่ 28 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 12 วัน

*RT อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน

*RT อุณหภูมิห้อง

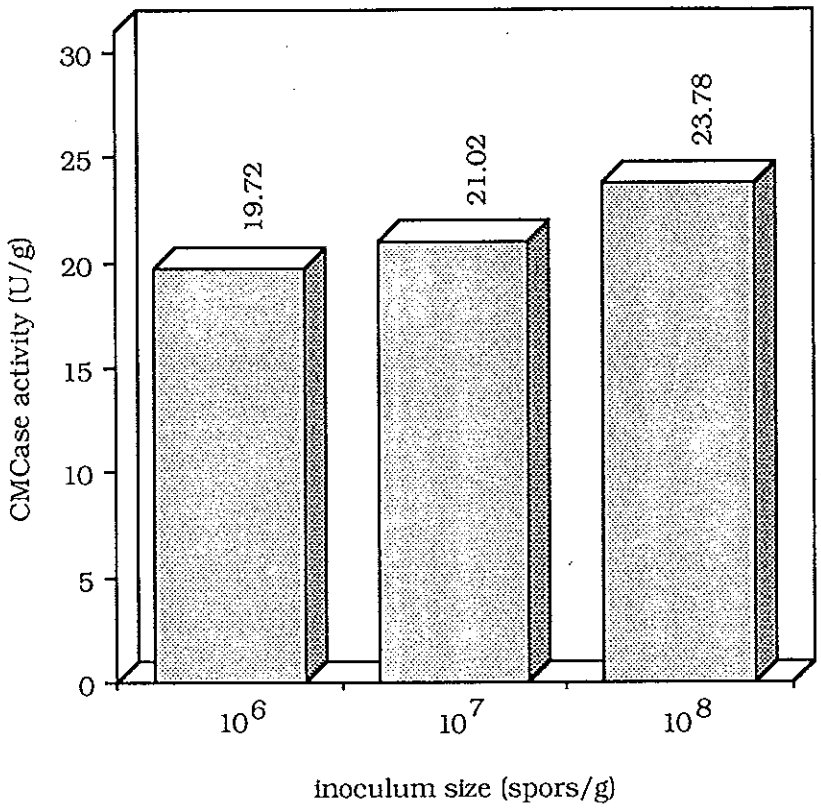


รูปที่ 30 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

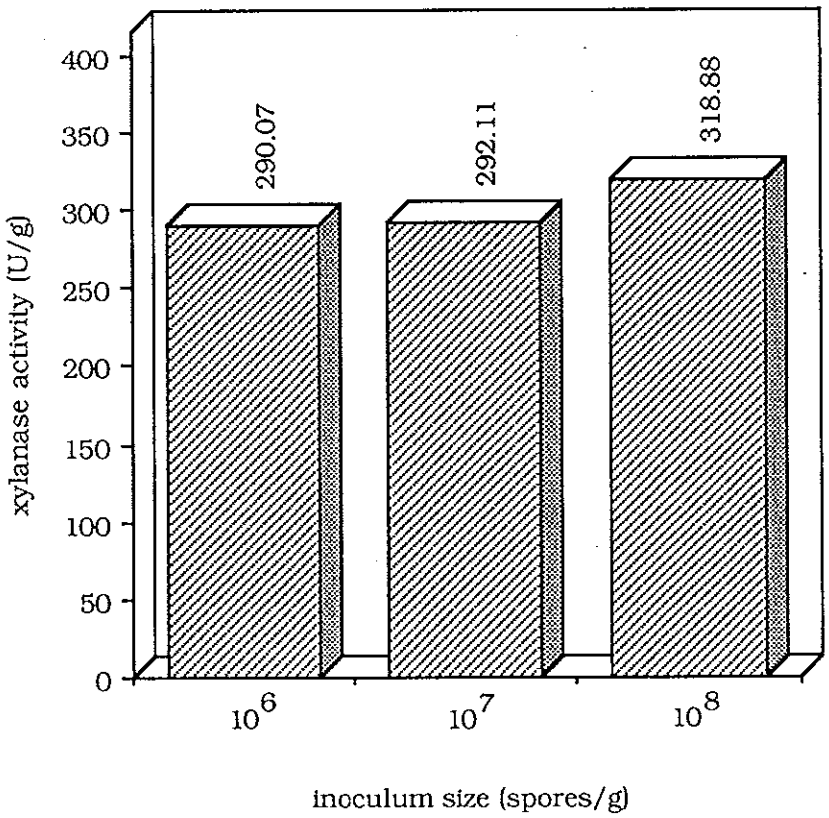
—●— อุณหภูมิห้อง

—△— 35 องศาเซลเซียส

—□— 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 31 ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 32 ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

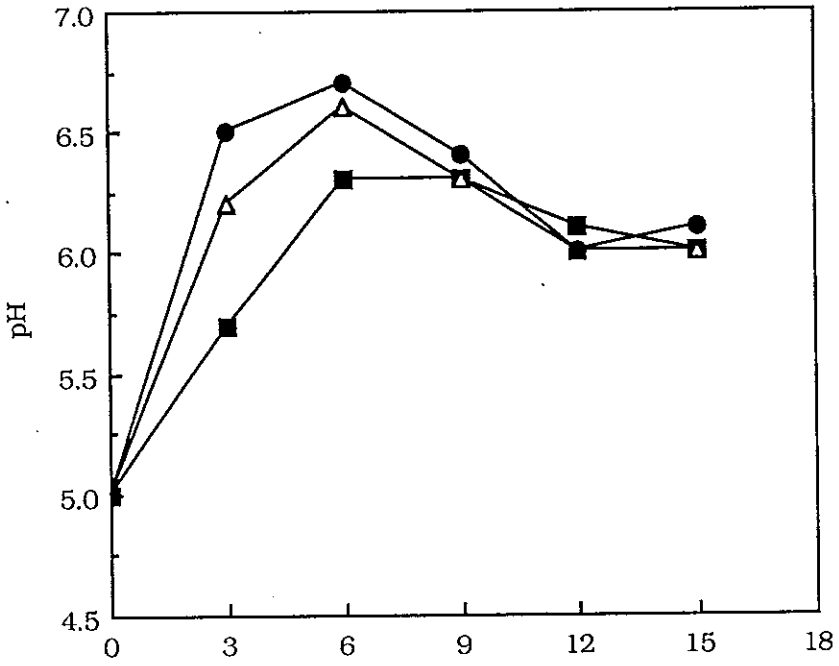
ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 23.78 และ 318.8 ยูนิต/กรัม หลังการเลี้ยงเชื้อ 9 และ 3 วัน ตามลำดับ เป็นผลให้การผลิตเอนไซม์ (CMCase) เร็วขึ้น คือลดระยะเวลาการผลิตจากเดิม 12 วัน เป็น 9 วัน การเพิ่มปริมาณสปอร์เริ่มต้นในการเลี้ยง *A. oryzae* มีผลให้เอนไซม์โปรตีเอสเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกัน (Battaglino, *et al.*, 1991) การเพิ่มปริมาณสปอร์ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรม xylanase อาจเนื่องจากผลที่เกิดขึ้น อาจเกิดในช่วง 1 และ 2 วันแรก ซึ่งไม่ได้วิเคราะห์หาค่ากิจกรรม xylanase หรือปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์/กรัม เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ xylanase ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอช (รูปที่ 33) พบว่าพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณสปอร์ที่เพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 6.3, 6.6 และ 6.7 เมื่อใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6, 10^7 และ 10^8 สปอร์/กรัม ตามลำดับ

2.6 พีเอชเริ่มต้น

ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 แสดงในรูป 34 และ 35 จะเห็นว่าการใช้พีเอชเริ่มต้น 5.0 (พีเอชเดิมของกากปาล์ม) ให้ค่ากิจกรรม CMCase สูงสุด (23.82 ยูนิต/กรัม) และพีเอชเริ่มต้น 4.5 ให้ค่ากิจกรรม xylanase สูงสุด (282.90 ยูนิต/กรัม) หลังจากการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ ที่สูงรองลงมา คือที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 (23.07 ยูนิต/กรัม) และ 5.0 (271.80 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) ดังนั้น พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดจึงอยู่ในช่วงพีเอช 4.5-5.0 (Lonsane, *et al.*, 1985)

นอกจากนี้จากการสังเกตการเจริญของไมซีเลียมและการสร้างสปอร์ พบว่าพีเอชเริ่มต้น 3.5 เชื้อเจริญและสร้างสปอร์ช้ากว่าที่พีเอชเริ่มต้นอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด แต่แม้ว่าพีเอชเริ่มต้นจะมีความแตกต่างกันมาก (พีเอช 3.5-5.5) แต่หลังการหมัก 15 วัน ค่าพีเอชจะใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 5.8-6.2 (รูปที่ 36)

จากการเลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 15 วัน ในสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อ (ใช้กากปาล์มบด ยูเรียร้อยละ 2.0 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 บ่มที่อุณหภูมิ

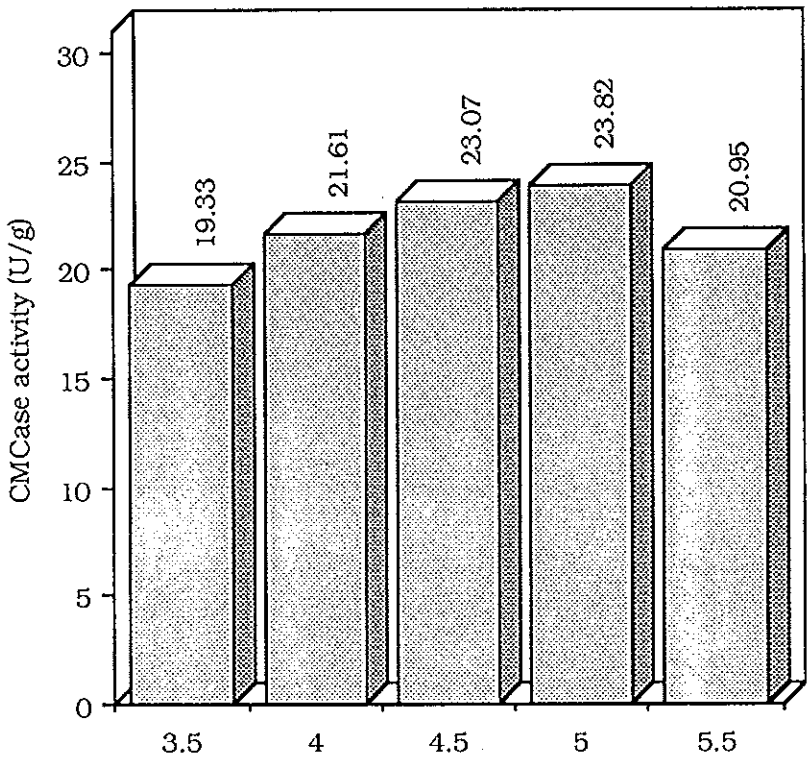


รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มโดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่าง ๆ

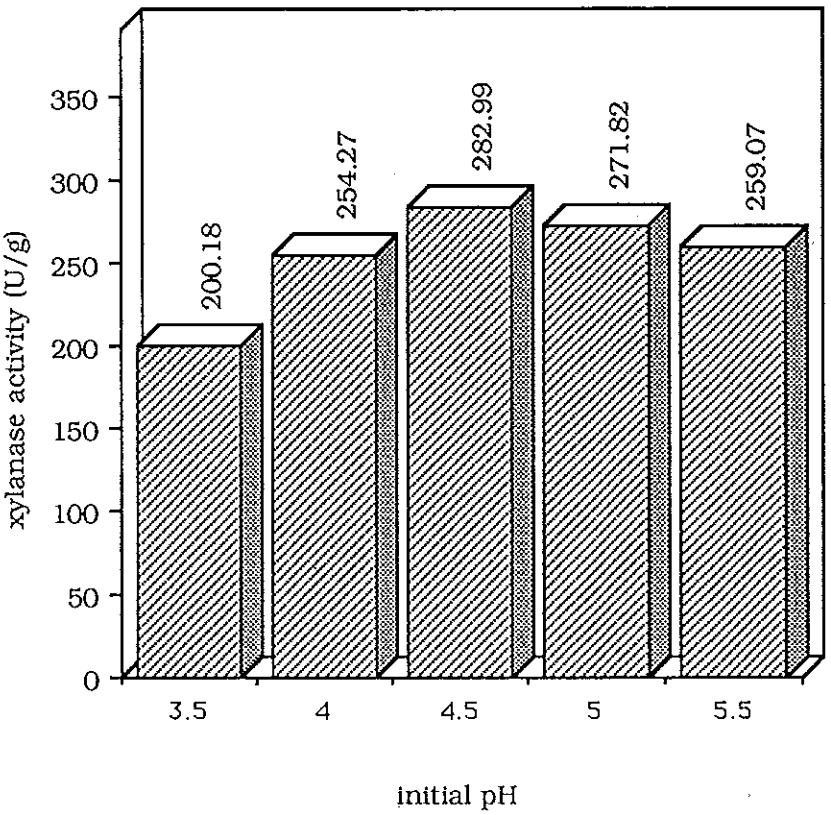
—■— 10^6 สปอร์/กรัมกากปาล์ม

—△— 10^7 สปอร์/กรัมกากปาล์ม

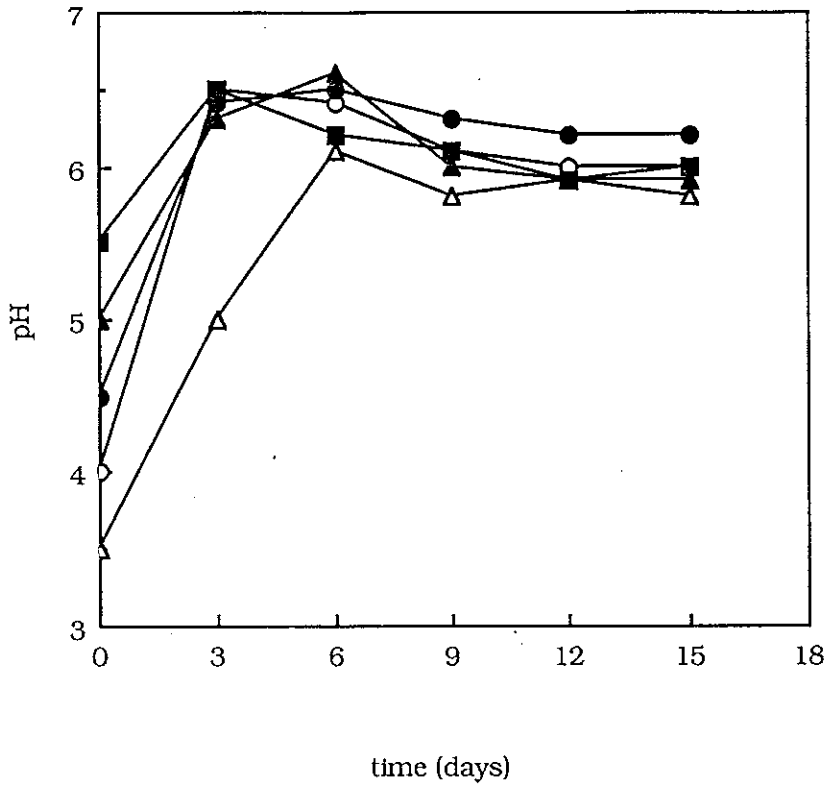
—●— 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม



รูปที่ 34 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 35 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์มที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ

—△— พีเอช 3.5

—○— พีเอช 4.0

—●— พีเอช 4.5

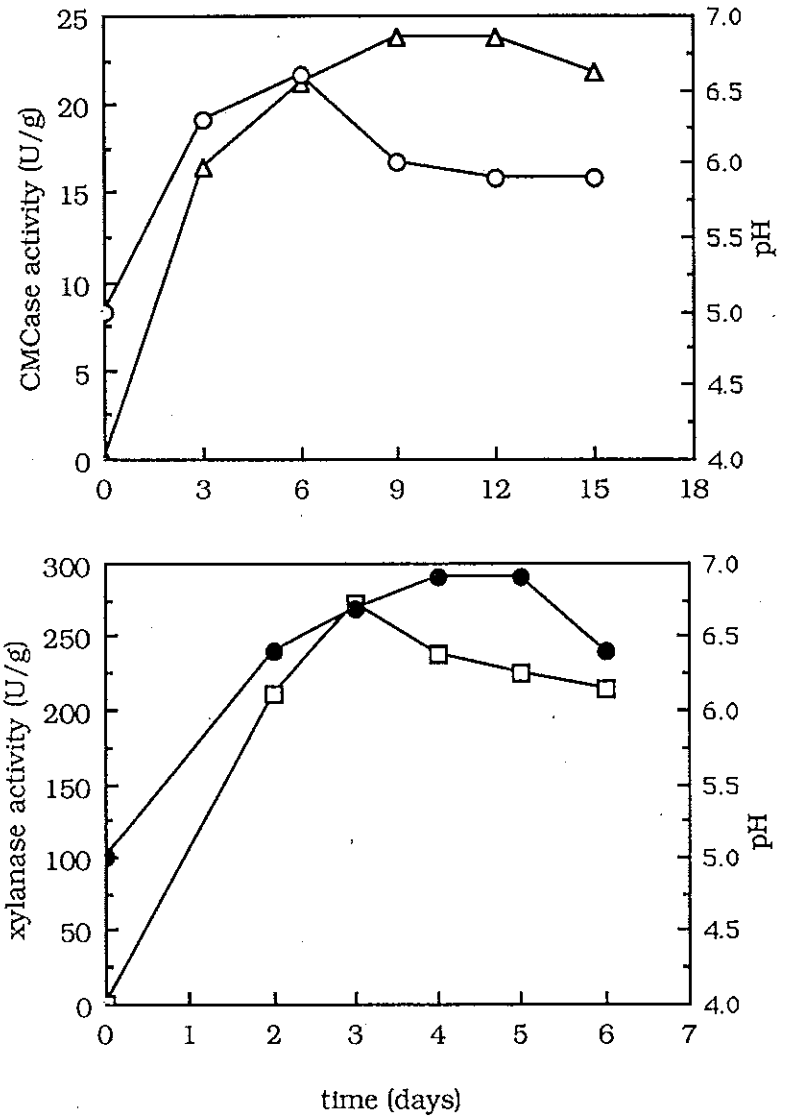
—▲— พีเอช 5.0

—■— พีเอช 5.5

ห้อง ปริมาณสปอร์ 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม และที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 จะเห็นได้ว่า *A. niger* ATCC 6275 ผลิตเอนไซม์ xylanase ก่อนเอนไซม์ CMCase (รูปที่ 37) นั่นคือเชื้อจะใช้เฮมิเซลลูโลสในช่วงแรกของการเจริญ (ภายใน 3 วันแรก) และมีการใช้เซลลูโลสในระยะต่อมา ทั้งนี้เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่ย่อยได้ง่ายกว่าเซลลูโลส (Chahal, 1986)

ค่ากิจกรรม CMCase สูงสุด (23.82 ยูนิต/กรัม) และ xylanase (271.80 ยูนิต/กรัม) ที่ได้จากการทดลองนี้ สูงกว่าค่าสูงสุดที่ได้จากเชื้อ *Sporotrichum pulverulentum* ซึ่งให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 8.88 และ 69.32 ยูนิต/กรัม เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลี เท่ากับ 20.00 และ 225.01 ยูนิต/กรัม เมื่อเลี้ยงในฟางข้าว และเมื่อเลี้ยง *A. ustus* ให้ค่ากิจกรรม CMCase และ xylanase สูงสุดเท่ากับ 11.84 และ 615.26 ยูนิต/กรัม เมื่อเลี้ยงในรำข้าวสาลี เท่ากับ 12.58 และ 740 ยูนิต/กรัม เมื่อเลี้ยงในฟางข้าว และเท่ากับ 12.94 และ 740 ยูนิต/กรัม เมื่อเลี้ยงโดยผสมรำข้าวสาลี : ฟางข้าว ในอัตราส่วน 1:9 (Shamala and Sreekantiah, 1986) จะเห็นว่าชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของสับสเตรตมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ปริมาณโปรตีนหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม (15 วัน) พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 17.70 ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *A. niger* JB 1984 ในเปลือกส้ม (Essilfie, *et al.*, 1986) และ *A. ustus* ในรำข้าวสาลี (Shamala and Sreekantiah, 1986) ซึ่งให้ปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 13 และ 12.87 ตามลำดับ



รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม ภายใต้สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

—△— กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase

—○— พีเอช

—□— กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase

—●— พีเอช

สรุป

จากการใช้น้ำทิ้งรวมของโรงงานน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อเติมกากปาล์มบดร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ NH_4NO_3 เข้มข้น 0.60 กรัม/ลิตร ลงในน้ำทิ้งรวม และให้อากาศระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอัตรา 1.2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที กิจกรรมสูงสุดของ CMCase และ xylanase เท่ากับ 1.34 และ 17.93 ยูนิต/มล. ตามลำดับ มวลชีวภาพที่ได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase และ xylanase จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์มแบบอาหารแข็ง คือการใช้กากปาล์มบด และเติมยูเรียร้อยละ 2.0 ความชื้นเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 50-60 อุณหภูมิ ในช่วงอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ถึง 35 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม และพีเอชเริ่มต้นในช่วง 4.5-5.0 ค่ากิจกรรมสูงสุดของ CMCase และ xylanase เท่ากับ 23.8 และ 282.9 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม ตามลำดับ และมวลชีวภาพที่ได้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 17.7 ต่อน้ำหนักแห้ง

ข้อเสนอแนะ

1. การเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในน้ำทิ้งรวมของโรงงานน้ำมันปาล์มขั้นต่อไป ควรศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ได้แก่ การควบคุมพีเอช การเติมเกลือแร่ หรือสารบางตัว ฯลฯ นอกจากนี้ควรศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก

2. การเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในกากปาล์ม ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง ควรมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก ๆ โดยใช้อุปกรณ์ที่หาง่ายและราคาไม่แพง

เอกสารอ้างอิง

ชวาลวุฒิ ไชยนุวัติ. 2534. สถานการณ์การผลิตน้ำมันปาล์มปี 2533/2534. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการวิจัยน้ำมันและน้ำมันปาล์ม ครั้งที่ 1 จัดโดยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ วันที่ 16 พฤษภาคม 2534. 10 หน้า.

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์มโดยเชื้อราที่แยกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 131 หน้า.

ผาสุข กุลละวณิชย์, สัณห์ชัย กลิ่นพิกุล, สุมณฑา กุลละวณิชย์ และสุรเชษฐ์ ชิระมณี. 2531. โครงการแปรรูปผลิตภัณฑ์และพัฒนาด้านการตลาดของโรงงานหีบน้ำมันปาล์มขนาดเล็กตามพระราชดำริ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 175 หน้า.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณลักษณะของน้ำเสียของโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว.สงขลานครินทร์ 12(2):169-176.

Agamuthu, P. and Tan, E.L. 1985. Digestion of dried palm oil mill effluent by *Cellulomonas* species. Microbios Lett. 30: 109-113.

A.O.A.C. 1984. Official Method of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 14ed. Association of official Analytical chemists, Inc., USA.

Barker, T.W., Drouliscos, N.J. and Worgan, J.T. 1981. Composition and nutritional evaluation of *Aspergillus oryzae* biomass grown on palm oil processing effluents. J. Sci. Food Agric.

32:1014-1020.

Barker, T.W. and Worgan, J.T. 1981. The utilization of palm oil processing effluents as substrate for microbial protein by the fungus *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Appl. Microbiol. 11:234-240.

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 35:292-296.

Bek-Nielson, D.B. 1987. Palm oil processing technology past, present and future. *In* International oil palm/palm oil conferences progress & prospects: Conference II : 29 June - 1 July 1987. Kuala Lumpur, Malaysia. 18 pp.

Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Grabl, M. 1984. Metabolistes 1 : Carbohydrates. *In* Methods of Enzymatic Analysis. Third Edition, Volume VI Gmbh Verlag Chemie. pp. 22-29.

Chahal, D.S. 1983. Foundation of biochemical engineering, kinetics and thermodynamics *In* Biological System ACS Symp. Ser. no. 207. (Blanch, H.W., Papautsakis, E.T. and Stephanopoulos, G., eds.) American Chemical Society, Washington, DC. pp. 421-442.

Chahal, D.S. 1985. Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Appl. Environ. Microbiol. 49(1): 205-210.

Chahal, D.S. 1986. A new approach in solid state fermentation

for cellulase production. *In* Biotechnology and Renewable Energy. (Moo-Young, M., Hasnain, S. and Lamptey, J., eds.) Elsevier Applied Science Publishes. Essex, England. p. 57-69.

Cheah, S.C., Ma, A.N., Ooi, L.C.L. and Ong A.S.H. 1988. Biotechnological applications for the utilization of wastes from palm oil mills. Fat Sci. Technol. p. 536-540.

Cheah, S.C. and Ooi, L.C.L. 1984. Isolation of thermophilic cellulolytic fungi. Paper Presented at the Regional UNESCO Symposium on Applied Microbiology, Bangkok and Khon Kean, Thailand, 23-27 December, 1984.

Cheah, S.C. and Ooi, L.C.L. 1985. Development of a process for palm oil mill steriliser condensate utilization. Paper presented at National Symposium on Oil Palm by-product for Agro-based Industry, Kuala Lumpur, Malaysia, Nov. 5-6, 1985, p. 203-220.

Chua, N.S. and Gian, H.L. 1986. Biogas production and utilization Kech Seng's experience. Reprint National Workshop on Recent Developments in Palm Oil Milling Technology and Pollution Control, Kuala Lumpur, 5-6 August, 1986, 10pp.

Coutts, A.D. and Smith, R.E. 1976. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. Appl. and Environ. Microbiol. 31:819-821.

Desrochers, M., Jurasek, L. and Paice, M.R. 1981. High production of beta-glucosidase in *Schizophyllum commune* :

Isolation of the enzyme and effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. Appl. Environ. Microiol. 41:222-228.

Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R.M. and Steinmuller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26:485-494.

D'souza, J. and Volfova, O. 1982. The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16:123-125.

Edewor, J.O. 1986. A comparison of treatment methods for palm oil mill effluent (POME) wastes. J. Chem. Tech. Biotechnol. 36: 212-218.

Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. Applied Science Publishers, London and New York. p. 183-223.

Essilfie, R.J., Bavor, J.H. and Scurray, G. 1986. Protein upgrading of orange peel waste for potential stock feed by solid substrate fermentation. ASEAN Food J. 2(1)25-30.

Forage, A.J. and Righelato, R.C. 1979. Biomass from carbohydrates. *In* Microbial Biomass. (Rose, A.H.ed.) Academic Press, New York. p. 289-319.

Ghose, T.K. and Ghose, P. 1979. Cellulase production and cellulase hydrolysis. Process Biochem. 20-24.

Goksoyr, J. and Eriksen, J. 1980. Cellulase : Microbial enzymes and bioconversions, Economic Microbiology, Vol 5. (Rose, A.H., ed.) Academic Press, London. p. 283-330.

Gomes, J., Esterbauer, H., Gomes, I. and Steiner, W. 1989. Screening of some wild fungal isolates for cellulolytic activities. Letters in Appl. Microbiol. 8:67-70.

Gomes, J., Gomes, I, Esterbauer, H., Kreiner, W. and Steiner W. 1989. Production of cellulases by a wild strain of *Gliocladium virens* : Optimization of the fermentation medium and partial characterization of the enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31 : 601-608.

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W. and Esterbauer, H. 1992. Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:701-707.

Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. 1972. Introduction to Plant Bio-Chemistry. 1st ed. Pergamon Press. New York. p. 52-73.

Grajek, W. 1988. Production of protein by thermophilic fungi from sugar-beet pulp in solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng. 32:255-260.

Greenshields, R.N. 1981. Review of progress of tower fermentation system for treatment of palm oil mill effluent. Proc. 3 MOPGC Symp. Treat. Disp. Palm Oil Mill Effl. 1977-78 Part C. p. 178-185.

Han, Y.W. and Srinivasan, V.R. 1968. Isolation and characterization of cellulose utilizing bacterium. Appl. Microbiol. 16: 1140-1146.

Hwang, T.K., Ong, S.M., Scow, C.C. and Tan, H.K. 1978. Chemical composition of palm oil mill effluents. Planter. 54:749-756.

Joglekar, A.V. and Karanth, N.G. 1984. Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49. Biotechnol. Bioeng. 26:1079-1084.

Joglekar, A.V., Srinivasan, M.C., Manchanda, A.C., Jogdand, V.V. and Karanth, N.G. 1983. Studies on cellulase production by a *Penicillium funiculosum* strain in an instrumented fermentor. Enzyme Microb. Technol. 5:22-24.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. and Nicklin, D.J. 1980. Cellulose hydrolysis state of the art and near term potential. Department of Chemical Engineering, University of Queensland, Australia. 22 pp.

Kaji, A., Tagava, K. and Matsubara, K. 1967. Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 31:1023-1028. อ้างโดย โศภิษฐ์ เวทยสุภรณ์. 2531. การศึกษากระบวนการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและเซลลูเลสจากเปลือกข้าวโพดในแบคทีเรียผสมใน fermentor. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Ado, Y. and Takasawa, S. 1986. Production of cellulases from alkali-treated bagass in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:454-458.

Kirkaldy, J.L.R. and Sutanto, J.B. 1976. Possible utilization of by-products from palm oil industry. Planter. 52:118-126.

Lonsane, B.K. Ghildyal, N.P. Budiatwan, S. and Ramakrishna, S.V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 7:258-265.

Lonsane, B.K. Saucedo-Castanedo, G., Raimbault, M., Roussos, S.,

Viniegra-Gonzalez, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M. 1992. Scale up strategies for solid state fermentation system. Process Biochem. 27:259-273.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Maheva, E., Djelveh, G., Larroche, C. and Gros, J.B. 1984. Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. Biotechnol. Letters 6(2):97-102.

Mandels, M. Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp. No.6:21-33.

Mandels, M. and Sternberg, D. 1976. Recent advances in cellulase technology:Review. J. Ferment. Technol. 54:267-286.

Mandels, M. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In* Cellulase and Their Applications (Gould, R.E. ed.) Adv. Chem. Ser. 95, American Chemistry Society, Washington, D.C. p. 391-398.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.

Mitchell, D.A., Doelle, H.W. and Greenfield, P.E. 1988. Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:598-602.

Moi, P.S. 1987. The potential of intergrating fish culture into

a algae system treating palm oil mill effluent. *In* International oil palm/palm oil conference progress & prospects: Conference II: Technology 29 June-1 July, 1987. Kuala Lumpur, Malaysia. 21 pp.

Moo-Young, M., Chahal, D.S. and Vlach, D. 1978. Single cell protein from various chemical pretreated wood substrate using *Chaetomium cellulolyticum*. Biotechnol. Bioeng. 22:107-118.

Murao, S., Kanamoto, J. and Arai, M. 1979. Isolation and identification of a cellulolytic enzyme producing microorganism. J. Ferment Technol. 57(3):151-156.

Neudoerffer, T.S. and Smith, R.E. 1970. An evaluation of fungal enzymes for the solubilization of wheat bran constituents. Can. J. Microbiol. 16(3) 139-146.

Ofuga, C.O. and Vkpong, E.N. 1989. Fungal fermentation of a Nigerian brewery sludge. Biological Wastes. 30:251-260.

Okiy, D.A. 1987. Chemical and biological characterization of the by-products of NIFOR palm oil mill. *In* International oil palm/palm oil conference progress & prospects: Conference II: Technology 29 June- 1 July 1987. Kuala Lumpur, Malaysia. 16 pp.

Panda, T. 1989. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *Trichoderma reesei* D 1-6 and *Aspergillus wentii* Pt 2804. Process Biochem. 104-108.

Pyc, R., Fiechter, A. and Galas, E. 1977. The production of

cellulolytic enzymes by fungal cultures. European. J. Appl. Microbiol. 4:151-158.

Raimbault, M. and Alazard D. 1980. Culture methode to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol. 9:199-209.

Rogalski, J., Szezodark, J., Dawidowicz, A., Ikczuk, Z. and Leonowise, A. 1985. Enzyme Microb. Technol. 7:395-400.

อ้างโดยโศภิษฐ์ เวทยสุภรณ์. 2531. การศึกษาขบวนการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสและเซลลูเลสจากเปลือกข้าวโพด โดยแบคทีเรียผสมใน fermentor. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า วิทยาเขตธนบุรี.

Rossi J. and Clementi A. 1985. Protein production by *Schwanniomyces castellii* on starchy substrates in liquid and solid cultivation. J. of Food Technology 20:319-330.

Shamala, T.R. and Sreekantiah, K.R. 1986. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. Enzyme Microb. Technol. 8:178-182.

Shewale, J.G. and Sadana, J.C. 1978. Cellulase and beta-glucosidase production by a *Basidiomyces* species. Can. J. Microbiol. 24:1204-1216.

Shu Chen and Wayman, M. 1991. Cellulase production induced by carbon sources derived from waste newspaper. Process Biochem. 26:93-100.

Stewart, J.C. and Parry J.C.B. 1981. Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus*. J. of Gen. Microbiol. 125:33-39.

Tang, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.W. 1987. Inexpensive, rapid procedure for bulk purification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30: 96-106.

Toussaint, P. and Bataille, P.F. 1985. The effect of pretreatment on the enzymic hydrolysis of cellulosic industrial waste. J. Chem. Tech. Biotechnol. 35B:205-215.

Wase, D.A.J., Mcmanamey, W.J., Raymahasay, S. and Vaid, A.K. 1985. Comparison between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in air-lift fermentor. Biotechnol. Bioeng. 27:1166-1172.

Wase, D.A.J., Raymahasay, S. and Wang, W.C. 1985. Production of beta-glucosidase, endo-1,4-beta-D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. Enzyme Microb. Technol. 7:225-229.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารวุ้นเอียง PDA (Potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16 x 150 มม.หลอดละ 5 มล. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี)

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. ความชื้น (A.O.A.C., 1984)

วิธีการ

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา

2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (2.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว เกลี่ยให้เนื้อกระจาย ปิดฝาและชั่งน้ำหนัก

3. นำไปอบในตู้อบโดยให้ฝาปิดไว้บางส่วนอบที่ 105 องศาเซลเซียสข้ามคืน (16 ชั่วโมง)

4. นำออกจากตู้อบ ปิดฝาและนำไปใส่ในเดสิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น(ร้อยละ)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1}$$

W_1 = น้ำหนัก(กรัม)ของตัวอย่างก่อนอบ

W_2 = น้ำหนัก(กรัม)ของตัวอย่างหลังอบ

2. น้ำหนักเซลล์แห้ง (ดัดแปลงจาก Rossi and Clementi, 1985)

วิธีการ

วิธีการเหมือนข้อ 1. แต่ใช้หลอดทดสอบแทนภาชนะอลูมิเนียม และเตรียมตัวอย่างก่อนอบดังนี้

1. ปิเปตตัวอย่าง 10 มล. ใส่หลอดทดสอบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

2. นำหลอดทดสอบไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที

3. แยกส่วนใส (เก็บไว้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และปั่นแยกเซลล์ วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2

การคำนวณ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{W \times 1000}{V}$$

W = น้ำหนักเซลล์หลังอบ (กรัม)

V = ปริมาตรตัวอย่างก่อนอบ (มล.)

3. ปริมาณโปรตีนของมวลชีวภาพ โดยวิธี **Micro-Kjeldahl** (A.O.A.C., 1984)

อุปกรณ์

1. Kjeldahl flask ขนาด 250 มล.
2. ลูกแก้วกันกระแทก
3. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล.

สารเคมี

1. Na_2SO_4
2. สารละลายอิ่มตัว $HgSO_4$
3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
4. สารละลายผสมของ $NaOH/Na_2S_2O_3$
5. กรดบอร์ริคความเข้มข้นร้อยละ 4
6. HCl ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
7. Toshiro อินดิเคเตอร์

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. สารละลายอิ่มตัว $HgSO_4$

   เติมผง red mercuric oxide 10 กรัม ในกรดซัลฟูริก (ความเข้มข้นร้อยละ 98 น้ำหนัก/น้ำหนัก) 12 มล. และน้ำกลั่น 92 มล.

2. สารละลายผสมของ $NaOH/Na_2S_2O_3$

   ชั่ง NaOH (commercial grade) 60 กรัม และ $Na_2S_2O_3$ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มล. คนให้ละลาย

3. กรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4.0

4. กรด HCl เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

5. Toshiro อินดิเคเตอร์

   ใช้เมธิลเรดเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในเอทธานอล 2 ส่วน และเมธิลีนบลูเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในเอทธานอล 1 ส่วน

วิธีการ

ชั่งกากปาล์มที่ผ่านการอบแห้งและน้ำทิ้งรวมในรูปของเหลวให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.5-1.0 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 250 มล. เติม Na_2SO_4 (anhydrous) 2 กรัม เพื่อเพิ่มจุดเดือด เติมสารละลายอิ่มตัวของ $HgSO_4$ 5 มล. เพื่อเป็นตัวเร่ง จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล. ลงไป ใส่กระเบื้องหรือลูกแก้วกันกระแทกเมื่อเดือด ทำการย่อยตัวอย่างด้วยการให้ความร้อนปานกลาง (เปิดเตาที่ระดับความร้อนที่ 4) นานประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นเพิ่มความร้อน (เปิดเตาอยู่ที่ระดับความร้อนที่ 7) จนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น ล้างคอขวดด้วยน้ำกลั่นร้อน (ค่อย ๆ เติม) และทำการย่อยต่อจนหมดควันของกรดซัลฟูริก ตั้งทิ้งให้เย็น

นำสารละลายใสมาปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่ได้มา 10 มล. ใส่ในขวดกลั่น แล้วเติมสารละลายผสมของ $NaOH/Na_2S_2O_3$ ลงไป 15 มล. กลั่นลงในสารละลายกรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 5 มล. และน้ำกลั่น 5 มล. เป็นเวลา 5-15 นาที

ไตเตรตสารละลายที่ได้ด้วย HCl เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้ Toshiro อินดิเคเตอร์ 1-2 หยดจนสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเดิม (สีม่วงปนแดง) จดปริมาตรกรดที่ใช้

การคำนวณ

$$\text{ไนโตรเจน(\%)} = \frac{\text{(titration-blank titration) x normality x 14}}{\text{gram of sample}}$$

โปรตีน(%) = (%)ไนโตรเจน x 6.25

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส ในการวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์โดยใช้ DNS reagent ของ Miller (1959)

สารเคมี

DNS reagent ประกอบด้วย (ร้อยละ)

1.	dinitrosalicylic (DNS) acid	1
2.	phenol	0.2
3.	sodium potassium tartrate (Rochelle salt)	20
4.	Na_2SO_3	0.05
5.	NaOH	1

วิธีการเตรียม DNS reagent

ละลาย NaOH ในน้ำตามปริมาณที่ต้องการ แล้วจึงเติมสารละลายอื่น ๆ ลงในสารละลาย NaOH

4.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรม CMCase

ก. เตรียม stock solution ของกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก./มล.

ข. ปิเปตสารละลายจากข้อ ก มาความเข้มข้นละ 1 มล. (blank ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทน)

ค. เติม DNS reagent ลงไป 3 มล.

ง. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วรีบทำให้เย็นโดยใช้น้ำก๊อก

จ. เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 6 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคส ดังแสดงในรูปผนวกที่ ข1

การคำนวณค่ากิจกรรม CMCase

$$\text{ยูนิต/มล. ของอาหารเหลว} = \frac{\text{มก.ของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\underset{\text{(กรัม/โมล)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส}} \times \underset{\text{(นาที)}}{\text{ระยะเวลาบ่ม}} \times \underset{\text{(มล.)}}{\text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}}$$

$$\text{ยูนิต/กรัม ของอาหารแข็ง} = \frac{\text{ยูนิต/มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$

4.2 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของไซโลสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรม xylanase

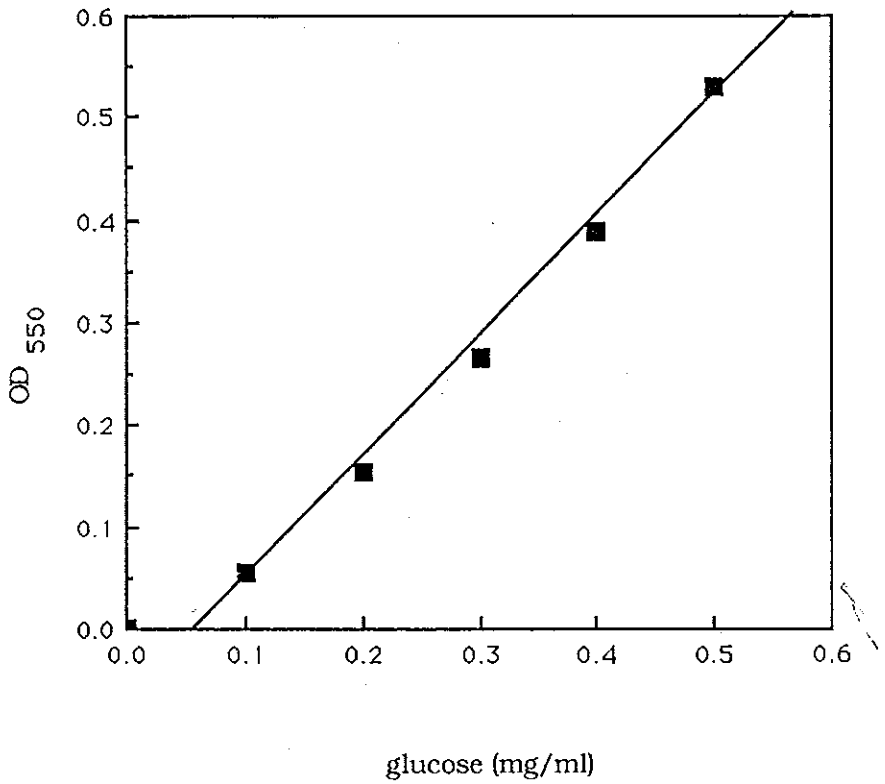
ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับในข้อ 1.1 แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนสารละลายกลูโคส นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณไซโลสดังแสดงในรูปผนวกที่ ข2

การคำนวณค่ากิจกรรม xylanase

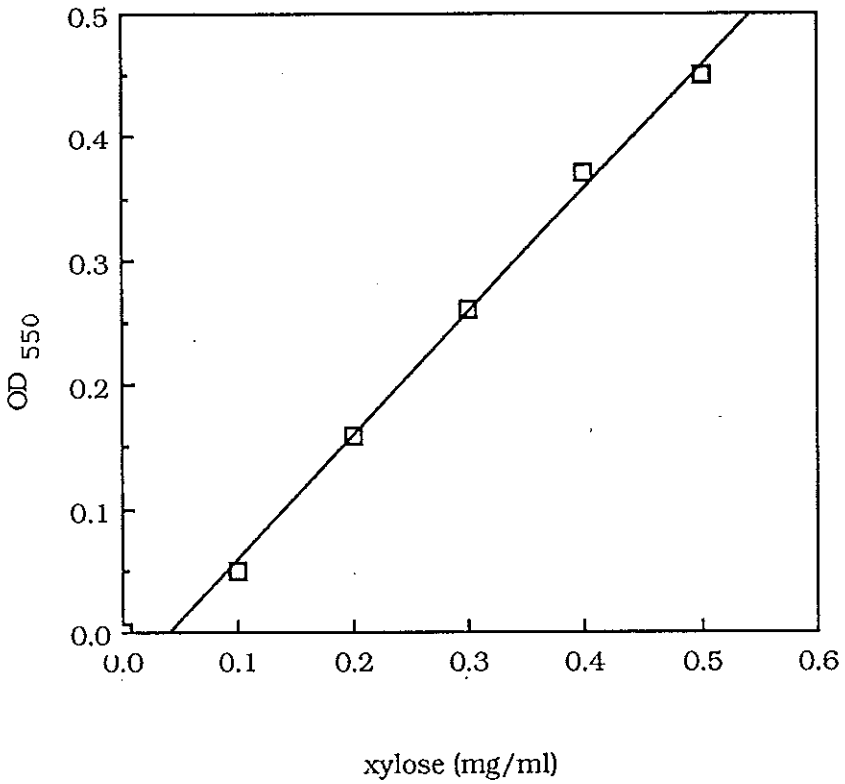
$$\text{ยูนิต/มล. ของอาหารเหลว} = \frac{\text{มก.ของกลูโคส} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกลูโคส} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มล.)

$$\text{ยูนิต/กรัม ของอาหารแข็ง} = \frac{\text{ยูนิต/มล.} \times (\text{ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์} + \text{ปริมาตรน้ำที่เหลือจากการปรับความชื้น})}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร



รูปผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ผลของการเติมกากปาล์มที่ผ่านการแปรสภาพด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATTC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก	2	3	4	6
สารอาหาร	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/มล.)[1]			
ไม่เติมกากปาล์ม	0.59[a]	0.72[a]	0.69[a]	0.68[a]
กากปาล์มบด[2]	0.58[a]	0.74[a]	0.70[a]	0.68[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH[3]	0.60[a]	0.73[a]	0.71[a]	0.69[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน[4]	0.55[a]	0.71[a]	0.68[a]	0.67[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill	0.58[a]	0.75[a]	0.76[a]	0.73[a]
สารอาหาร	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/มล.)[1]			
ไม่เติมกากปาล์ม	8.88[a]	9.87[a]	11.99[a]	11.69[a]
กากปาล์มบด	9.16[a]	10.23[a]	12.10[a]	11.89[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH	9.13[a]	10.03[a]	12.73[a]	12.21[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน	8.85[a]	9.81[a]	12.65[a]	12.04[a]
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill	9.28[a]	9.89[a]	12.95[a]	11.79[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

[2]บดกากปาล์มด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ ขนาดไม่เกิน 0.75 มม.

[3]ใช้ NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล ปริมาณกากปาล์ม:สารละลาย NaOH เท่ากับ 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร

[4]ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ผลของความเข้มข้นของกากปาล์มที่เติมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	6
ปริมาณกากปาล์ม (ร้อยละ)	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/มล.)[1]			
0	0.40^{ab}	0.48^{b}	0.71^{b}	0.68^{c}
0.5	0.38^{ab}	0.48^{b}	0.81^{ab}	0.75^{bc}
1.0	0.43^{a}	0.50^{b}	0.83^{a}	0.80^{ab}
2.5	0.38^{ab}	0.59^{a}	0.87^{a}	0.87^{ab}
5.0	0.34^{b}	0.59^{a}	0.88^{a}	0.89^{a}
ปริมาณกากปาล์ม (ร้อยละ)	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/มล.)[1]			
0	9.08^{a}	11.57^{a}	12.18^{b}	12.08^{a}
0.5	10.74^{a}	12.41^{a}	13.45^{ab}	13.39^{ab}
1.0	10.37^{a}	12.72^{a}	13.85^{a}	13.73^{ab}
2.5	10.00^{a}	12.39^{a}	13.89^{a}	14.02^{a}
5.0	7.08^{b}	11.83^{a}	14.29^{a}	14.49^{a}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	6
แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/มล.)[1]			
ชุดควบคุม[2]	0.37[a]	0.75[b]	0.82[b]	0.80[b]
NH_4NO_3	0.56[a]	1.13[a]	1.24[a]	1.18[a]
$NaNO_3$	0.46[a]	0.98[ab]	1.26[a]	1.21[a]
$(NH_4)_2SO_4$	0.48[a]	0.97[ab]	1.13[a]	1.09[ab]
polypeptone	0.41[a]	0.83[ab]	0.82[b]	0.81[b]
NH_4NO_3 + polypeptone	0.54[a]	0.92[ab]	1.17[a]	1.14[ab]
NaNO3 + polypeptone	0.54[a]	0.97[ab]	1.24[a]	1.23[a]
$(NH_4)_2SO_4$ + polypeptone	0.50[a]	0.94[ab]	1.12[a]	1.05[ab]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

[2]ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ตารางภาคผนวกที่ ค4 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	6
แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/มล.)[1]			
ชุดควบคุม[2]	4.00^{c}	5.69^{d}	7.45^{e}	7.02^{e}
NH_4NO_3	10.42^{a}	13.48^{a}	14.68^{ab}	13.51^{a}
$NaNO_3$	10.75^{a}	12.74^{ab}	14.73^{ab}	13.26^{a}
$(NH_4)_2SO_4$	6.94^{b}	10.42^{bc}	12.60^{bcd}	11.73^{abc}
polypeptone	4.72^{bc}	6.95^{d}	8.25^{e}	7.82^{de}
NH_4NO_3 + polypeptone	9.50^{a}	12.24^{abc}	13.57^{abc}	12.72^{ab}
NaNO3 + polypeptone	10.34^{a}	12.07^{abc}	11.91^{cd}	10.57^{ab}
$(NH_4)_2SO_4$ + polypeptone	6.70^{b}	9.90^{c}	10.64^{d}	9.87^{cd}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

[2]ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ตารางภาคผนวกที่ ค5 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	6
ปริมาณ NH_4NO_3 (กรัม/ลิตร)	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/มล.)[1]			
0	0.64[b]	0.76[b]	0.68[b]	0.65[b]
0.08	0.80[ab]	0.92[ab]	0.89[a]	0.79[ab]
0.15	0.82[ab]	1.01[a]	0.99[a]	0.82[ab]
0.30	0.94[a]	1.07[a]	1.04[a]	0.87[a]
0.44	0.92[a]	1.00[a]	0.93[a]	0.83[ab]
0.60	0.90[a]	1.09[a]	0.96[a]	0.86[ab]
0.74	0.93[a]	1.09[a]	0.98[a]	0.88[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค6 ผลของ NH_4NO_3 ต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่เติมกากปาล์มร้อยละ 1.0

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	6
ปริมาณ NH_4NO_3 (กรัม/ลิตร)	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/มล.)[1]			
0	5.27^{c}	7.30^{d}	8.87^{c}	8.00^{d}
0.08	5.60^{c}	7.27^{d}	10.43^{c}	9.61^{d}
0.15	7.43^{bc}	8.68^{cd}	11.28^{c}	10.68^{cd}
0.30	9.01^{b}	11.39^{bc}	14.67^{b}	13.06^{bc}
0.44	9.87^{b}	12.66^{b}	15.11^{b}	13.30^{bc}
0.60	13.40^{a}	16.11^{a}	22.77^{a}	15.55^{b}
0.74	15.12^{a}	17.52^{a}	23.03^{a}	18.81^{a}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค7 ผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	2	3	4	5	6	7	8
การให้อากาศ (ปริมาตร/ปริมาตร/นาที)	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/มล.)[1]						
0.8	0.13^{b}	0.51^{b}	0.82^{b}	1.18^{b}	1.23^{ab}	0.94^{b}	0.89^{b}
1.0	0.28^{b}	0.66^{b}	0.76^{b}	1.01^{b}	1.21^{ab}	1.04^{b}	1.01^{b}
1.2	0.35^{a}	0.98^{a}	1.21^{a}	1.29^{a}	1.34^{a}	1.32^{a}	1.28^{a}
1.4	0.43^{a}	0.50^{b}	0.74^{b}	0.87^{b}	1.02^{b}	0.87^{b}	0.91^{b}
การให้อากาศ (ปริมาตร/ปริมาตร/นาที)	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/มล.)[1]						
0.8	2.43^{c}	7.95^{b}	13.58^{ab}	16.76^{a}	17.73^{a}	15.52^{a}	15.27^{a}
1.0	3.32^{b}	7.41^{b}	13.91^{b}	15.59^{b}	17.73^{b}	16.42^{a}	15.08^{a}
1.2	4.72^{a}	12.00^{a}	14.10^{a}	17.07^{a}	17.93^{a}	17.15^{a}	16.67^{a}
1.4	5.10^{a}	5.57^{c}	8.39^{c}	9.69^{c}	10.44^{c}	9.09^{b}	9.09^{b}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค8 ผลของการให้อากาศต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งรวมจากโรงงานน้ำมันปาล์ม ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	0	1	2	3	4	5	6
การให้อากาศ (ปริมาตร/ปริมาตร/นาที)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)[1]						
0.8	13.00[a]	17.30[a]	17.90[b]	20.20[a]	18.30[a]	15.20[b]	13.70[b]
1.0	13.25[a]	17.25[a]	19.55[b]	16.35[b]	15.05[b]	14.45[b]	13.65[b]
1.2	13.30[a]	18.75[a]	23.00[a]	16.85[b]	15.30[b]	14.50[b]	13.95[b]
1.4	13.55[a]	18.40[a]	18.50[b]	18.95[a]	17.20[a]	16.80[a]	15.55[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค9 ผลของการแปรสภาพกากปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9	12	15
วิธีการแปรสภาพ	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]				
กากปาล์มบด[2]	2.16^{a}	2.86^{ab}	2.91^{b}	2.81^{a}	2.04^{a}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH[3]	1.79^{ab}	2.38^{b}	2.17^{c}	1.81^{b}	1.26^{b}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน[4]	1.65^{b}	2.26^{b}	2.18^{c}	1.88^{b}	1.56^{b}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill	2.08^{ab}	3.28^{a}	3.65^{a}	3.35^{a}	2.52^{a}
วิธีการแปรสภาพ	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]				
กากปาล์มบด[2]	14.79^{ab}	5.37^{b}	4.86^{b}	5.73^{b}	3.83^{b}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย NaOH[3]	13.47^{bc}	5.11^{b}	4.84^{b}	4.79^{b}	3.34^{b}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วยความร้อน[4]	11.94^{d}	4.82^{b}	4.29^{b}	4.73^{b}	3.74^{b}
กากปาล์มบดที่แปรสภาพด้วย ball mill	21.61^{a}	10.68^{a}	7.11^{a}	7.45^{a}	6.57^{a}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

[2]บดด้วยเครื่องบดอาหารสัตว์ ขนาดไม่เกิน 0.75 มม.

[3]ใช้ NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล ปริมาณกากปาล์ม:สารละลาย NaOH เท่ากับ 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร

[4]ใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางภาคผนวกที่ ค10 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9
ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]		
ชุดควบคุม	3.91^{cd}	4.28^{d}	4.66^{e}
0 % ยูเรีย	2.29^{d}	3.33^{e}	3.42^{e}
0.3 % ยูเรีย	3.30^{d}	4.44^{d}	5.87^{de}
0.5 % ยูเรีย	4.87^{bcd}	6.68^{d}	8.25^{cd}
1 % ยูเรีย	8.78^{a}	13.68^{ab}	15.79^{b}
2 % ยูเรีย	9.52^{a}	16.44^{a}	22.69^{a}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 5:1	6.45^{abc}	8.61^{cd}	8.73^{cd}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 4:1	7.61^{ab}	9.29^{bc}	10.13^{c}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 3:1	6.88^{abc}	9.94^{bc}	11.13^{c}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 2:1	8.06^{a}	11.22^{bc}	13.98^{b}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค11 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ xylanase ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9
ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]		
ชุดควบคุม	15.77^{e}	9.87^{f}	6.21^{f}
0 % ยูเรีย	14.05^{e}	9.00^{f}	6.00^{f}
0.3 % ยูเรีย	24.16^{e}	15.75^{ef}	7.82^{f}
0.5 % ยูเรีย	28.42^{e}	20.30^{ef}	13.24^{ef}
1 % ยูเรีย	83.20^{b}	82.57^{bc}	78.52^{b}
2 % ยูเรีย	183.76^{a}	178.21^{a}	165.11^{a}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 5:1	60.12^{cd}	33.67^{e}	28.13^{de}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 4:1	59.29^{cd}	53.29^{d}	40.48^{cd}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 3:1	65.01^{c}	55.02^{d}	55.45^{c}
กากปาล์ม:รำข้าวสาลี 2:1	97.64^{b}	75.94^{c}	87.08^{b}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค12 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9	12	15
ความชื้นเริ่มต้น(ร้อยละ)	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]				
40	8.02[b]	14.69[b]	19.34[a]	19.12[b]	18.79[b]
50	12.74[a]	17.91[a]	24.16[a]	26.81[a]	23.20[a]
60	11.48[a]	17.68[a]	23.34[a]	24.56[a]	22.32[ab]
ความชื้นเริ่มต้น(ร้อยละ)	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]				
40	149.07[b]	146.88[b]	127.02[b]	129.64[b]	107.56[a]
50	194.53[a]	169.75[b]	137.96[b]	146.66[b]	128.69[ab]
60	218.35[a]	207.21[a]	187.05[a]	163.68[a]	150.10[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค13 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9	12	15
อุณหภูมิ	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]				
อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส)	11.49[b]	13.59[a]	17.05[a]	19.47[a]	17.61[a]
35 °ซ	13.65[a]	16.11[a]	19.89[a]	21.60[a]	19.60[a]
40 °ซ	8.62[c]	14.55[a]	19.72[a]	19.10[a]	16.66[a]
อุณหภูมิ	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]				
อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส)	262.21[a]	254.91[a]	217.11[a]	195.29[a]	188.78[a]
35 °ซ	250.92[a]	216.07[b]	203.15[a]	171.34[b]	162.69[b]
40 °ซ	147.98[c]	198.63[b]	142.43[b]	139.48[c]	135.64[c]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค14 ผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9	12	15
ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์/กรัมกากปาล์ม)	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]				
10^6	13.65[b]	17.68[a]	19.72[b]	20.87[a]	18.01[a]
10^7	13.58[a]	17.17[a]	21.02[ab]	21.43[a]	19.81[a]
10^8	14.72[a]	19.86[a]	23.78[a]	22.07[a]	19.60[a]
ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์/กรัมกากปาล์ม)	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]				
10^6	290.07[a]	233.79[a]	215.88[b]	191.16[b]	189.48[b]
10^7	292.11[a]	246.83[a]	251.41[a]	242.27[a]	235.77[a]
10^8	318.88[a]	249.39[a]	256.97[a]	232.93[a]	219.99[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค15 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอนไซม์ ของ *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในกากปาล์ม

ระยะเวลาการหมัก	3	6	9	12	15
พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรม CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]				
3.5	8.56^{b}	12.85^{c}	19.33^{a}	17.67^{b}	15.81^{b}
4.0	13.68^{a}	15.51^{bc}	22.22^{a}	21.61^{ab}	21.16^{ab}
4.5	14.94^{a}	18.07^{ab}	23.07^{a}	22.14^{ab}	22.52^{a}
5.0	16.44^{a}	21.26^{a}	23.82^{a}	23.74^{a}	21.90^{a}
5.5	14.98^{a}	18.98^{ab}	20.95^{a}	22.29^{ab}	20.76^{ab}
ระยะเวลาการหมัก	2	3	4	5	6
พีเอชเริ่มต้น	กิจกรรม xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]				
3.5	97.14^{c}	200.18^{b}	231.48^{a}	188.51^{b}	186.47^{a}
4.0	178.42^{b}	254.27^{a}	235.09^{a}	212.06^{ab}	198.24^{a}
4.5	238.28^{a}	282.99^{a}	229.30^{a}	235.19^{a}	195.98^{a}
5.0	210.93^{ab}	271.82^{a}	238.50^{a}	225.58^{a}	215.06^{a}
5.5	188.47^{b}	259.07^{a}	195.98^{a}	215.06^{ab}	201.39^{a}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)