

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยเชื้อราที่แยกได้

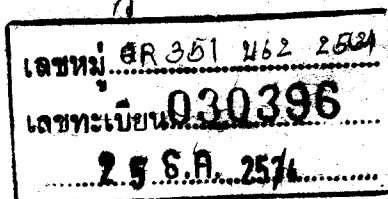
Production of Cellulases Enzyme in Palm Oil

Mill Effluent by Isolated Fungi



เบญจวรรณ ชิตมานี

Benchawan Chitmanee



วิทยานิพนธ์ วิชาสาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2534

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งของโรงงานน้ำมันปาล์ม โดย เชื้อราที่แยกได้
ผู้เขียน	นางสาวเบญจวรรณ ชิตมณี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2534

## บทคัดย่อ

แยกเชื้อราที่ออกสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานน้ำมันปาล์มได้  
จำนวน 34 สายพันธุ์ (เชื้อ F1-F34) การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้ที่มีกิจกรรมของเซลลูเลส  
สูง โดยใช้วิธีเชิงคุณภาพและปริมาณ เทียบกับเชื้อราที่เป็นตัวเปรียบเทียบกับจำนวน 9 สายพันธุ์  
พบว่าเชื้อ F11 สามารถย่อยกระดาษกรอง ให้อัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อเส้น  
ผ่าศูนย์กลางโคโลนีสูง (เท่ากับ 1.61) ในอาหารแห้งที่มี carboxymethyl cellulose  
(CMC) และให้ค่ากิจกรรมของเซลลูเลสสูงในอาหารเหลวที่มี CMC ปริมาณโปรตีนของเซลล์  
เท่ากับร้อยละ 20.6

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ carboxymethyl cellulase (CMCase)  
ของเชื้อ F11 ในฟลาสก์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อที่เติม Tween  
80 ร้อยละ 0.10,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ร้อยละ 0.02 โปรตีนไฮสเปปโตน ร้อยละ 0.025 และ CMC  
ร้อยละ 0.10 พีเอชเริ่มต้น 5.5 ส่วนการเติมยีสต์สกัดและเกลือน้ำยามีผลต่อการผลิตเอนไซม์  
การเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็ว 200 และ 300 รอบต่อนาที ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน  
ส่วนการเลี้ยงเชื้อ F11 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง สภาวะที่เหมาะสม คือ ให้  
อากาศ 1.5 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ความคุมพีเอชระหว่างการหมัก เท่ากับ 5.5 และอัตรา  
การกวน 200 รอบต่อนาที กิจกรรม CMCase สูงสุดหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันมีค่า  
เท่ากับ 0.117 หนึ่งต่อมิล.

การศึกษาคุณสมบัติของ CMCase จากเชื้อ F11 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ  
 กิจกรรม CMCase คือ 50 °ซ มีเอชที่เหมาะสม 5.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CMC  
 เท่ากับร้อยละ 1.0 กิจกรรม CMCase ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อมีเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาทีที่  
 อุณหภูมิ 60 °ซ หรือมากกว่า 60 นาที ที่อุณหภูมิ 40 ° และ 50 °ซ กลูโคสที่ความเข้มข้น 400  
 มก.ต่อล. (2.22 มิลลิโมลาร์) มีผลให้กิจกรรม CMCase ลดลงครึ่งหนึ่ง ในขณะที่เซลดิโอ  
 โอสที่ความเข้มข้น 400 มก.ต่อล. (1.17 มิลลิโมลาร์) ไม่มีผลต่อกิจกรรม CMCase  
 $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  และ  $Cu^{2+}$  มีผลยับยั้งกิจกรรม CMCase และ  $Fe^{2+}$  (ที่ความเข้มข้น 0.003  
 โมลาร์) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสิ้นเชิง

Thesis title      Production of Cellulases Enzyme in Palm Oil Mill  
                            Effluent by Isolated Fungi

Author              Miss Benchawan Chitmanee

Major program     Biotechnology

Academic year     1991

#### abstract

Thirty-four fungal strains (F1-F34) were isolated from samples taken from a palm oil mill. Screening for high cellulolytic isolates was carried out using both qualitative and quantitative methods against 9 reference fungal strains. One isolate (F11) was found disintegrating filter paper, gave a high ratio of clearing zone to colony (1.61) on carboxymethyl cellulose (CMC) agar and high cellulase activities in CMC medium. Its cell protein content was 20.6%.

The optimal medium for carboxymethyl cellulase (CMCase) production by F11 in shaker flasks contained 0.10% Tween 80, 0.02%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.025% proteose peptone and 0.10% CMC dissolved in steriliser condensate. The initial pH of the medium was 5.5. The addition of yeast extract and mineral salts had no effect on enzyme production. There were no differences in enzyme production when cultivating the culture on shaker speed of 200 and 300 rpm. Optimal conditions in the 2 L fermenter containing the same medium at room temperature were : aeration rate at 1.5 vvm, pH control at pH 5.5

and agitation speed of 200 rpm. The highest CMCase activity after 3 days incubation was 0.117 unit/ml.

Studies on characteristics of CMCase using the supernatant from F11 revealed that the optimal temperature for CMCase activity was 50 °C, optimal pH 5.5 and optimal CMC concentration 1.0%. The CMCase activity was reduced by 50% when incubating the enzyme for 30 min at 60 °C or in excess of 60 min at 40 °C and 50 °C. The presence of 400 mg/L (2.22 mM) glucose inhibited CMCase activity by 50% whereas no effect occurred in the presence of 400 mg/L (1.17 mM) cellobiose.  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  inhibited CMCase activity, with  $Fe^{2+}$  (0.003 M) causing total inhibition.