การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

Production and Applications of Xylanase and Cellulase from Palm Cake and Sludge by *Aspergillus niger* ATCC 6275

จารุวรรณ มณีศรี

Jaruwan Maneesri

เลขหมู่ QP609.C3Z J61 2538
เลขทะเบียน.....
7 เม.ย. 2538

Order Key...3111.....
BIB Key...19652.....

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2538

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

ผู้เขียน นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและการประยุกต์ใช้ไซลาเนสและเซลลูเลสจากกากปาล์มและกากสลัดจ์โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

ผู้เขียน นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่า กากปาล์มและกากสลัดจ์ มีความชื้น ร้อยละ 4.57-7.75 โปรตีน ร้อยละ 7.62-13.31 (ไนโตรเจน ร้อยละ 1.22-2.13) น้ำมัน ร้อยละ 9.87-16.12 เยื่อใย ร้อยละ 15.95-16.75 เถ้า ร้อยละ 6.48-12.51 (ต่อน้ำหนักแห้ง) และมีแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง ในปริมาณเล็กน้อย

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 สูตรที่มีกากปาล์มหรือกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 (ประกอบด้วยกากปาล์ม กลูโคส ร้อยละ 0.2 และยูเรีย ร้อยละ 2.0) ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนส (xylanase) สูงสุด (576 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม หลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน) และการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 (ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์มในสูตร 2) ให้ค่า carboxymethylcellulase (CMCase)สูงสุด (14.42 ยูนิต/กรัมกากสลัดจ์ หลังการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน) ส่วนการใช้น้ำทิ้งรวมปรับความชื้นของสับสเตรท พบว่า จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้น้ำกลั่น นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่มีการให้อากาศชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100) และควบคุมอุณหภูมิ (32±2 องศาเซลเซียส) พบว่า เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ต่ำกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ที่มีความชื้นสัมพันธ์ร้อยละ 85

ทดลองผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยงเชื้อ *A. niger* (ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2) ในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ ได้แก่ ฟลาสก์ (ขนาด 250 และ 1,000 มล.) ถุงพลาสติก (ขนาด 6x8

นิ้ว และ 20x30 นิ้ว) กระด้งและคอลัมน์ พบว่า แอคทิวิตี้สูงสุดของไซลาเนส (739 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม หลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน) ได้จากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาดใหญ่ รองลงมาได้จากการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาดเล็ก (710 ยูนิต/กรัม) ถุงพลาสติกขนาดเล็ก (705 ยูนิต/กรัม) ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ (642 ยูนิต/กรัม) คอลัมน์ (562 ยูนิต/กรัม) และกระด้ง (226 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ ส่วนค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของ CMCase (20 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม หลังการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน) ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกขนาดเล็ก รองลงมาคือการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาดใหญ่ (17.6 ยูนิต/กรัม) ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ (17.4 ยูนิต/กรัม) ฟลาสก์ขนาดเล็ก (16.1 ยูนิต/กรัม) คอลัมน์ (11.2 ยูนิต/กรัม) และกระด้ง (7.9 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ

จากการประยุกต์ใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน เพื่อแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ไซลาเนสทางการค้า (Meicellase และ Sumyzyme) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์จาก *A. niger* และเอนไซม์ Meicellase สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้ง ปรากฏเป็นลักษณะตะกอนเบาลอยอยู่ด้านบน ในขณะที่การใช้ Sumyzyme สารแขวนลอยจะปรากฏทั้งลักษณะตะกอนเบา และตะกอนหนัก ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์จะให้ลักษณะปรากฏเป็นตะกอนหนัก เมื่อกวาดตะกอนเบาออกจะสามารถกำจัดของแข็งออกจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 71.4, 70.6 และ 69.8 แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 99.0, 99.7 และ 96.0 ค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 76.0, 69.4 และ 76.5 เมื่อใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275, Meicellase และ Sumyzyme ตามลำดับ

ศึกษาการใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดย่อยสลายให้ได้น้ำตาลจากเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ (จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์ม) และไซแลนทางการค้า (oat spelt xylan) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ต่ำกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไซแลนทางการค้าเป็นสับสเตรท โดยเมื่อใช้เอนไซม์จาก *A. niger*, Meicellase และ Sumyzyme ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์มจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดเท่ากับ 199, 242 และ 113 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 8 ของการบ่ม และเมื่อย่อยเฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์มได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุด

เท่ากับ 185, 222 และ 108 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ หลังการบ่ม 8 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ไซแลนทางการค้าจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 645, 575 และ 510 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 8 และสูงสุดเท่ากับ 776, 704 และ 718 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ หลังการบ่ม 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ในการทำให้น้ำผลไม้ใสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์จาก *A. niger* และ Meicellase สามารถทำให้น้ำสับปะรดใสขึ้น แม้จะมีตะกอนเล็กๆปรากฏอยู่ ส่วนการใช้ Sumyzyme ไม่สามารถทำให้น้ำสับปะรดใสขึ้น

Thesis Title	Production and Applications of Xylanase and Cellulase from Palm Cake and Sludge by *Aspergillus niger* ATCC 6275
Author	Miss Jaruwan Maneesri
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1994

Abstract

The chemical compositions of palm cake and sludge were analysed. The palm cake and sludge had 4.57-7.25 % moisture content, 7.62-13.31 % protein (1.22-2.13 % nitrogen), 9.87-16.12 % oil, 15.95-16.75 % crude fibre, 6.48-12.51 % ash and trace amount of minerals such as phosphorus, potassium, sodium, calcium, magnesium, iron and copper.

Factors affecting the production of enzymes from *Aspergillus niger* ATCC 6275 under solid substrate cultivation using eight different formulae were studied. The maximum activities of xylanase (576 U/g palm cake after 3 days' cultivation) and carboxymethylcellulase (CMCase) (14.42 U/g sludge after 9 days' cultivation) were obtained from the cultivation in formula no. 2 (containing palm cake, 0.2 % glucose and 2.0 % urea) and formula no. 4 (replaced palm cake in formula 2 by sludge), respectively. Using mixed effluent to adjust moisture of the substrate gave lower enzyme activities than those obtained when distilled water was used. Cultivation the fungi in a moisture saturated incubator (100 % relative humidity) and controlled temperature (32 ± 2 C^{o}), both enzyme activities were lower than those achieved from the cultivation at room temperature (30 ± 2 C^{o}), with 85 % relative humidity.

Enzyme production by cultivating *A. niger* (using formula no. 2) in different reactors such as flasks (250 and 1,000 ml), polypropylene bags (6x8 and 20x30 inches), bamboo tray and column was investigated. The maximum xylanase activity (739 U/g palm cake after 3 days' incubation) was obtained from the cultivation in big flask, followed by those in small flask (710 U/g), small bag (705 U/g), large bag (642 U/g), column (562 U/g) and tray (226 U/g), respectively. The maximum CMCase activity (20 U/g palm cake after 9 days' cutivation) was obtained from the cultivation in small bag, followed by those in big flask (17.6 U/g), big bag (17.4 U/g), small flask (16.1 U/g), column (11.2 U/g) and tray (7.9 U/g), respectively.

Application of partially purified enzyme from *A. niger* ATCC 6275 to separate the suspended solids and oil from decanter effluent was compared to those of commercial xylanases (Meicellase and Sumyzyme). Enzyme from *A. niger* and Meicellase were able to separate suspended solids which floating as bulking solids. In the case of Sumyzyme, the suspened solids appeared as the bulking solids and precipitates. Only precipitates occurred in the control (no enzyme added). Skimming off the bulking solids resulted in 71.4, 70.6 and 69.8 % solids removal, 99.0 %, 99.7 % and 61.2 % oil removal, 76.0, 69.4 and 76.5 % COD removal from the effluent using the enzyme from *A. niger* ATCC 6275, Meicellase and Sumyzyme, respectively.

The threes enzymes were applied to saccharify the extracted hemicelluloses (from sterilizer condensate and palm cake) and commercial xylan (oat spelt xylan). Saccharification of the extracted hemicelluloses gave lower amount of reducing sugars than those obtained when commercial xylan was the substrate. When the enzyme from *A. niger* ATCC 6275, Meicellase and Sumyzyme were used to saccharify the hemicellulose extracted from palm cake, the maximum reducing sugars were 199, 242 and 113 mg/g substrate after 8 h incubation, respectively. Using the hemicellulose extracted from sterilizer condensate gave reducing sugars of 185, 222 and 108 mg/g substrate,

respectively, after 8 h incubation. The reducing sugars from commercial xylan saccharification were 645, 575 and 510 mg/g substrate after 8 h incubation and maximum at 776, 704 and 718 mg/g substrate, respectively, after 24 h incubation.

The three enzymes were tested on juice clarification at 40 ^{o}C, It was found that the enzyme from *A. niger* and Meicellase could clarify the pineapple juice with small particles remained. The Sumyzyme, however, had no effect.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ อาจารย์อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด และโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวัตถุดิบ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และพี่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรตลอดจนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วยที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จารุวรรณ มณีศรี

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ....(3)

Abstract....(6)

กิตติกรรมประกาศ....(9)

สารบาญ....(10)

รายการตาราง....(13)

รายการรูป....(15)

บทที่

1 บทนำ....1

บทนำต้นเรื่อง....1

ตรวจเอกสาร....2

1 กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม....2

2 องค์ประกอบและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานน้ำมันปาล์ม....10

3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง....16

4 เอนไซม์เซลลูเลส....27

5 เอนไซม์ไซลาเนส....28

6 การแปรสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสและการประยุกต์ใช้เอนไซม์....31

วัตถุประสงค์....39

2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ....40

วัสดุ....40

อุปกรณ์....41

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

วิธีการ....45

1 วิเคราะห์องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวม จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม....45

2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275....45

3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275....49

3 ผลและวิจารณ์....52

1 วิเคราะห์องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวม จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม....52

2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซมจากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275....55

3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275....73

4 สรุป....85

ข้อเสนอแนะ....87

เอกสารอ้างอิง....88

ภาคผนวก....100

ก อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์....100

ข วิธีการวิเคราะห์....101

1 ความชื้น....101

2 ปริมาณไขมัน....102

3 ปริมาณสารเยื่อใย....103

4 ปริมาณเถ้า....105

5 ของแข็งทั้งหมด....106

6 ปริมาณน้ำมันและกรีส (Oil & Grease)....107

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

7 ซีโอดี....108
8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์....110
9 ปริมาณโปรตีน....114
ค ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ....115
ประวัติผู้เขียน....119

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานปาล์มน้ำมันจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้ง	8
2	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้ง(POME) จากโรงงานน้ำมันปาล์ม	9
3	องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	11
4	องค์ประกอบของกากปาล์มน้ำมัน หรือกากปาล์ม	13
5	องค์ประกอบของกากน้ำมันปาล์ม หรือสลัดจ์อบแห้ง	14
6	เปรียบเทียบองค์ประกอบของแร่ธาตุของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม	15
7	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและหรือการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหารแข็ง	17
8	ชนิดและลักษณะของอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	19
9	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ	34
10	ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการใช้เอนไซม์จาก *Trichoderma* sp. E58 ย่อยเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากเนื้อไม้ด้วยวิธีต่างๆ	36
11	องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	53
12	ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนสและ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง	75
13	ลักษณะการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	76

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14 การใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 แยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส) 77

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค1 ผลของการใช้กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ 115

ค2 ผลการบ่มในตู้บ่มที่มีความชื้นและควบคุมอุณหภูมิ (32±2 องศาเซลเซียส) ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4 116

ค3 ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 117

ค4 ผลของการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มเปรียบเทียบกับเอนไซม์และไซแลนทางการค้า ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 118

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	กระบวนการผลิตแบบอบไอน้ำ ที่มีการใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน	3
2	กระบวนการผลิตแบบหีบน้ำมันผสม	5
3	อัตราแปลงของน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มจากผลปาล์มร่วง และปาล์มทั้งทะลาย	7
4	ลักษณะของเครื่องมือในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งบรรจุในฟลาสก์	23
5	ลักษณะของเครื่องมือในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งบรรจุในถาด	24
6	ลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์	29
7	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเศษเหลือพวกเซลลูโลส	32
8	การประยุกต์ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส	33
9	ลักษณะของคอลัมน์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในกากปาล์ม	42
10	ตู้บ่มที่มีการให้อากาศชื้น โดยให้อากาศที่มีอัตราไหล 20 ลิตร/นาที ผ่านเข้าสู่อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่ตู้บ่ม ให้ตู้บ่มมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 และมีอุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส	47
11	การเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในคอลัมน์และให้อากาศในอัตราการไหล 0.5 ลิตร/นาที	48
12	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)	56
13	การผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergilus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)	57
14	การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 1 และ 2 (B) สูตร 3และ 4 ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)	58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15 การผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 1 และ 2 (B) สูตร 3 และ 4 ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส) 59

16 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 5 และ 6 (B) สูตร 7 และ 8 ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส) 61

17 การผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 5 และ 6 (B) สูตร 7 และ 8 ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส) 62

18 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติกบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ 64

19 ผลของการบ่มเชื้อภายใต้สภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์ม (สูตร 2) และกากสลัดจ์ (สูตร 4) เป็นแหล่งคาร์บอน 66

20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติกบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4 บ่มภายใต้อากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ 100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง 67

21 ผลของการบ่มเชื้อภายใต้สภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง ต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์ม (สูตร 2) และกากสลัดจ์ (สูตร 4) เป็นแหล่งคาร์บอน 68

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง	71
23	ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง	72
24	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง ในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ	74
25	ลักษณะการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้า(Meicellase และSumyzyme) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชั่วโมง	78
26	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มเปรียบเทียบกับไซแลนทางการค้า ด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 (A) Meicellase (B) และ Sumyzyme (C) ที่เวลาต่างๆ	81

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มได้ขยายตัวอย่างรวดเร็ว มีการนำน้ำมันปาล์มไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง เพราะสามารถนำไปใช้ทดแทนน้ำมันพืชอื่นๆ ได้ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดฝ้าย และอื่นๆ ตลอดจนใช้แทนไขสัตว์ได้เป็นอย่างดี และมีราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชอื่นๆ ซึ่งในปี พ.ศ. 2530 จังหวัดที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุด ได้แก่ กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และ ตรัง ตามลำดับ เมื่อรวมเนื้อที่เพาะปลูกทั้ง 5 จังหวัด พบว่า มีจำนวนรวมกันถึง ร้อยละ 95.46 ของเนื้อที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2531 ผลผลิตปาล์มสดทั้งทะลายเท่ากับ 881,590 ตัน (เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, 2532) และเพิ่มขึ้นเป็น 1,098,000, 1,243,860, 1,249,500, 1,352,000 และ 1,547,780 ตัน ในช่วงปี พ.ศ. 2532-2536 ตามลำดับ (สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ, 2534, 2536, 2537ก และ 2537ข)

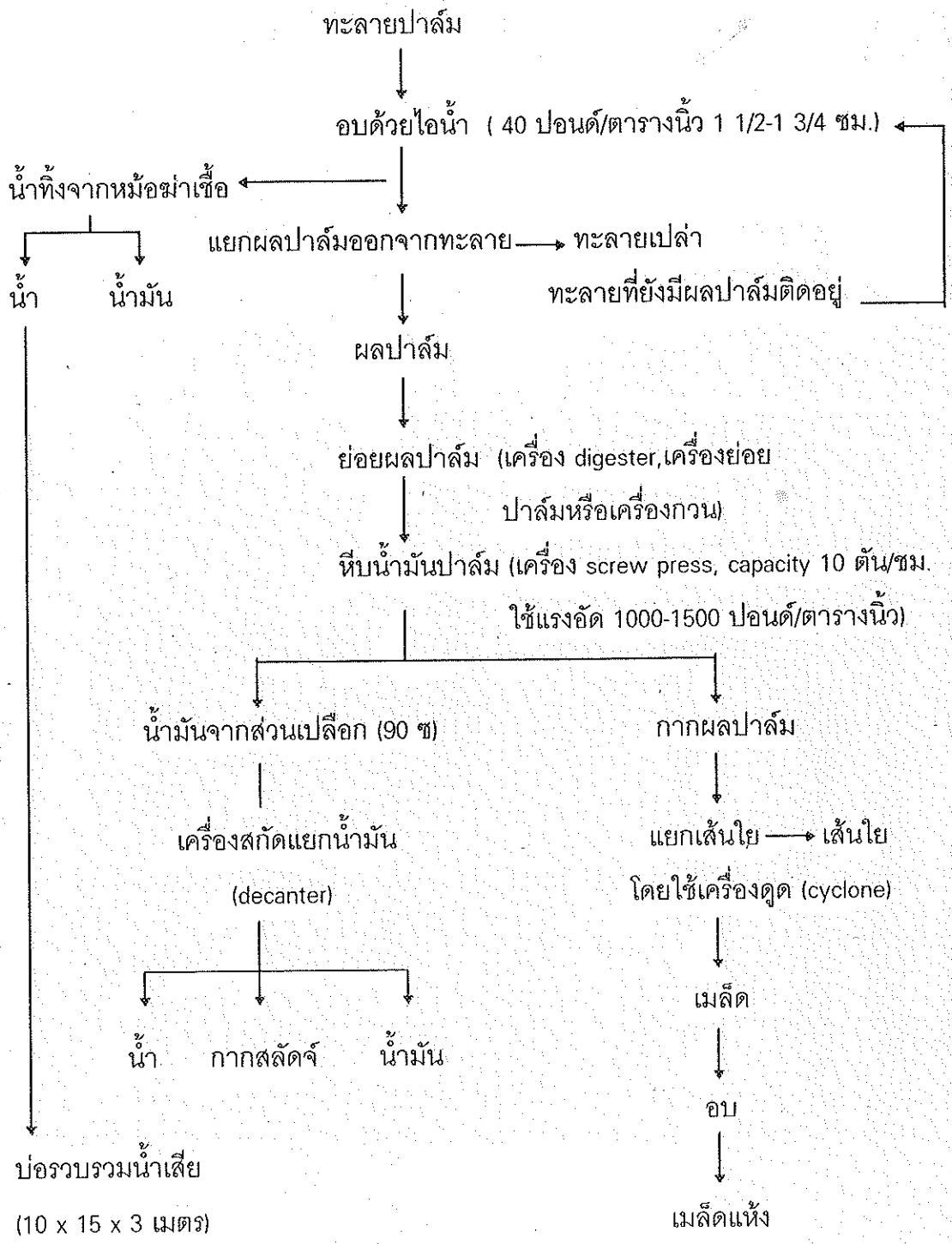
ผลปาล์มน้ำมันเป็นพวกที่มีเมล็ดในแข็ง (drupes) ชั้นนอกสุดเรียกว่า exocarp มีสีสรรแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และการสุกของผล ชั้นถัดไปคือ ใยหรือเปลือก (mesocarp) มีความหนามากกว่าชั้น exocarp เป็นชั้นที่มีความสำคัญเพราะน้ำมันปาล์มอยู่ในชั้นนี้เป็นส่วนใหญ่ เรียกน้ำมันที่สกัดจากส่วนนี้ว่า น้ำมันปาล์ม (palm oil) ชั้นถัดไปคือ กะลา (endocarp หรือ shell) ชั้นนี้มีลักษณะแข็ง ภายในมีเนื้อปาล์มที่เรียกว่า endosperm หรือ kernel มีสีขาว และแข็ง ซึ่งมีน้ำมันอยู่เช่นเดียวกัน เรียกน้ำมันส่วนที่สกัดออกจากชั้นนี้ว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523) จากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มทำให้เกิดวัสดุเศษเหลือ คือ ส่วนที่เป็นของแข็ง ได้แก่ ทะลายเปล่า (empty bunches) เปลือกผลปาล์ม (pericarp fibre) กะลาผลปาล์ม (palm shell) กากเนื้อปาล์ม (palm kernel

cake) สลัดจ์ (sludge) และ ส่วนที่เป็นของเหลว คือ น้ำทิ้ง (effluent) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) ซึ่งอารี กังแฮ (2536) ได้ใช้กากปาล์มเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็ง พบว่า การใช้กากปาล์มบด เติมยูเรียร้อยละ 2.0 ความชื้นเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 50-60 และปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม เลี้ยงในช่วงอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ถึง 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานต่อเนื่องจากงานวิจัยดังกล่าว เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 บนอาหารแข็งโดยใช้กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นสารอาหารและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้

ตรวจเอกสาร

1. กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม อุตสาหกรรมสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทย มีกระบวนการผลิต 3 แบบ (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2531)

1.1 กระบวนการผลิตแบบอบไอน้ำ ซึ่งเป็นแบบมาตรฐาน ใช้ในโรงงานขนาดใหญ่และขนาดกลาง ประมาณ 14 โรงงาน กระบวนการผลิตเริ่มจากการนำทะลายปาล์มสดมาอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิระหว่าง 120 - 130 องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 40 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 45 นาที มีน้ำทิ้งจากหม้อฆ่าเชื้อเกิดขึ้น (อาจเรียกว่า น้ำนึ่งปาล์ม) ทะลายปาล์มที่อบแล้วจะถูกนำไปป้อนเข้าเครื่องแยกผลปาล์ม ผลปาล์มที่ได้จะถูกนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยผลปาล์ม ซึ่งภายในมีใบพัดกวนผลปาล์มให้เส้นใยฉีกย่อยออกจากเมล็ดและเซลล์น้ำมันแตกตัวออกมา จากนั้นป้อนเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัด (screw press) น้ำมันที่ได้จะส่งไปเข้าเครื่อง decanter (รูปที่ 1) ซึ่งจะแยกน้ำมันออกจากน้ำและเศษเส้นใยและสิ่งเจือปน (กากสลัดจ์) บางโรงงานใช้เครื่องแยกเหวี่ยง (centrifuge) แทนการใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน น้ำมันที่ได้จะนำเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำมันให้ใสสะอาดขึ้น จากนั้นนำไปไล่ความชื้นด้วยเครื่องดูดสุญญากาศให้ได้มาตรฐาน แล้วนำไปเก็บในถังเก็บน้ำมันขนาดใหญ่ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) เพื่อเตรียมส่งจำหน่ายโรงงานกลั่นน้ำมัน



รูปที่ 1 กระบวนการผลิตแบบอบไอน้ำ ที่มีการใช้เครื่องสกัดแยกน้ำมัน

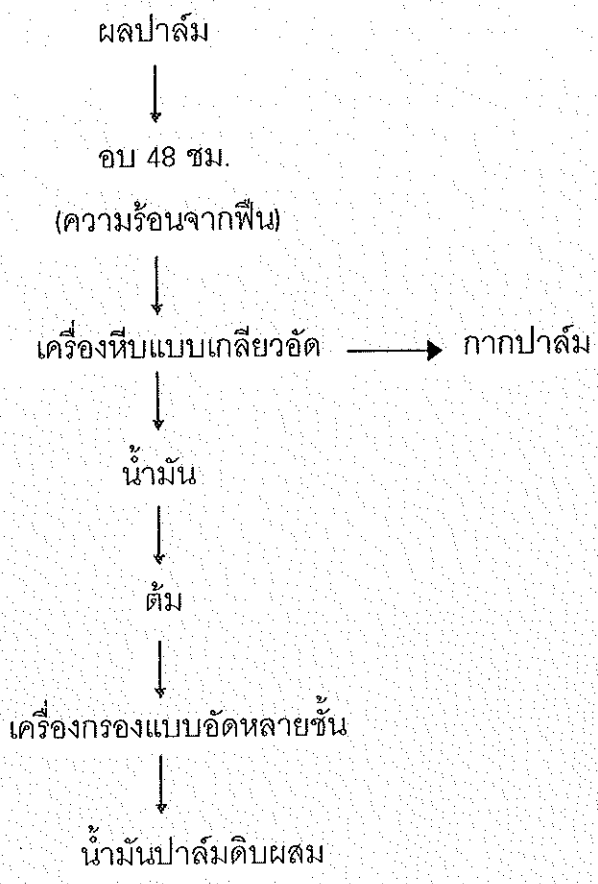
ที่มา : พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

บริสุทธิ์ต่อไป

ส่วนกากผลปาล์มที่ออกจากเครื่องหีบแบบเกลียวอัดจะถูกนำมาแยกเอาเส้นใยออกจากเมล็ดด้วยเครื่องแยก ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แรงลมเป่าให้เส้นใยลอยไปตามท่อ ไปเข้าเตาของหม้อกำเนิดไอน้ำเพื่อเป็นเชื้อเพลิงต่อไป ส่วนเมล็ดที่แยกเส้นใยแล้วจะถูกนำมาอบให้แห้ง จากนั้นนำไปคัดขนาดและกระเทาะเมล็ดด้วยเครื่องกระเทาะซึ่งใช้แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง เมล็ดที่กระเทาะแล้วจะนำไปแยกเศษกะลาออกจากเมล็ดในด้วยเครื่องแยกเศษกะลาซึ่งอาจใช้แบบไฮโดรไซโคลนคือ แยกด้วยน้ำหรือแรงลม จากนั้นเมล็ดในก็จะถูกนำมาอบให้แห้งมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 7 และบรรจุกระสอบจำหน่ายต่อไป

1.2 กระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม กระบวนการผลิตแบบนี้พัฒนามาจากโรงงานน้ำมันมะพร้าว ใช้ในโรงงานขนาดเล็ก จำนวนประมาณ 20 กว่าโรงงาน ส่วนใหญ่ตั้งอยู่ในจังหวัดชุมพรและสงขลา กระบวนการผลิตเป็นแบบไม่ใช้น้ำ (รูปที่ 2) ผลปาล์มจะถูกนำมาอบโดยได้ความร้อนจากฟืนเป็น เวลา 48 ชั่วโมง แล้วผลปาล์มจะถูกส่งไปยังเครื่องหีบแบบเกลียวอัด ได้วัสดุเศษเหลือคือ กากปาล์มเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีการซื้อขายเพื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ส่วนน้ำมันที่ได้ถูกทำให้ร้อน และผ่านเข้าเครื่องกรองแบบอัดหลายชั้น (filter press) เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก น้ำมันปาล์มดิบที่ได้เป็นน้ำมันผสมทั้งจากส่วนเปลือกและเมล็ดในซึ่งคุณภาพจะด้อยกว่าน้ำมันจากส่วนเปลือกเพียงอย่างเดียว (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533)

1.3 กระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม เป็นเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นในประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2522 ปัจจุบันมีโรงงานประเภทนี้ 2 โรงงาน กระบวนการผลิตสามารถใช้วัตถุดิบทั้งในรูปทะลายปาล์มสดและผลปาล์มร่วง วัตถุดิบพวกทะลายสดจะนำมาเข้าเครื่องอบทะลายเช่นเดียวกับประเภทแรก จากนั้นนำไปแยกผลปาล์มออกจากทะลายและถูกนำไปทอดในเกลียวลำเลียงด้วยน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-20 นาที โดยให้ความร้อนด้วยไอน้ำโดยรอบรางลำเลียงนี้ วัตถุดิบจำพวกผลปาล์มร่วงจะนำมาทอดตรงจุดนี้เช่นกัน จากนั้นผลปาล์มที่สุกแล้วจะถูกนำไปเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดคู่เช่นเดียวโรงงานประเภทแรก น้ำมันที่หีบได้นำไปไล่ความชื้นในถังสุญญากาศที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นกรองผ่านเครื่อง



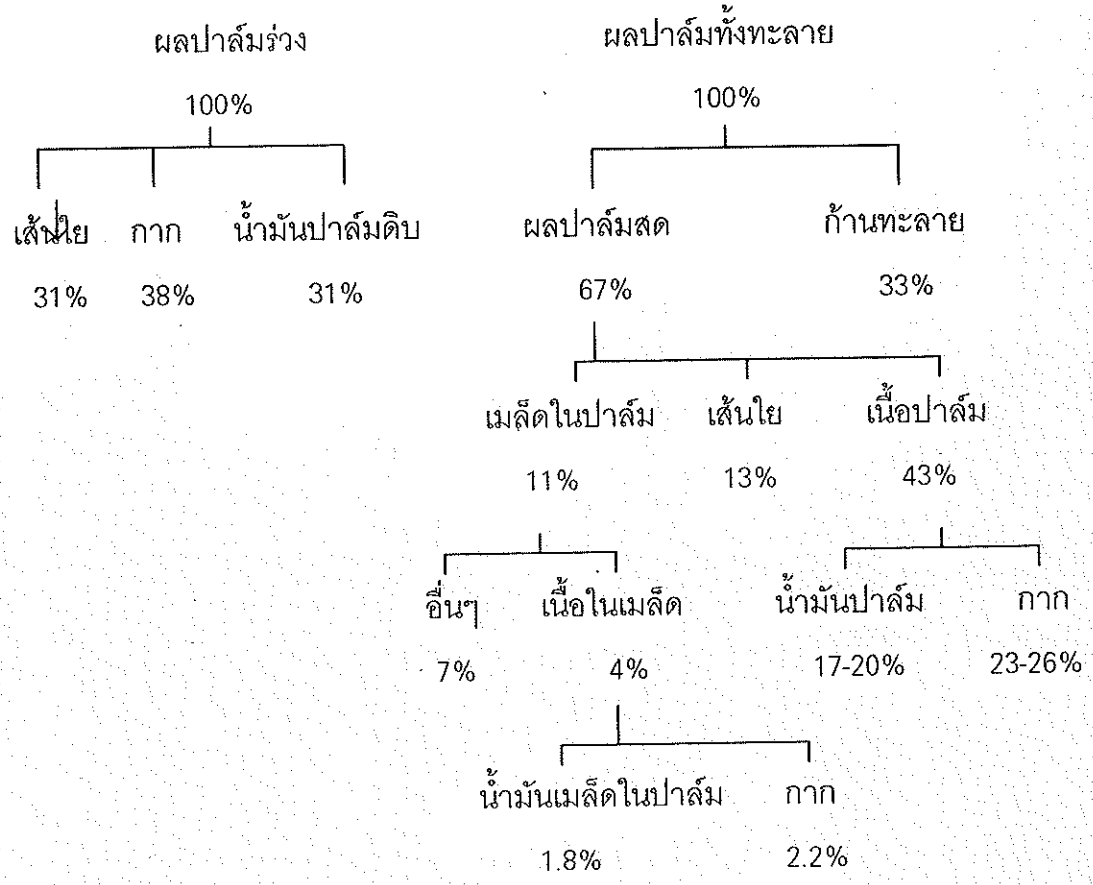
รูปที่ 2 กระบวนการผลิตแบบหีบน้ำมันผสม

ที่มา : ดัดแปลงจาก พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ (2533)

กรองแบบอัดหลายชั้น เพื่อแยกสิ่งสกปรกก่อนบรรจุลงถังเก็บ ส่วนกากผลปาล์มจะนำไปอบแห้งและหีบรวมกันเป็นน้ำมันผสมและได้กากปาล์มเป็นอาหารสัตว์

การผลิตน้ำมันจากผลปาล์มจะต้องนำผลปาล์มสดเข้าโรงงานเพื่อสกัดน้ำมันภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยว มิฉะนั้นจะเกิดกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งอาจสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานคือ (ร้อยละ 5) ทำให้น้ำมันมีคุณภาพต่ำไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท

การสกัดน้ำมันปาล์มจากผลปาล์มร่วงจะมีวัสดุเศษเหลือได้แก่ เส้นใยและกากปาล์ม ส่วนการสกัดจากปาล์มทั้งทะลายจะมีวัสดุเศษเหลือได้แก่ ทะลายเปล่า เส้นใยและกากปาล์ม โดยมีอัตราแปลงของน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม ดังรูปที่ 3 (เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, 2532) นอกจากนี้ยังมีน้ำทิ้งเกิดขึ้นซึ่งมีสีน้ำตาลคล้ำ มีค่าพีเอช 4.05-4.62 มีปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยมีค่าบีโอดี (BOD) และซีโอดี (COD) อยู่ในช่วง 54,750-60,000 มก/ล และ 80,523-115,934 มก/ล ตามลำดับ มีค่าไนโตรเจน (ในรูปแอมโมเนีย) 27-61 มก/ล (ตารางที่ 1) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) และประกอบด้วยอินทรีย์สารและแร่ธาตุที่สำคัญ ดังตารางที่ 2 (Okiy, 1987 อ้างโดย อารี กังแฮ, 2536)



รูปที่ 3 อัตราแปลงของน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันปาล์มจากผลปาล์มร่วงและปาล์มทั้งทะลาย

ที่มา : เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง (2532)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำทิ้งของโรงงานปาล์มน้ำมันจากบ่อรวบรวมน้ำทิ้ง

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 CaCo3)	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	49,458-88,508	37,800-71,600
Volatile solids (VS)	81,872	52,655	42,063	76,004	42,063-81,872	31,200-56,700
Suspended solids (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 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้ง (POME) จากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ต่อน้ำหนักแห้ง)

component	%
ether extract	31.60
protein (N x 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 อ้างโดย อารี กังแฮ, 2536)

2. องค์ประกอบและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานน้ำมันปาล์ม

กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มจะมีวัสดุเศษเหลือเกิดขึ้นหลายชนิด และมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังนี้

2.1 กากเยื่อใยปาล์ม (Palm press fibre) เป็นส่วนเปลือกนอกของผลปาล์ม มีองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 3 กากเยื่อใยปาล์มสามารถนำไปใช้เป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ โดยใช้ในระดับร้อยละ 10-20 ถ้าใช้ในระดับที่สูง (ร้อยละ 40-60) จะทำให้การกิน และการย่อยได้ของสัตว์ลดลง ซึ่งสามารถปรับปรุงคุณภาพของกากเยื่อใยโดยการใช้ด่างแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์หรือยูเรียประมาณร้อยละ 5-6 ของอาหารและหมักนาน 2-3 สัปดาห์ นอกจากนี้การเสริมอาหารกากเยื่อใยด้วยอาหารโปรตีน เช่น ปลาป่น กากถั่วและกากน้ำตาล จะทำให้ปริมาณการกินของกากเยื่อใยปาล์มของสัตว์เพิ่มขึ้น (พานิช ทินนิมิตร, 2535)

นอกจากการใช้เป็นอาหารสัตว์ กากเยื่อใยปาล์มยังใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับหม้อกำเนิดไอน้ำ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) หรือเป็นสับสเตรทสำหรับการย่อยสลายให้ได้น้ำตาล (Prasertsan and Oi, 1992)

2.2 กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel cake) เป็นกากที่ได้จากการสกัดน้ำมันจากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ซึ่งไม่มีเปลือกหรือกะลาปนอยู่จึงเปรียบเสมือนแป้งหรือรำข้าว มีองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 3 กากเนื้อเมล็ดในปาล์มเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยเฉพาะโคนม เพราะอาหารนี้จะช่วยทำให้ไขมันในนมเพิ่มขึ้น สำหรับไก่กระทงในระยะแรก (0-4 สัปดาห์) สามารถใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มได้ถึงร้อยละ 20 และใช้ได้สูงถึงร้อยละ 30-40 ในช่วง 4-8 สัปดาห์ สำหรับไก่ไข่สามารถใช้กากเมล็ดในปาล์มได้ในอัตราที่สูงถึงร้อยละ 30 (พานิช ทินนิมิตร, 2535)

2.3 กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (Oil palm seed meal) เป็นกากที่ได้จากการสกัดน้ำมันของเมล็ดปาล์ม ซึ่งเมล็ดปาล์มน้ำมันมีน้ำหนักประมาณร้อยละ 6 ของผลปาล์มสด และมีน้ำมันอยู่สูงถึงร้อยละ 51 โดยน้ำหนัก (ศุภโชค วิริยโกศล และ พิจิตร พิศสุวรรณ, 2526) ทำให้กากเมล็ดปาล์มน้ำมันมีทั้งกะลาและเนื้อเมล็ดรวมกัน และมีองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 3 กากเมล็ดปาล์มน้ำมันสามารถใช้เป็นอาหารของไก่กระทงได้ดี โดยผสมลงใน

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบ	กากเยื่อใยปาล์ม (ร้อยละ)	กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (ร้อยละ)	กากเมล็ดปาล์มน้ำมัน (ร้อยละ)
วัตถุแห้ง	86	90	92
โปรตีน	4	19	12
เยื่อใยหยาบ	36	16	11
ไขมัน	21	2	29
เถ้า	9	4	3
ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก	30	59	44
แคลเซี่ยม	0.31	0.34	0.19
ฟอสฟอรัส	0.13	0.69	0.43
แมกนีเซียม	0.52	0.16	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก พานิช ทินนิมิตร (2535)

อาหารได้ถึงร้อยละ 20 และ 40 สำหรับไก่เล็ก (ระยะ 0-4 สัปดาห์) และไก่ใหญ่ (ระยะ 4-8 สัปดาห์) ตามลำดับ (พานิช ทินนิมิตร, 2535)

2.4 กากปาล์มน้ำมัน (oil palm meal) หรือกากปาล์ม (palm cake) เป็นกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันของปาล์มทั้งผล ซึ่งกากจะประกอบด้วยเปลือกนอก (husk) กะลา และเนื้อในของเมล็ด สามารถใช้กากปาล์มน้ำมันในอัตราร้อยละ 50 ผสมลงในอาหารซึ่งมี รำ กากถั่วเหลือง กระดูกป่น และเกลือ สำหรับเลี้ยงโครุ่น (พานิช ทินนิมิตร, 2535) หรือเลี้ยงสัตว์กระเพาะรวมเช่น วัว ควาย ได้ในระดับร้อยละ 10-30 (Muthurajah and Devendra, 1975 อ้างโดย ทวีศักดิ์ นิยมบัณฑิต และคณะ, 2529) มีองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 4 (พานิช ทินนิมิตร, 2535 ; สมพงษ์ เทศประสิทธิ์, 2526 ; จรัญ จันท-ลักขณา, 2526 ; ยุทธนา ศิริวัธนกูล, 2530 ; Okiy, 1987 อ้างโดย อารี กังแฮ, 2536)

นอกจากการใช้เป็นอาหารสัตว์ กากปาล์มน้ำมันยังใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 เพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ CMCase พบว่าการใช้กากปาล์มบด และเติมยูเรียร้อยละ 2.0 ความชื้นเริ่มต้นในช่วงร้อยละ 50-60 พีเอชเริ่มต้นในช่วง 4.5-5.0 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์/กรัมกากปาล์ม ให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสและ CMCase เท่ากับ 282.9 และ 23.8 ยูนิต/กรัมกากปาล์ม ตามลำดับ (อารี กังแฮ, 2536)

2.5 กากน้ำมันปาล์ม (palm oil sludge) หรือสลัดจ์ (sludge) เป็นวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลวข้นที่เหลือหลังจากแยกเอาน้ำมันออกด้วยเครื่องแยกเหวี่ยง หรือเครื่อง decanter มีน้ำอยู่มาก แต่สามารถระเหยน้ำจนมีวัตถุแห้งประมาณร้อยละ 90 ใช้ผสมในอาหารเลี้ยงโคนมและสุกรได้ (พานิช ทินนิมิตร, 2535) มีองค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 5 (พานิช ทินนิมิตร, 2535 ; Rajagopalan and Webb, 1975 ; Webb, *et al.*, 1977) นอกจากนี้กากน้ำมันปาล์มยังประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญหลายชนิด ดังแสดงตารางที่ 6 (Hwang, *et al.*, 1978)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของกากปาล์มน้ำมัน หรือกากปาล์ม (ร้อยละ)

องค์ประกอบ	พานิช ทินนิมิตร (2535)	สมพงษ์ เทศประสิทธิ์ (2526)	จรัญ จันทลักขณา (2526)	ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล (2530)	Okiy (1987)
วัตถุแห้ง	87	-	90.0	90.2	-
โปรตีน	8	7.10	10.6	12.45	17.6
ไขมัน	8	6.90	17.0	14.55	14.3
เยื่อใย	35	30.90	18.3	14.97	15.7
เถ้า	5	4.55	12.1	4.82	3.0
ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก	44	38.50	-	53.22	49.4
ความชื้น	-	9.70	-	-	-
แคลเซี่ยม	-	0.25	0.75	-	-
ฟอสฟอรัส	-	0.32	-	-	-
ฟอสเฟต	-	-	0.50	-	-

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของกากน้ำมันปาล์ม หรือสลัดจ์อบแห้ง (ร้อยละ)

องค์ประกอบ	พานิช ทินนิมิตร (2535)	Rajagopalan and Webb (1975)	Webb *et al.* (1977)
วัตถุแห้ง	90	-	89.60
โปรตีน	10	10.20	17.60
ไขมัน	21	1.91	-
เยื่อใย	12	11.40	11.40
เถ้า	11	11.30	11.30
ไนโตรเจนฟรีเอ็กซ์แทรก	46	-	40.10
แคลเซี่ยม	0.28	0.75	0.50
ฟอสฟอรัส	0.26	0.30	0.75
ความชื้น	-	3.40	-
ทองแดง (พีพีเอ็ม)	-	25	-
แมงกานีส (พีพีเอ็ม)	-	80	-
สังกะสี (พีพีเอ็ม)	-	60	-
แมกนีเซียม (พีพีเอ็ม)	-	100	-

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบองค์ประกอบของแร่ธาตุของวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)

Mineral	Muthurajah (1976)* sludge	Rajagopalan & Webb (1975)* sludge	Hwang, *et al.* (1978) sludge
N	2.08	1.66	1.73
P	0.42	0.31	0.31
K	3.96	-	3.10
Na	-	-	0.06
Mg	1.04	0.01	1.88
Ca	0.42	0.78	0.21
Cr	-	-	-
Mn	-	0.008	-
Fe	-	-	0.10
Co	-	-	-
Cu	-	0.003	0.05
Zn	-	0.006	0.025
Cd	-	-	-

* มีการนำมาคิดคำนวณใหม่

ที่มา : Hwang, *et al.* (1978)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-substrate fermentation) เป็นการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อราบนวัสดุแข็ง ปัจจัยที่สำคัญที่ควบคุมการเจริญและเมตาบอลิซึมของเชื้อราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งคือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี (Moo-Young, *et al.*, 1983 ; Pandey, 1992)

3.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factors)

ปัจจัยทางกายภาพเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ควบคุมกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งให้ผลผลิตสูง ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่ ความชื้นเริ่มต้นของอาหาร ความร้อนที่เกิดจากการหมัก การไหลเวียนของอากาศ อุณหภูมิ และขนาดของวัสดุหมัก ความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญที่สุด โดยเป็นปัจจัยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ กระบวนการเมตาบอลิซึม การไหลเวียนของอากาศพร้อมๆกับการเปลี่ยนแปลงความชื้นของวัสดุหมัก รวมถึงการผลิตผลิตภัณฑ์ (Nishio, *et al.*, 1981 ; Moo-Young, *et al.*, 1983 ; Glenn and Rogers, 1988) การควบคุมอุณหภูมิและความชื้นให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการหมักทำได้ยาก เนื่องจากมีการสะสมความร้อนซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการหมักและการเจริญของเชื้อสับสเตรทที่มีความชื้นสูงจะทำให้ความพรุนของวัสดุหมักลดลง ส่งผลให้การระบายอากาศน้อยลง ถ้าสับสเตรทมีความชื้นต่ำการเจริญของเชื้อราจะลดลง (Kim, *et al.*, 1982 ; Pandy, 1992) แต่จะเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (Narahara, *et al.*, 1981) ความชื้นจะทำให้วัสดุหมักพองตัวและเชื้อราสามารถชอนไชไปได้ การผลิตเอนไซม์จะสูงสุดเมื่อความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสมตามความต้องการของเชื้อและคงที่ตลอดการหมัก จึงต้องเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมความชื้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ การควบคุมความชื้นทำให้การผลิตเอนไซม์ดีขึ้น แต่ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน (Kim, *et al.*, 1985) ดังตารางที่ 7

นอกจากปัจจัยต่างๆดังกล่าวข้างต้น ชนิดของถังหมักหรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ถังหมักที่ใช้ใน

ตารางที่ 7 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและหรือการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่เจริญบนอาหารแข็ง

จุลินทรีย์	สับสเตรท	ความชื้น	อุณหภูมิ	พีเอช	ปริมาณสปอร์เริ่มต้น	เอกสารอ้างอิง
Trichoderma reesei QM 9414	รำข้าวสาลี	55-65	-	-	-	Wijeyaratne, *et al*., 1979
Aspergillus niger	กากมันสำปะหลัง	50-55	35	-	$2x10^7$	Raimbault and Alazard, 1980
Taralomyces byssochlamydoides YH-50	รำข้าวสาลี	50	50	-	-	Yoshioka, *et* al., 1981
Aspergillus oryzae	โคจิ	35	30	-	-	Narahara, *et al*., 1981
Taralomyces sp.	รำข้าวสาลี	60-70	50	-	-	Nishio and Nagai, 1981
Aspergillus sp.	ฟางข้าว : รำข้าว = 1:1	50	40	-	-	Kinoshita, *et al*., 1983
Penicillium roqueforti	เมล็ดข้าวสาลี	0.48 กรัม/กรัม น้ำหนักสับสเตรท	23.5	-	-	Maheva, *et al*., 1984
Humicola lanuginosa	รำข้าวสาลี	65	45	-	-	Kitpreechavanich, *et al*., 1984
Aspergillus fumigatus	รำข้าวสาลี	54	40	-	-	
Trichoderma reesei QM 9414	รำข้าวสาลี	47	45	-	-	Kim, *et al*., 1985
Sporotrichum cellulophilum	รำข้าวสาลี	49	45	-	-	
Aspergillus fumigatus (Fresenius)	ฟางข้าว	70	40	5.0-5.5	10^5-10^7	น้อย เกษมสุขสกุล, 2529
Aspergillus niger ATCC 6275	กากปาล์ม	50-60	30	4.5-5.0	10^8	อารี กังแฮ, 2536

การหมักแบบอาหารแข็งแสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างในการพิจารณาออกแบบหรือ นำมาใช้เช่น ราคาไม่แพง ทนทานไม่เกิดการกัดกร่อนได้ง่าย สุ่มตัวอย่างได้ง่าย และมีความสะดวกในการให้อากาศหรือกวน โดยทั่วไปในระดับห้องปฏิบัติการจะทำการหมักในฟลาสก์ บีกเกอร์ ขวด (Roux bottle) ถาด และถุง (Pandy, 1991) เชื้อราเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศเพียงพอ การเลี้ยงเชื้อราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งที่ไม่มีการให้อากาศหรือการกวนจึงมักทำให้สับสเตรทบางที่สุด เช่น การใช้ถาดหรือกระด้งเป็นภาชนะเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม โดยจะเกลี่ยสับสเตรทเพื่อให้ความร้อนที่เกิดขึ้นถ่ายเทได้ แต่ควบคุมการปนเปื้อนได้ยาก ถาดที่ใช้มักทำด้วยไม้ โลหะ (อลูมิเนียมหรือเหล็ก) และพลาสติก ได้มีการใช้ถาดในการทำโคจิ (koji) การผลิตซีอิ๊วในประเทศญี่ปุ่น จีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และการทำเทมเป้ ซึ่งเป็นอาหารหมักในประเทศอินโดนีเซีย การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วหรือฟลาสก์ ซึ่งควบคุมการปนเปื้อนได้ดีแต่จะเสียพื้นที่ด้านบนเหนือสับสเตรทไปโดยเปล่าประโยชน์

การเลี้ยงเชื้อราในถุงพลาสติก ได้มีการใช้เพื่อพัฒนาการผลิตผงสปอร์เชื้อราโคจิ เต้าเจี้ยว และซีอิ๊ว เมื่อประมาณ พ.ศ. 2522 ซึ่งในขณะนั้นการหมักโคจิ เต้าเจี้ยว และซีอิ๊ว ในประเทศไทยยังคงอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ติดอยู่ตามกระด้งที่ใช้เป็นภาชนะทำให้มีการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นๆได้ง่าย ถุงพลาสติกที่ใช้เพาะเลี้ยงจะต้องเป็นชนิดทนร้อน (polypropylene) ชนิดเดียวกับที่บรรจุอาหารร้อนทั่วไป ขนาดของถุงขึ้นอยู่กับปริมาณสปอร์ที่จะผลิตและวัตถุดิบที่ใช้ เพื่อให้เหมาะสมและสะดวกต่อการทำงาน การจะประกอบให้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะเพาะเลี้ยงเชื้อราได้จะต้องสวมปลายด้านเปิดด้วยปลอกวงแหวน ซึ่งเมื่อตลบปากถุงออกโดยรอบจะทำให้มีลักษณะคล้ายปากขวดหรือฟลาสก์ และสามารถอุดจุกสำลีหรือผ้าได้ การเพิ่มขนาดถุงและปลอกวงแหวนให้ใหญ่ขึ้นอย่างได้สัดส่วนจะใช้วัสดุอื่นทำปลอกเช่น อลูมิเนียม ท่อสังกะสี เหล็กไร้สนิม หรือกระดาษแข็ง ในการบ่มเชื้อจะวางถุงในแนวนอนและดึงถุงให้พองออกเพื่อให้เชื้อราในถุงได้รับอากาศมากที่สุด และสามารถทำให้รักษาระดับความชื้นได้ดี (นภา โล่ห์ทอง, 2535) Tripathi และ Yadav (1992) เลี้ยงเชื้อ *Pleurotus ostreatus* เพื่อเป็นอาหารสัตว์โดยเลี้ยงเชื้อบนฟางข้าวสาลีที่หั่นเป็นชิ้นๆ (40 กรัม) พีเอชเริ่มต้น 5.5 ความชื้นร้อยละ 55 บรรจุในถุง polypropylene บ่มที่

ตารางที่ 8 ชนิดและลักษณะของอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

Type and Capacity	Process	Microorganism	Reference
Wood tray	Koji fermentation	*A. oryzae*	Church, 1923
Rotating drum (55 gal)	Composting of garbage	-	Schulze, 1962
Rotating drum (55 gal)	Koji fermentation	*A. oryzae*	Arima, 1964
Rotating drum	Enzyme production	*A. oryzae*	Underkofler, *et al.*, 1939
Fernbach flask (28 litres)	Aflatoxins production Fungal Spores Enzyme production	*A. oryzae*	Hesseltine, *et al.*, 1966, 1968
Horizontal vessel 4 - chambered(26 litres)	Ochratoxin production	*A. ochraceus*	Hrubant, *et al.*, 1976
Horizontal drum 3 - chambered	Continuous,using feedlot wastes and corn	-	Lindenfelser & Ciegler, 1975
Cement mixer (70 litres)	Corn fermentation	-	Hesseltine, 1977
Cement mixer	Straw fermention	*Trichoderma* *Candida*	Han, *et al.*, 1976
Bread - making blender (10 kg)	Protien enrichment of starchy materials	*A. niger*	Raimbault, *et al.*, 1977 Sonex, 1978

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Type and capacity	Process	Microorganism	References
Horizontal vessel with paddle (20 litres)	Koji fermentation	*A. oryzae*	Aidoo, 1979
Valmic bags (polypropylene porous films)	Mycotoxins	*A. flavus*	Cuero, *et al.*, 1985
Fixed - bed differential reactor	Spore production	*P. roqueforti*	Desfarges, *et al.*,1987
Stainless steel box kiln (1 tonne)	Protein enrichment	*T. viride*	Durand & Chereau, 1988
Aluminium trays	Enzyme production	*A. niger*	Pandey, 1990
Packed bed column	Enzyme production	*A. niger*	Pandey, 1990
Packed bed column	Heat - transfer simulation	*A. niger*	Castana, *et al.*, 1990
Tubular	Ethanol, Feed protein	*Saccharomyces*	Gibbon, *et al.*, 1984
Pits	Feed protein	*Coprinus fimetarius*	Kumar & Singh, 1990

Order Key....3111....
BIB Key....69652....

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Type and capacity	Process	Microorganism	References
Pot fermenter (6 litres)	Feed protein	*Chaetomium cellulolyticum*	Abdullah, *et al.*, 1985
Hollow shaft horizontal	Fungal protein	*T. reesei* and *Endomycopsis fibuliger*	Laukevics, *et al.*, 1984

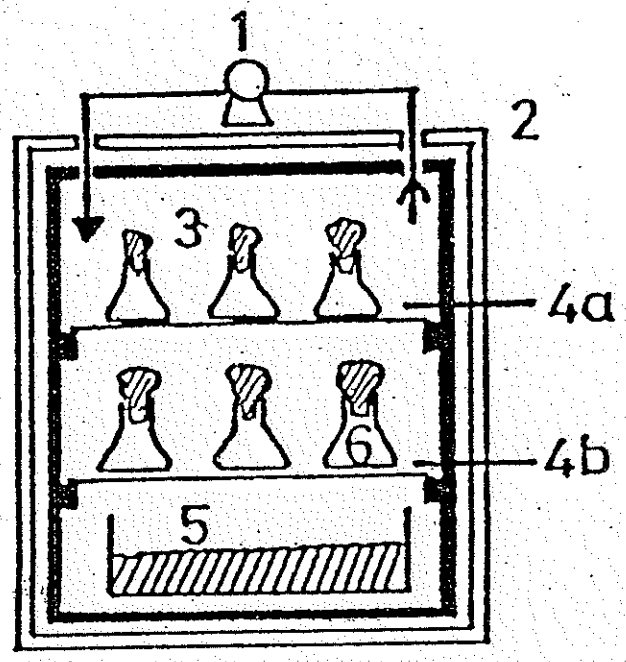
gal = UK gallons

ที่มา : Pandey (1991)

อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เชื้อเริ่มต้นที่ใช้จะเลี้ยงบนเมล็ดพืช ช่วงกลางของการหมักจะเติมยูเรีย (แหล่งไนโตรเจน) ร้อยละ 1 (ฆ่าเชื้อ) หรือร้อยละ 2 (ไม่ฆ่าเชื้อ), superphosphate (แหล่งฟอสฟอรัสกับซัลเฟอร์) ร้อยละ 0.3 พบว่า สามารถเพิ่มการย่อยได้ของสัตว์ร้อยละ 10.4 เนื่องจากส่วนลิกนินถูกย่อยสลายได้ร้อยละ 2.7 ต่อมาได้ขยายขนาดของการหมักเป็น 4 และ 50 กิโลกรัม แต่ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (bioconversion) จะลดลง เพราะสับสเตรทไม่สามารถคลุกเข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน หรือการแลกเปลี่ยนอากาศและความร้อนไม่เพียงพอเมื่อมีปริมาณสับสเตรทเพิ่มขึ้น ในปี ค.ศ .1985 ได้มีการทดลองใช้ถุงพลาสติกทนร้อนที่มีรูพรุน (microporous valmic film) ขนาดของรูพรุนจะเล็กกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งจะป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอกได้ ในขณะเดียวกันอากาศจะซึมผ่านเข้าออกทางรูพรุนเหล่านี้ นอกจากนี้สามารถบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อได้เต็มถุงและปิดปากถุงได้โดยไม่ต้องมีสำลีกรองอากาศ แต่ถุงชนิดนี้จะไม่สามารถรักษาระดับความชื้นได้ไอน้ำที่เกิดจากการหายใจของเชื้อราหรือน้ำที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงระเหยออกไปได้รวดเร็วมาก ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อในถุงชนิดนี้จึงต้องบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ได้ (Cuero, *et al.* , 1985) เช่น ตู้บ่มที่ให้อากาศชื้นโดยด้านล่างของตู้บ่มจะมีอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (รูปที่ 4) และตู้บ่มที่ให้อากาศที่มีความชื้นซึ่งความชื้นได้จากน้ำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นอากาศที่มีความชื้นจะถูกทำให้เย็นลงโดยผ่านคอยล์ (coil) และคอนเดนเซอร์ (condenser) ให้มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผ่านเข้าสู่ตู้บ่มทางท่อโดยจะเข้าทางด้านล่างสู่ด้านบน อัตราการให้อากาศ 4-6 ลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 5

คอลัมน์เป็นอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อที่ทำจากแก้วหรือพลาสติก มีฝาที่ปลายทั้งสองมีการควบคุมอุณหภูมิด้วยการหมุนเวียนของน้ำในระหว่างการหมัก (Pandey, 1991) และเชื้อสปอร์เริ่มต้นจะต้องคลุกกับสับสเตรทจนเข้ากันดี ตัวอย่างของคอลัมน์ที่ใช้ในการหมัก ได้แก่

glass incubator ความยาว 330 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร ส่วนบนจะบรรจุสับสเตรท 20 กรัม ส่วนล่างจะบรรจุน้ำและควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และให้อากาศที่อิ่มตัวด้วยน้ำเข้าไปในอัตรา 4-6 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าไมซีเลียมของเชื้อ *A. niger* เจริญรวมกับกากมันสำปะหลังโดยไม่สร้างสปอร์ (Raimbault



รูปที่ 4 ลักษณะของเครื่องมือในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งบรรจุในฟลาสก์

1 ปั๊มอากาศ (15 ลิตร/นาที)

2 ตู้บ่ม

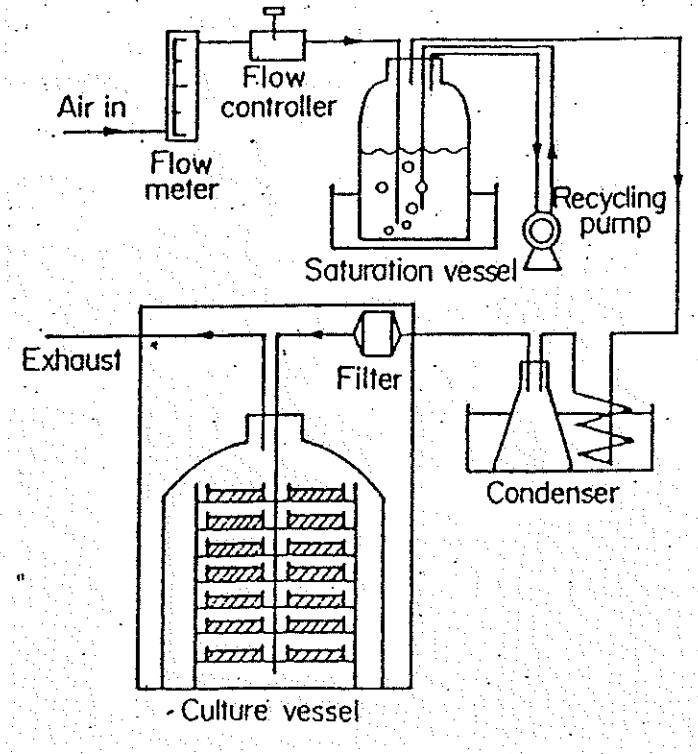
3 ช่องว่างภายในตู้ (60x80x60 ซม.)

4 เทอร์โมมิเตอร์

5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

6 ฟลาสก์ ขนาด 200 มิลลิลิตร

ที่มา : Nishio และ Nagai (1981)



รูปที่ 5 ลักษณะของเครื่องมือในการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง บรรจุในถาด

ที่มา : Kim, *et al.*, (1985)

and Alazard, 1980)

fixed bed reactor ลักษณะรูปหกเหลี่ยม เส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 45 มิลลิเมตร มีการให้อากาศที่อิ่มตัวด้วยน้ำในอัตรา 4.42 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อชั่วโมง และปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์โดยการผ่านไปยังสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ใช้ศึกษาผลของอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศและปริมาณความชื้นต่อการสร้างสปอร์ของ *Penicillium roqueforti* บนเมล็ดข้าวสาลี (Maheva, *et al.*, 1984)

3.2 ปัจจัยทางเคมี (Chemical factors) หรือปัจจัยสารอาหาร (Nutrient factors)

องค์ประกอบของอาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา วัสดุหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมักเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรซึ่งมีโครงสร้างเป็นพวกโพลีแซคคาไรด์ และลิกนิน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (Pandey, 1992)

ชนิดของวัสดุหมักเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการสร้างเอนไซม์ วิเชียร กิจปรีชาวนิช และคณะ (2535) พบว่า ฟางข้าวเป็นวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F และให้ผลดีกว่าการใช้ชานอ้อย ซังข้าวโพด และรำข้าวสาลี การเติม NH_4NO_3 (0.025-0.2 กรัมต่อฟางข้าว 5 กรัม) มีผลให้การผลิต β-xylanase, β-xylosidase และ filter paper activity (FPase) เพิ่มขึ้น โดย xylanase เพิ่มมากที่สุด จาก 51.2 เป็น 505 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก ส่วน β-xylosidase และ FPase นั้น เพิ่มจาก 1.03 และ 10.6 เป็น 2.46 และ 20.5 ยูนิต/กรัมวัสดุหมัก ตามลำดับ แต่เมื่อเติม NH_4NO_3 เป็น 0.3 กรัมต่อฟางข้าว 5 กรัม มีผลให้ปริมาณเอนไซม์ทั้งสามลดลงอย่างมาก

น้อย เกษมสุขสกุล (2529) พบว่า ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) เมื่อเปรียบเทียบกับผักตบชวา, เปลือกมันสำปะหลัง, แกลบ และขี้เลื่อย โดยมี $(NH_4)_2SO_4$ เข้มข้นร้อยละ 5.0 (โดยน้ำหนัก) เป็นแหล่งไนโตรเจน และ KH_2PO_4 เข้มข้นร้อยละ 1.0 (โดยน้ำหนัก) ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์และเป็นแหล่งของโพแทสเซียมและฟอสฟอรัส

Kinoshita, *et al.* (1983) พบว่า อัตราส่วนรำข้าวต่อฟางข้าว เท่ากับ 4 : 6, ขี้เลื่อยต่อรำข้าวเท่ากับ 1 : 1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ

Aspergillus sp. ขี้เลื่อยที่มีความละเอียด (ขนาดเล็กกว่า 200 mesh) จะเป็นวัสดุหมักที่ดีกว่าขี้เลื่อยหยาบ (ขนาดใหญ่กว่า 30 mesh และ 30-200 mesh) ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารฟางข้าวกับรำข้าว และขี้เลื่อยกับรำข้าวเท่ากับ 4 และ 5 วัน ตามลำดับ

Madamwar, *et al.* (1989) ศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อ *Aspergillus niger* โดยเปรียบเทียบวัสดุหมักต่างๆ คือ ขี้เลื่อย, ซังข้าวโพด, ชานอ้อย และบัตรคอมพิวเตอร์ พบว่า ชานอ้อยที่ผ่านการแปรสภาพด้วย 5 โมลาร์ NaOH เป็นวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ exoglucanase, endoglucanase, FPase และ β-glucosidase ซึ่งได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 12.1, 21.5, 7.6 และ 12.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Prasertsan และ Oi (1992) เปรียบเทียบแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมระหว่างกากปาล์มและเส้นใยปาล์มต่อการผลิตเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* พบว่า กากปาล์มเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสม โดยให้ค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของ CMCase, xylanase และ β-glucosidase เท่ากับ 75.5, 1,156 และ 0.79 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ

Kuhad และ Singh (1993) ศึกษาผลของการแปรสภาพ (pretreatment) วัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Pencillium citrinum* พบว่า การใช้แกลบที่ผ่านการแปรสภาพด้วย NaOH จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าแกลบที่ไม่ผ่านแปรสภาพ โดยมีค่า FPase, CMCase, cellobiase เท่ากับ 36.9, 58.8 และ 75.2 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ

Alam, *et al.* (1994) เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermomyces langinosus* และ *Thermoascus aurantiacus* โดยใช้สับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ รำข้าวสาลี, รำข้าว, กากชานอ้อย, sulfite pulp และสับสเตรทที่ผ่านการแปรสภาพด้วยด่าง เช่น ขี้เลื่อย, juste dust และฟางข้าว พบว่า รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุด ได้ค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของเอนไซม์ เท่ากับ 1,843 และ 542 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ50 ส่วนความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ คือ ร้อยละ 80 และ 50 ตามลำดับ

เอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนเป็นเอนไซม์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible - enzyme) การเติมตัวชักนำ (inducer) มีผลให้เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้น เช่น การ

เติม cellobiose- octaacetate ร้อยละ 0.6 และใช้ Avicel ร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Penicillium purpurogenum* P- 26 ได้แอคทิวิตี้ของ FPase, Avicelase และ Cotton-wool activity (CWase) เพิ่มขึ้น 6.94, 4.61 และ 2.79 เท่าตามลำดับ (Takao, *et al.*,1985) และการเติมไซแลน ร้อยละ 2 ในรำข้าวสาลี ทำให้เชื้อ *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50 ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเพิ่มขึ้น 1.23 เท่า (Yoshioka, *et al.*, 1981)

Ahchara, *et al.* (1985) เลี้ยง *Pleurotus ostreatus* บนเมล็ดข้าวบาร์เลย์ 50 กรัม ใน conical flask ขนาด 300 มิลลิลิตร พบว่า เชื้อสามารถเจริญจนทั่วสับสเตรทหลังการเลี้ยง 2 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงเชื้อบนขี้เลื่อยที่มีการเติม $CaCO_3$ ร้อยละ 1 และ $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.5 ปริมาณ 450+20 กรัมในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่า การเจริญของเส้นใยจากผิวหน้าของอาหารไปจนถึงด้านล่างจะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เลี้ยง เมื่อเติมรำข้าวร้อยละ 5 และ 10 ในขี้เลื่อย เชื้อจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีแอคทิวิตี้สูงกว่า (เล็กน้อย) และต่ำกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงในขี้เลื่อยที่ไม่เติมรำข้าว ตามลำดับ ซึ่งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสขึ้นอยู่กับความลึกของอาหาร โดยเอนไซม์จะสะสมอยู่ชั้นกลางของอาหารในวันที่ 13 ถึง 19 ของการเลี้ยง แต่จะไม่สะสมในชั้นบน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ในชั้นบนของอาหารจะสูงสุดในช่วงแรกของการเลี้ยง

4. เอนไซม์เซลลูเลส

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มเป็นสารพวกลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เซลลูโลสเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β - D - 1,4 glucosidic การย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส ทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมี โดยย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzyme hydrolysis) (Tsao and Chiang, 1983 ; Spano, 1977) การย่อยด้วยกรดเครื่องมือที่ใช้จะต้องทนทานต่อการกัดกร่อน ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ส่วนโมเลกุลของเซลลูโลสที่เป็นระเบียบ (crystalline) จะทนทานต่อกรดที่มีความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูง และเนื่องจากปฏิกิริยาการใช้กรดไม่เฉพาะเจาะจง

กลูโคสบางส่วนที่เกิดขึ้นและสารประกอบอื่นที่ติดมากับเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยากับกรดต่อไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ส่วนการใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่มีความจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายจึงได้น้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างบริสุทธิ์

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ (multiple enzymes) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ (Fan and Lee, 1983)

4.1 Endo-β-1,4-glucan glucanohydrolase (EC.3.2.1.4) หรือ endo-β-1,4-glucanase ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในรูปที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) รวมทั้งโมเลกุลของ cellooligomer ที่ตำแหน่งพันธะ β-1,4 แบบสุ่ม ทำให้ได้ oligomer และเซลโลไบโอส

4.2 Exo-β-1,4-glucan cellobiohydrolase (EC. 3.2.1.91) หรือ CBH เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ Endo-β-1,4-glucanase ในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยย่อยจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส

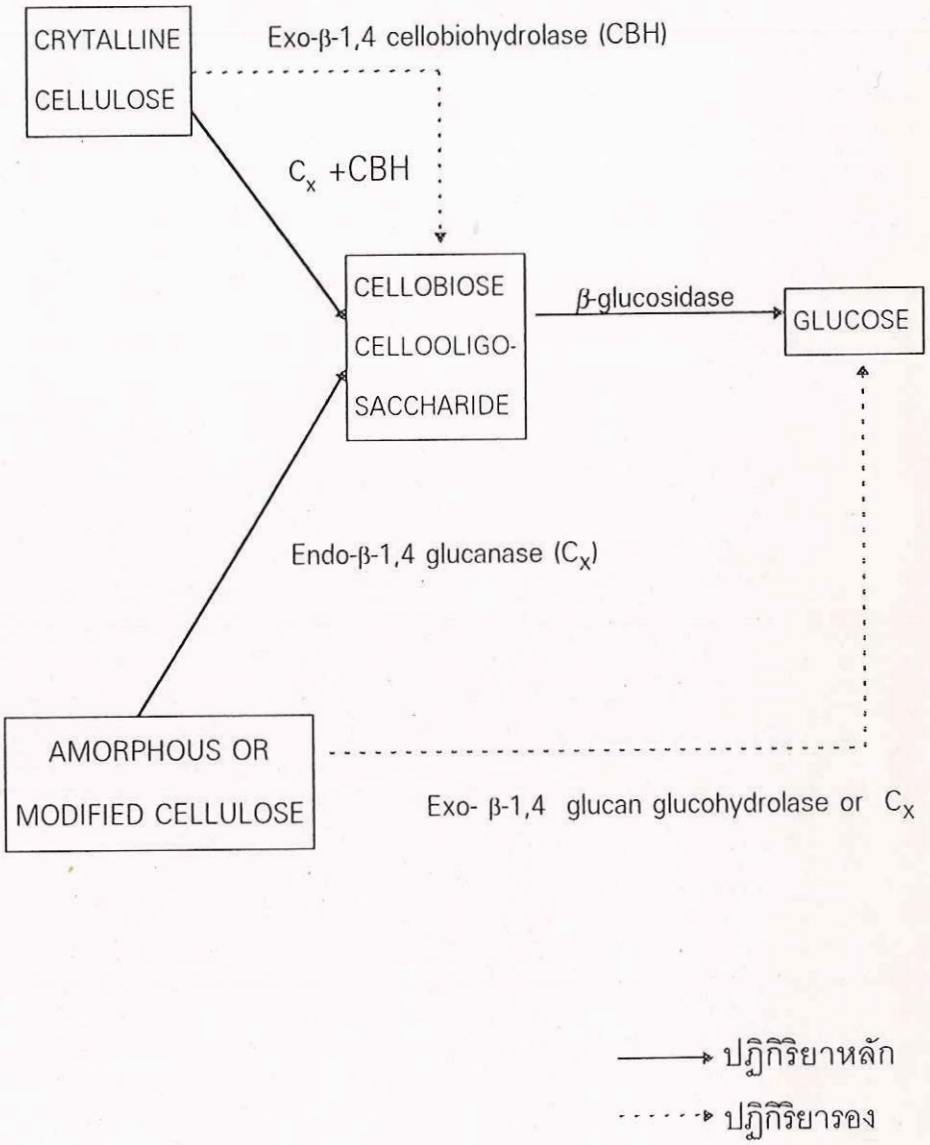
4.3 β-glucosidase (EC. 3.2.21) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของ cellobiose และ cellooligosaccharide ให้กลูโคส

4.4 Exo-β-1,4-glucan glucohydrolase (EC. 3.2.1.7.4) หรือ exo-β-1,4-glucosidase เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่แยกหน่วยกลูโคสออกจากปลายด้าน non-reducing ของเซลลูโลส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสโดยตรงโดยไม่เกิดเซลโลไบโอส เอนไซม์ชนิดนี้พบในจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichoderma reesei* QM 9414 (Marsden, *et al.*, 1982)

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลเซลลูโลสทั้งในรูปที่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและเป็นระเบียบ ได้น้ำตาลกลูโคสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ดังรูปที่ 6

5. เอนไซม์ไซลาเนส

ส่วนเฮมิเซลลูโลส เป็นโพลีแซคคาไรด์เช่นเดียวกับเซลลูโลส แต่โมเลกุลมีขนาดสั้นกว่าและมี side chain ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด เช่น ไซโลส กลูโคส แมนโนส กาแลคโตส อะราบิโนส (Tsao and Chiang, 1983) องค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส



รูปที่ 6 ลำดับการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ที่มา : Fan และ Lee (1983)

คือ ไซแลน ซึ่งเป็น xylopyranose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (1→4) ไซแลนจากแหล่งต่างๆ มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน จะต่างกันใน side chain ที่พบโดยทั่วไปคือ L-arabinofuranose, D - glucuronic acid, 4-*O*-methy-D-glucuronic acid, acetic acid และไดแซคคาไรด์ ของ D-xylopyranose จับกับ L-arabinofuranose ซึ่ง side chain เหล่านี้จะใช้คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 จับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ของไซโลส (Goodwin and Mercer, 1972 และ Wong, *et al* ., 1986 อ้างโดย วิเชียร สีสุข, 2532) โดยทั่วไปไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อนมีประมาณร้อยละ 15 - 30 และ 7-12 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Whitler and Richard, 1970 อ้างโดย Gilbert, *et al.* , 1993)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส แบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Dekker and Richards, 1976 อ้างโดย วิเชียร สีสุข, 2532) คือ

5.1 Endo β-1,4-xylan xylanohydrolase (EC. 3.2.1.8) ทำหน้าที่ย่อยพันธะ β-1,4 glucosidic ของ xylopyranoside แบบสุ่ม เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายโมเลกุลไซแลนให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล xylooligosaccharide โมเลกุลเล็ก เช่น xylobiose, xylotriose, xylotetraose และ xylopentaose ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะของเอนไซม์ของแต่ละสายพันธุ์ เอนไซม์ไซลาเนส ยังแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการย่อยสลาย 1,3- α-L-arabinoglucuronoxylan และ arabinoxylan คือ

5.1.1 arabinose-liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบิโนส

5.1.2 non-arabinose-liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสลาย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของไซโลสและอะราบิโนส

5.2 Exo β-1,4-xylohydrolase (EC. 3.2.1.37) หรือเรียกสั้นๆว่า β-xylosidase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุล xylooligosaccharide ที่เป็นผลมาจากการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ Endo β-1,4-xylan xylanohydrolase ทำให้ได้โมเลกุลไซโลส

6. การแปรสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสและการประยุกต์ใช้เอนไซม์

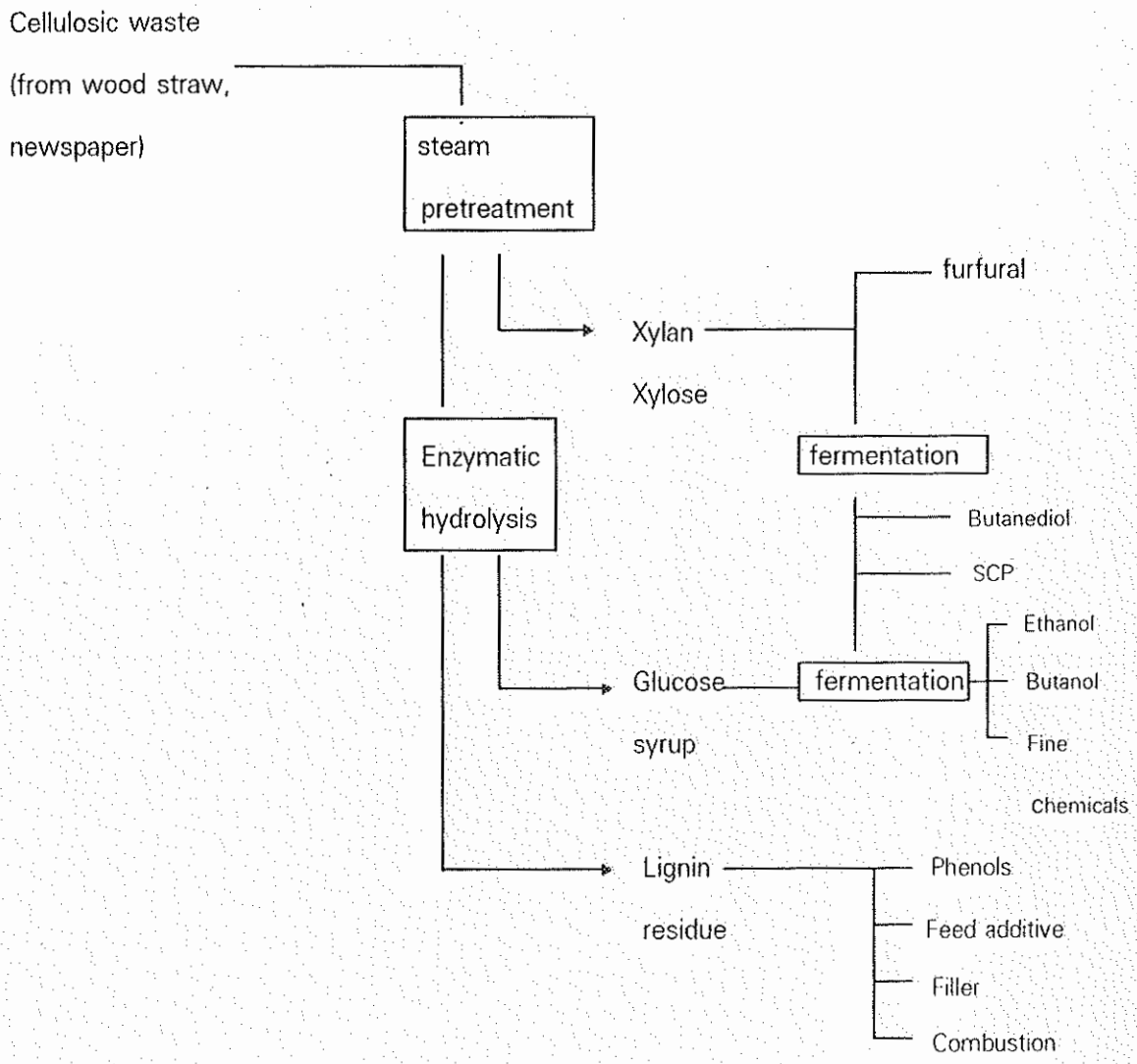
การที่เซลลูโลสถูกห่อหุ้มด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเป็นการขัดขวางการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูโลส การแปรสภาพ (pretreatment) โดยวิธีการทางกายภาพและทางเคมีจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น เช่น การใช้ด่างหรือตัวทำละลาย (Viikari, *et al.*, 1994) สกัดหรือแยกเฮมิเซลลูโลสออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส หรือการใช้ไอน้ำ อุณหภูมิ 120-180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งการแปรสภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนนี้จะทำให้ไซแลนและไซโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสละลายในน้ำเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80 แต่ภายใต้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและใช้เวลานานจะทำให้ไซโลสเปลี่ยนเป็น furfural ส่วนไซแลนจะสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรททางเคมี ชีวเคมี หรือกระบวนการที่ใช้จุลินทรีย์ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากกระบวนการหมัก เช่น การใช้กระบวนการที่ใช้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำ (hydrothermolysis) จะได้ของเหลวเรียกว่า ไฮโดรไลเสท (hydrolysate) ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส รวมทั้งส่วนของลิกนินที่ละลายได้ เช่น coniferyl alcohol, syringa aldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, vanillin, furfural เป็นต้น ผลิตผลพลอยได้เหล่านี้จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมากน้อยแค่ไหนขึ้นกับชนิดของพวกลิกโนเซลลูโลส ส่วนของแข็งที่เหลือจะมีเพียงเซลลูโลสและลิกนินซึ่งสามารถย่อยด้วยเอนไซม์ ดังรูปที่ 7 (Buchholz, *et al.*, 1980/1981) น้ำตาลกลูโคสที่ได้นี้จะมีราคาถูกและสามารถนำไปเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีราคาสูงโดยการใช้เอนไซม์ หรือกระบวนการหมัก (Fiechter, 1986) แสดงดังรูปที่ 8

เอนไซม์ xylanase สามารถนำมาประยุกต์ใช้ดังนี้ (Wong, *et al.*, 1988)

6.1 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Bioconversion)

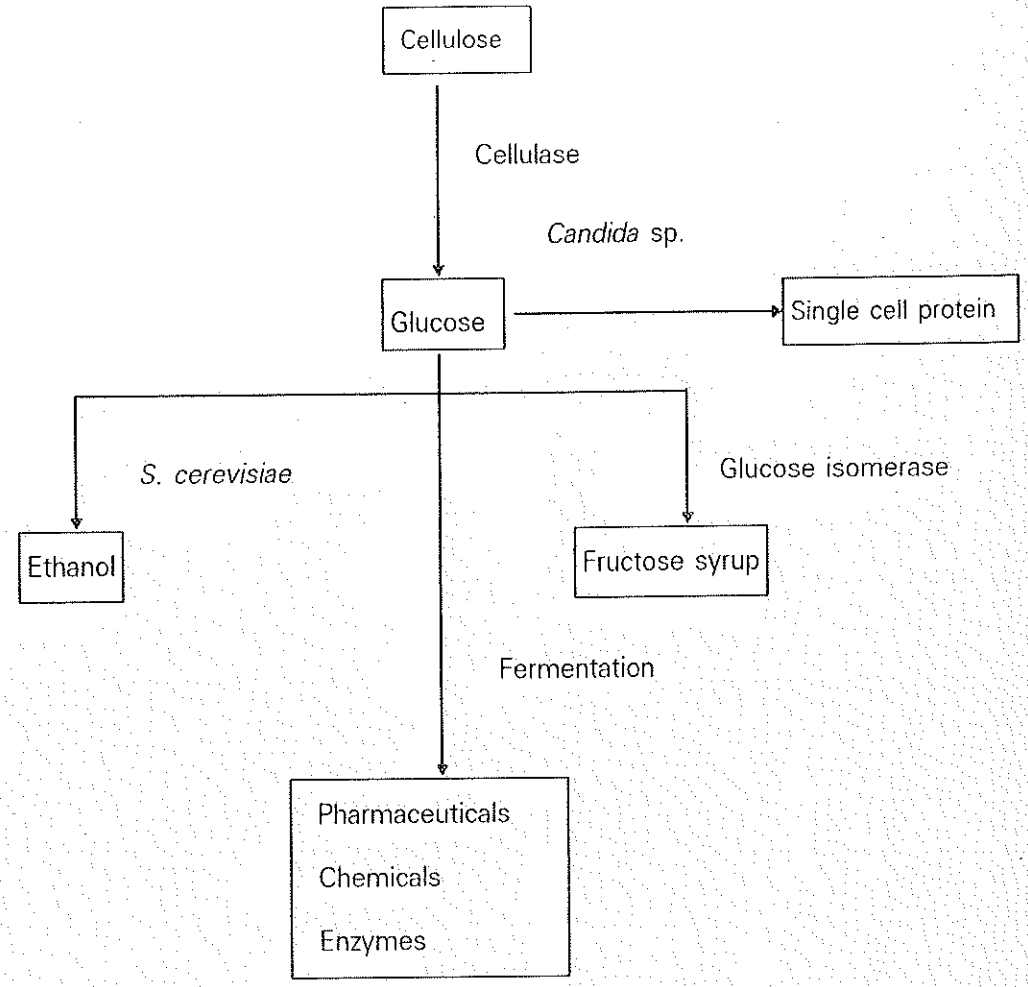
กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล (ตารางที่ 9) ซึ่งอาจใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักต่อไป

Walch, *et al.* (1992) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อที่แยกมาจากดิน คือ Enzyme B5 และเอนไซม์ไซลาเนสทางการค้าได้แก่ Roth 5246 และ Rohm EL 182-87 (แอคทิวิตี้ 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ย่อยสารละลายไซแลนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 และไฮโดรไลเสทจากชานอ้อย โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้



รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเศษเหลือพวกเซลลูโลส

ที่มา : Buchholz, *et al.* (1980/81)



รูปที่ 8 การประยุกต์ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Fiechter (1986)

ตารางที่ 9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ

แหล่งของเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์	%การย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus sp. 13 *Humicola* sp.14 *Thermoascus* sp. 2	ไซโลส	90	Chavanich, *et al.*, 1981
Talaromyces bysochlamydoides YH-50	ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลคโตส	90	Yoshioka, *et al.*, 1981
Humicola lanuginosa	ไซโลเพนตะโอส ไซโลเตตระโอส ไซโลไตรโอส ไซโลไบโอส	-	Kitpreechavanich, *et al.*, 1984

เอนไซม์ Roth, Rohm และ Enzyme B 5 ย่อยของเหลวที่ได้จากการแปรสภาพซานอ้อยด้วยกระบวนการที่ใช้ความร้อน แบบ direct flow-through เพียงครั้งเดียว (200 องศาเซลเซียส) จะให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลไซโลส 3.0, 2.6 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่การย่อยของเหลวที่ได้จากการใช้ซานอ้อยเป็นวัตถุดิบและผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อน แบบ recirculation ซึ่งเป็นการแปรสภาพซานอ้อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียสหลายๆครั้ง พบว่า จะให้น้ำตาลไซโลสสูงกว่า คือ มีค่า 14.2, 7.7 และ 8.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การที่เอนไซม์แต่ละชนิดย่อยสับสเตรทให้ปริมาณน้ำตาลต่างกัน เนื่องจากน้ำตาลไซโลสที่ได้จะมีผลยับยั้งไซลาเนสแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลาย ซึ่งการใช้เอนไซม์ผสมของ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F กับ *Humicola lanuginosa* ย่อยสลายฟางข้าว พบว่า การย่อยสลายสับสเตรทเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้การย่อยสลายจะลดลง น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายจะสูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 55-60 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการย่อยสลาย 12 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มปฏิกิริยาเป็น 24 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสและไซโลสจะเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในช่วงแรกของการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสและไซโลสมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดได้รวดเร็วในช่วงอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลกลับลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลาย เนื่องจากเอนไซม์จะสูญเสียคุณสมบัติเนื่องจากความร้อน (วิเชียร สีสุข, 2532)

Saddler, *et al.* (1983) ใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดด้วยน้ำหรือตัวทำละลายจากเนื้อไม้ aspen มาเป็นสับสเตรทและย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichoderma* sp. E 58ดังตารางที่ 10 พบว่า ได้น้ำตาลรีดิวส์ซึ่งเป็นโมโนแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักมากกว่าร้อยละ 50 โดยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทธานอล-เบนซิน (SEA ในตารางที่ 10) ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ใกล้เคียงกับไซแลนทางการค้าและมากกว่าการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จาก

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการใช้เอนไซม์จาก *Trichoderma* sp. E58 ย่อยเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากเนื้อไม้ด้วยวิธีต่างๆ

Substrate (100mg/ml)	Pentosan originally present as %	Reducing sugars (mg/ml)	Monosaccharides (mg/ml)					
			Xylose	Galactose	Glucose	Mannose	Arabinose	total
Xylan (sigma)	79.5	58.6	22.8	0.5	4.2	1.6	4.8	33.0
SEA	85.5	56.9	26.3	5.0	<0.1	2.6	0.1	34.0
SEW-WS2	61.5	33.2	23.6	2.7	<0.1	<0.1	<0.1	26.0
SEW-WS2-0.1%A	56.3	34.9	28.5	1.6	<0.1	1.5	<0.1	31.0
SEW-WS2-0.2%A	51.0	42.9	23.2	7.9	5.7	<0.1	<0.1	36.0

ที่มา : Saddler, *et al.* (1983)

หมายเหตุ

SEA = เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดเนื้อไม้ aspen ด้วย ethanol-benzene

SEA-WS2 = เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากเนื้อไม้ aspen โดยอบด้วยไอน้ำอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส (560 ปอนด์/ตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 วินาที แล้วสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SEA-WS2-0.1%A = เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากส่วนที่ละลายน้ำได้ของเนื้อไม้ aspen ที่แช่ด้วย H_2SO_4 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ก่อนการสกัดเช่นเดียวกับ SEA-WS2

SEA-WS2-0.2%A = เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากส่วนที่ละลายน้ำได้ของเนื้อไม้ aspen ที่แช่ด้วย H_2SO_4 เข้มข้นร้อยละ 0.2 ก่อนการสกัดเช่นเดียวกับ SEA-WS2

Reaction mixture ประกอบด้วย สับสเตรทเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์-ซิเตรท เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้าและสารละลายใสของ *Trichoderma* sp. E58 ที่มีปริมาณโปรตีน 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัดด้วยกรดก่อนการใช้ไอน้ำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มากกว่าการสกัดที่ไม่ใช้กรดก่อนการใช้ไอน้ำ

Viikari, *et al.* (1994) สกัดไซแลนจาก pine kraft pulp ที่สกัดด้วย KOH เข้มข้น 1.32 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน และทำให้เข้มข้นโดยการระเหยให้เหลือปริมาตรเพียงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายผสมของเอทธานอลและกรดอะซิติก แล้วล้างด้วยเอทธานอลและอีเทอร์ เมื่อทดลองใช้ไซแลนที่สกัดได้และไซแลนที่สกัดจาก birch kraft pulp (ตามวิธีการของ Ebringerova, *et al.*, 1967 อ้างโดย Viikari, *et al.*, 1994) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นสับสเตรทในการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส I และ II จาก *Trichoderma reesei* RUT C-30 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง พบว่า ไซลาเนส II (pI 9.0) ย่อยไซแลนจาก birch kraft pulp ได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 52 ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการใช้ไซลาเนส I (pI 5.5) ถึง 2 เท่า โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส ส่วนการย่อยไซแลนจาก pine kraft pulp พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส I และ II ให้ผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 55) สำหรับคุณสมบัติการละลายน้ำ พบว่า ไซแลนจาก birch kraft pulp ละลายน้ำได้ร้อยละ 1 และไซแลนจาก pine kraft pulp ละลายน้ำได้มากกว่าร้อยละ 20 เนื่องจากมี arabinose side-group ในส่วนแกนกลาง (back bone) ของไซแลนอยู่สูงและมี polymerization ต่ำ

6.2 Biopulping

ในอดีตกระบวนการทำกระดาษจะใช้เชื้อราในการ treat เนื้อเยื่อไม้ เพราะสามารถช่วยลดต้นทุนด้านพลังงานในกระบวนการฟอก (refining) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์ไซลาเนสจะช่วยลดระยะเวลาในการ treat เนื้อเยื่อไม้ และได้เยื่อไม้ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เนื่องจากสารละลายของเนื้อเยื่อไม้มีเฮมิเซลลูโลสซึ่งระหว่างการให้ความร้อนหรือในสภาวะที่เป็นด่างไซแลนบางส่วนละลายออกมาในลักษณะสายสั้นๆตกตะกอนอยู่บนผิว microfibril ของเซลลูโลส (Yllner, *et al.*, 1957 อ้างโดย Ratto, *et al.*, 1994) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการฟอกเนื้อเยื่อไม้สำหรับทำเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมี เช่น คลอรีน โดยเอนไซม์จะไปย่อยไซแลนที่ตกตะกอนเหล่านั้น Christov และ Prior (1993) ใช้เอนไซม์ไซลาเนสที่ได้จากเชื้อ *Aureobasidium pullulan* NRRL Y-2311-1 ที่มี

แอคทิวิตี้ 1500 ยูนิต/กรัม (เตรียมสารละลายเอนไซม์ในซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5) ย่อยสารละลายเยื่อไม้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่มและแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น โดยย่อยได้น้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 10 มิลลิกรัม/ กรัมเยื่อไม้ น้ำตาลรีดิวส์ที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆ ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส

6.3 กระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ทำให้น้ำผลไม้ใส, ช่วยในการย่อยอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์, มีการใช้เอนไซม์ไซลาเนสในการเตรียมวัตถุดิบในการวิจัยทางวิทยาศาสตร์, ใช้ศึกษาคุณสมบัติของโพลีแซคคาไรด์และผนังเซลล์ของพืช (Wong, *et al.*, 1988) และประยุกต์ใช้ในการสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส โดยใช้ในอัตรา 200-1,000 กรัมต่อตัน ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เพื่อแปรสภาพเนื้อเยื่อพืชก่อนนำไปสกัดด้วยกระบวนการที่ใช้น้ำปริมาณน้อยและแยกน้ำมันด้วยการหมุนเหวี่ยงในกระบวนการขั้นต่อไป นอกจากนี้ ยังช่วยปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันและน้ำทิ้งโดยลดปริมาณเนื้อเยื่อของพืชที่มีโมเลกุลสูง ซึ่งทำให้เกิดความหนืดหรือข้น เช่น กลูแคน (glucans), เฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส และเพคติน ทำให้การแยกน้ำมันในขั้นตอนการทำให้ใส (clarification) ดีขึ้น (Godfrey, 1983)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 บนอาหารแข็งที่มีกากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน
2. ศึกษาหาแนวทางการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. <u>วัตถุดิบ</u>

กากปาล์มได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช ตำบลพะตง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา กากสลัดจ์ น้ำทิ้งรวม น้ำทิ้งจากเครื่อง decanter และน้ำนึ่งปาล์ม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

บดกากปาล์มและกากสลัดจ์แห้ง (โดยการตาก) ด้วยเครื่องบดและร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มม. (20 mesh)เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง ส่วนน้ำทิ้งรวม น้ำทิ้งจากเครื่อง decanter และน้ำนึ่งปาล์ม เก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. <u>จุลินทรีย์</u>

Aspergillus niger ATCC 6275 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Susumu Oi, Osaka City University ประเทศญี่ปุ่น เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก.) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุกๆเดือน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

เอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ Meicellase (Meiji Co.) และ Sumyzyme (Shin Nikon Chemical Co.)

3. <u>สารเคมี</u>

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์เพื่อหาค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่งของบริษัท Sartorius

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

เครื่องเขย่า

เครื่องเหวี่ยง Type H-103 NR ของบริษัท Kokusan Ensinki จำกัด

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และกล้องจุลทรรศน์ของบริษัท Olympus จำกัด

เครื่องเขย่าหลอด (Vortex mixer) ของบริษัท Lab- Line Instruments

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่อง Spectrophotometer Model U-2000 พร้อมเครื่องพิมพ์ของบริษัท Hitachi จำกัด

เครื่องปั๊มอากาศ (Air compressor) ของบริษัท Thai Maxwell Electric จำกัด

คอลัมน์เลี้ยงเชื้อเป็นหลอดแก้ว ขนาด 34x3.4 เซนติเมตร ที่มีจุกยางพร้อมท่อแก้ว ที่ต่อกับท่อพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะรูทุกๆ ระยะ 2.5 เซนติเมตร และยึดติดกับแผ่นตะแกรงซึ่งอยู่สูงจากส่วนปลายของหลอดแก้ว 9 เซนติเมตร รองบนแผ่นตะแกรงด้วยผ้าขาวบาง (รูปที่ 9)

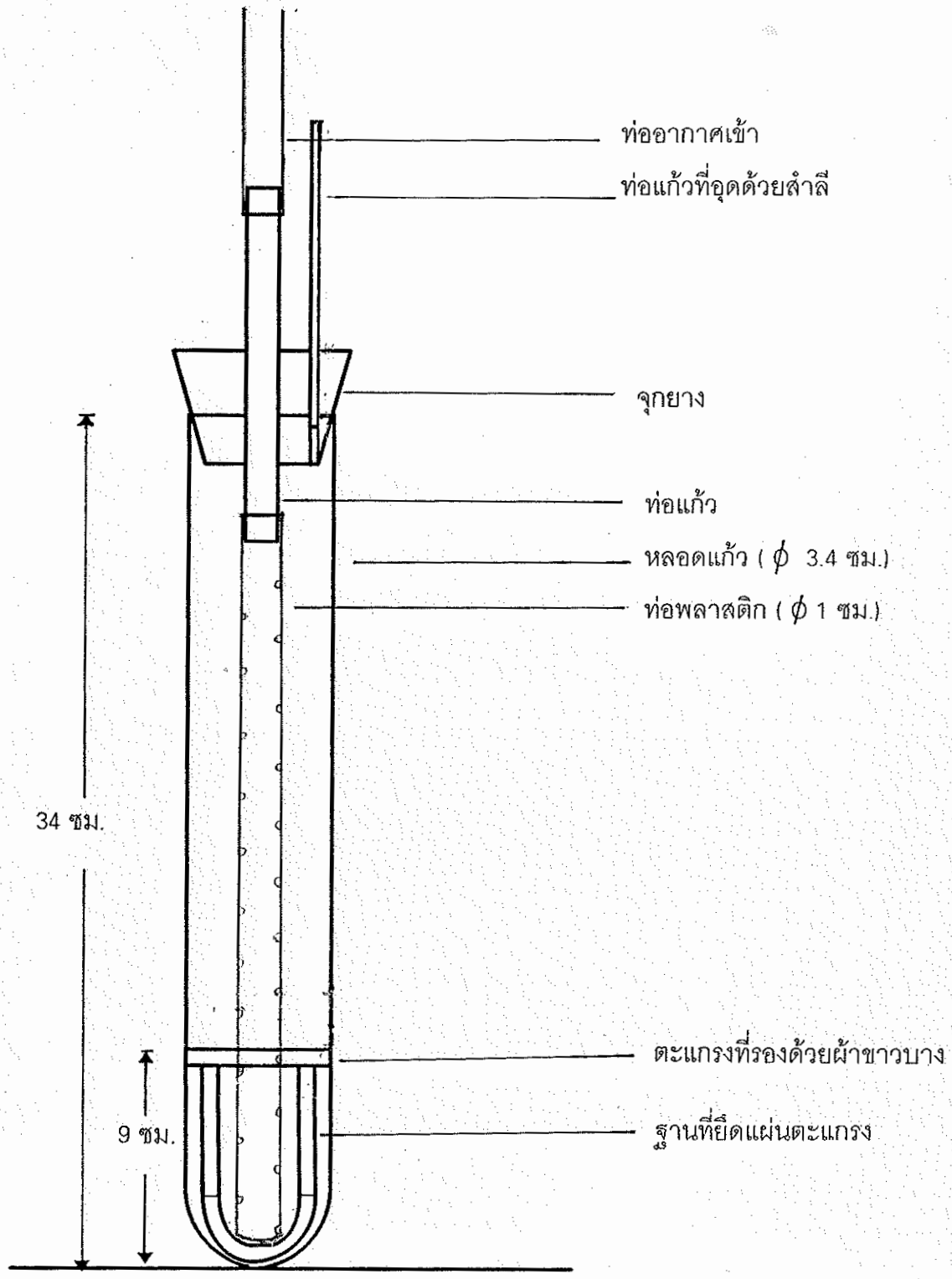
เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ series RMA (Rate - master flow meter) ของบริษัท Dewyer Instruments, Inc.

เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ (เทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียก-กระเปาะแห้ง)

เครื่องเหวี่ยง Type SCR 20 ของบริษัท Hitachi koki Co., Ltd.

<u>การวิเคราะห์</u>

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างของเชื้อเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดตัวอย่างบนฮีมาไซโตรมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ $5x10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อเติมในสับสเตรท 5 กรัม



รูปที่ 19 ลักษณะของคอลัมน์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในกากปาล์ม

2. การหาค่าพีเอช นำอาหาร 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำ 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำสารละลายที่ได้วัดค่าพีเอชด้วยพีเอชมิเตอร์

3. ความชื้น วัตถุแห้ง สารเยื่อใย ไขมัน เถ้า วิเคราะห์ตามวิธีการที่ระบุใน Official Method of Analysis (A.O.A.C., 1990)

4. ปริมาณแร่ธาตุ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก และทองแดง ส่งตัวอย่างกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวม ไปวิเคราะห์แร่ธาตุต่างๆที่หน่วยปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีการที่ระบุใน Official Method of Analysis (A.O.A.C., 1990)

5. ซีโอดี (APHA,AWWA and WPCF, 1985)

6. ปริมาณน้ำมันและกรีส (Oil & Grease) (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริสิงห, 2522)

7. ปริมาณของแข็งทั้งหมด (APHA, AWWA and WPCF, 1985)

8. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์

8.1 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ Carboxymethylcellulase (CMCase) ตามวิธีการของ Mandels และ Weber (1969)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC, BHD Chemicals Ltd.) เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi (Nelson, 1944) (ภาคผนวก ข) ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์จะมีชุดควบคุม ซึ่งเติมสารละลายต่างๆเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว แต่ไม่บ่ม นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ ก่อนการคำนวณหาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนปริมาตรของตัวอย่างและสารละลาย CMC

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

8.2 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีของ Tan, *et al.* (1987)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลายไซแลน (oats spelt xylan, Sigma Chemical Ltd.) เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วหาน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi ในการวิเคราะห์จะมีชุดควบคุมและ blank เช่นเดียวกับการหาแอคทิวิตี้ของ CMCase

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

คำนวณแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ CMCase และไซลาเนสให้มีหน่วยเป็นยูนิตต่อกรัม (ดูตัวอย่างในภาคผนวก ข) โดยใช้สูตร

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

9. ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ และทำการทดลอง 2 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRISTAT Version 90-1 (1990)

วิธีการ

1. วิเคราะห์องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

หาความชื้นของกากปาล์มและกากสลัดจ์ เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับความชื้นเริ่มต้นของการหมัก วิเคราะห์ปริมาณสารเยื่อใย ไขมัน เถ้า และวัตถุแห้ง ส่วนน้ำทิ้งรวมวิเคราะห์ปริมาณไขมัน และของแข็งทั้งหมด และวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุต่างๆของวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและทองแดง

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275

2.1 ผลของชนิดและแหล่งของสารอาหาร

เลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6 x 8 นิ้ว บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ดังนี้

สูตร 1 ประกอบด้วย กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคส ร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตน ร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตน ร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.05, และน้ำกลั่น

สูตร 2 ประกอบด้วย กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคส ร้อยละ 0.2, ยูเรีย ร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แห้งแทนกากปาล์ม

สูตร 4 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แห้งแทนกากปาล์ม

สูตร 5 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

สูตร 6 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

สูตร 7 ประกอบด้วย กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

สูตร 8 ประกอบด้วย กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

สำหรับสูตร 5-8 ซึ่งใช้น้ำทิ้งรวมในปริมาตรที่ให้ค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับการใช้

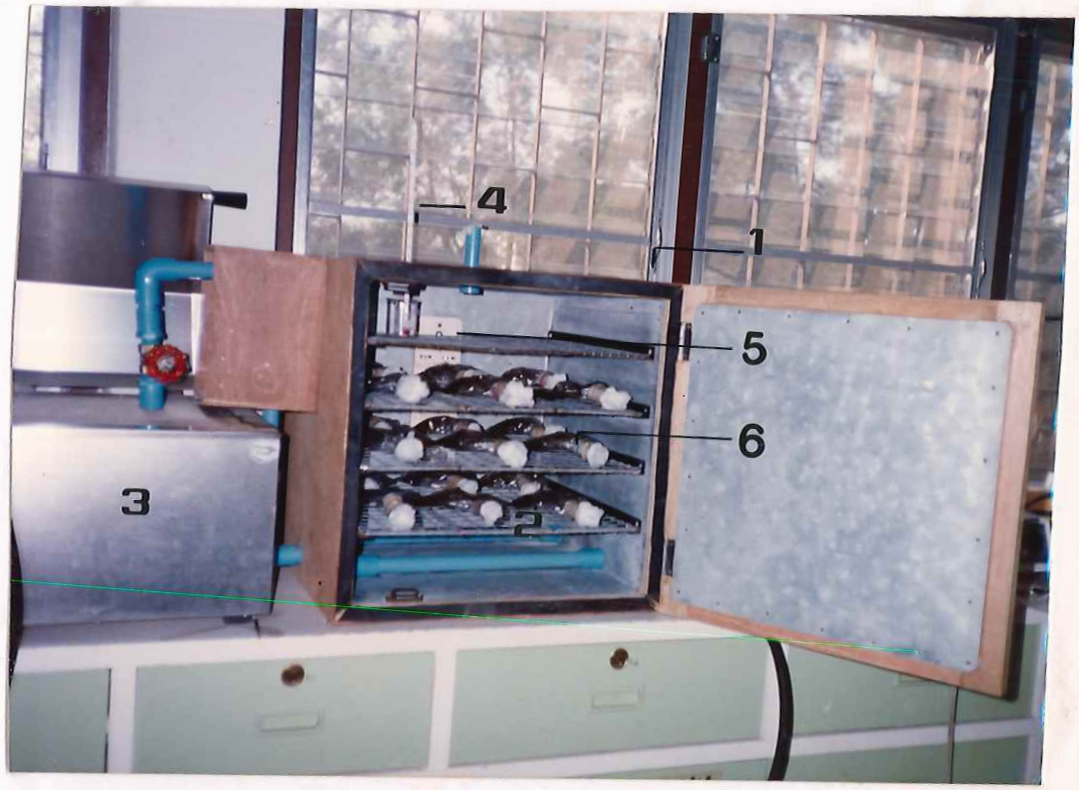
น้ำกลั่น และทุกสูตรปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH ความเข้มข้น 0.3 นอร์มัล ปรับความชื้นเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 50-60 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์/กรัมสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน นำตัวอย่างไปสกัดด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรท วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แยกไมซีเลียมโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800 xg (4,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 50 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนส และ CMCase

2.2 ผลของการให้อากาศที่มีความชื้น

เลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในสูตรอาหารที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2.1) บ่มในตู้บ่มที่ให้อากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง โดยปั๊มอากาศในอัตรา 20 ลิตร/นาที ผ่านอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ตู้บ่มมีอุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นการเลี้ยงโดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ในสภาวะปกติ วัดค่าความชื้นสัมพัทธ์ด้วยเทอร์โมมิเตอร์กระเปียก-กระเปาะแห้ง สุ่มตัวอย่างที่เวลา 3, 6 และ 9 วัน วัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase

2.3 ผลของการเลี้ยงเชื้อในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ

เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ ถุงพลาสติก กระด้งและคอลัมน์ โดยเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่เหมาะสมในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. และ 1,000 มล. บรรจุสับสเตรท 5 และ 20 กรัม ตามลำดับ โดยมีความหนาของชั้นสับสเตรท 0.2 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว และ 20x30 นิ้ว บรรจุสับสเตรท 5 และ 300 กรัม ตามลำดับ โดยมีความหนาของชั้นสับสเตรท 0.2 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ กระด้ง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 53 เซนติเมตร) บรรจุสับสเตรท 300 กรัม โดยมีความหนาของชั้นสับสเตรท 0.5 เซนติเมตร และคอลัมน์เลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 11) บรรจุสับสเตรท 30 กรัม โดยมีความหนาของชั้นสับสเตรท 16 เซนติเมตร



รูปที่ 10 ตู้บ่มที่มีการให้อากาศชื้นโดยให้อากาศที่มีอัตราการไหล 20 ลิตร/นาที ผ่านเข้าสู่อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่ตู้บ่ม ให้ตู้บ่มมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 และมีอุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส

1 ตู้บ่ม

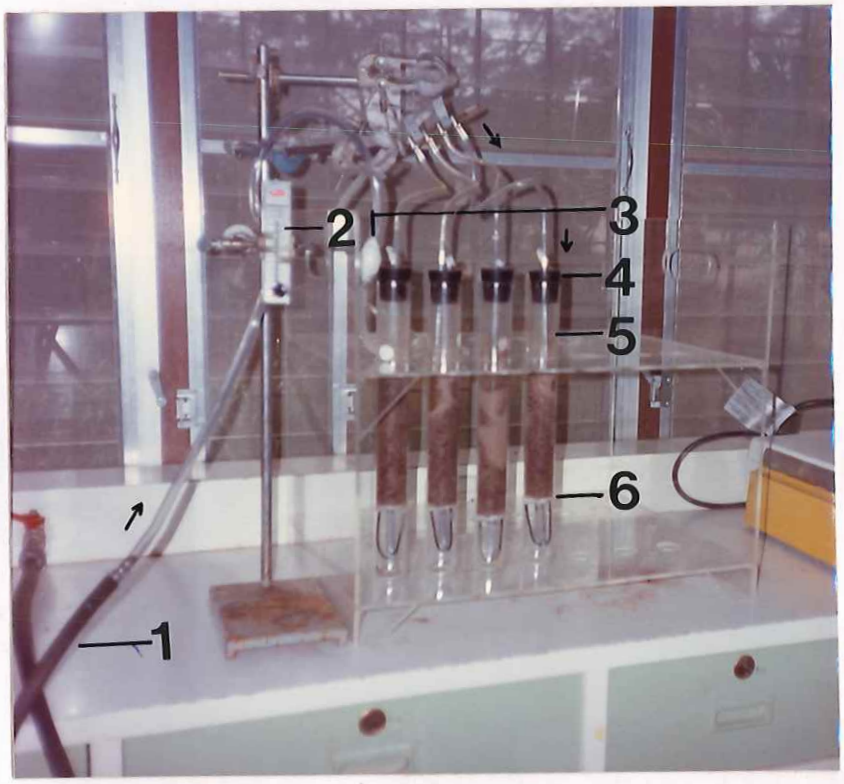
2 ช่องว่างภายในตู้

3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

4 เทอร์โมมิเตอร์

5 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์

6 ถุงพลาสติกขนาด 6x8 นิ้ว



รูปที่ 11 การเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในคอลัมน์และให้อากาศในอัตราการไหล 0.5 ลิตร/นาที

1 อากาศเข้า

2 เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ

3 เครื่องกรองอากาศ

4 จุกยางพร้อมท่อแก้วที่ต่อกับท่อพลาสติกเจาะรูให้อากาศ

5 คอลัมน์

6 แผ่นตะแกรงรองด้วยผ้าขาวบาง

อัตราการไหลของอากาศ 0.5 ลิตร/นาที สุ่มตัวอย่างที่เวลา 3 และ 9 วัน วัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase

3. การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275

3.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 2) เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ในปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรท ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 2.1 หลังการเหวี่ยงนำสารละลายส่วนใส (filtrate) มาตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ เก็บตะกอนโปรตีนในช่วงความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ร้อยละ 20-70 โดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ทีละน้อยพร้อมทั้งคนด้วยแท่งแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็วต่ำๆ และคนต่ออีกประมาณ 30-60 นาทีหลังเติมครั้งสุดท้าย แยกตะกอนโปรตีนโดยนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 xg (10,000 รอบ/นาที) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้ปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตรตะกอน นำมา dialysis ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เป็นเวลา 6-7 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้วิเคราะห์หาค่าแอคทิวิตี้ไซลาเนส และ CMCase

การเตรียมสารละลายเอนไซม์ในทางการค้า ได้แก่ Meicellase และ Sumyzyme โดยละลายเอนไซม์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ให้ได้แอคทิวิตี้เท่ากับแอคทิวิตี้ของสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275

3.2 การใช้เอนไซม์แยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำสารละลายเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* และสารละลายเอนไซม์ทางการค้าที่เตรียมไว้แล้ว (จากข้อ 3.1) อย่างละ 25 มล. ผสมกับน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ปริมาตร 25 มล. (อัตราส่วน 1 : 1) บรรจุสารละลายผสมในกระบอกตวงขนาด 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องและในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เวลา 0, 30, 60, 90,

120 นาทีและทิ้งไว้ข้ามคืน บันทึกปริมาตรของตะกอนหนัก ตะกอนเบา และส่วนใส หาน้ำหนักของตะกอน และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันและกรีส (Oil & Grease) ของตะกอนและส่วนใส (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริสิงห, 2522)

3.3 การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มหรือกากปาล์ม เพื่อผลิตน้ำตาล

3.3.1 <u>การเตรียมเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์ม</u>

นำน้ำนึ่งปาล์มมาแยกเฮมิเซลลูโลสโดยการตกตะกอนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95 ในปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย แล้วทิ้งไว้ให้เฮมิเซลลูโลสตกตะกอน 24 ชั่วโมง กรองตะกอนด้วยกระดาษกรองแล้วล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 99.8 (absolute alcohol) 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ส่วนกากปาล์มนำไปทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็น กรองแยกกากออก นำสารละลายส่วนใสไปปรับพีเอชเป็น 4.5 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น และตกตะกอนเฮมิเซลลูโลสด้วยวิธีการเช่นเดียวกับน้ำนึ่งปาล์ม (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และอัครวิทย์ กาญจนโอภาษ, 2532)

3.3.2 <u>การย่อยสลายให้ได้น้ำตาล</u> (Saccharification)

เตรียมสารละลายสับสเตรทโดยละลายเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้ และไซแลนทางการค้า ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8)ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 ผสมกับสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* และเอนไซม์ทางการค้า ในอัตราส่วน 1 : 1 เติมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol (เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ) ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. บ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,100 xg (3,000 รอบ/นาที) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

3.4 การใช้เอนไซม์ในการทำให้น้ำผลไม้ใส

นำสารละลายเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 และสารละลายเอนไซม์ทางการค้า ที่เตรียมไว้แล้ว (จากข้อ 3.1) อย่างละ 14 มล. ผสมกับน้ำสับปะรดที่คั้นจากสับปะรดสุกเต็มที่ ปริมาตร 36 มล. บรรจุสารละลายผสมในกระบอกตวงขนาด 50 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120 นาที และทิ้งไว้ข้ามคืน

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. วิเคราะห์องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวม (ตารางที่ 11) พบว่า กากปาล์ม ประกอบด้วย วัตถุแห้งร้อยละ 92.25 ใกล้เคียงกับผลของจรัญ จันทลักขณา (2526) และยุทธนา ศิริวัธนนุกูล (2530) ที่รายงานไว้ร้อยละ 90.0 และ 90.2 ตามลำดับ โปรตีนร้อยละ 7.62 ไขมันร้อยละ 9.87 เถ้าร้อยละ 6.48 ซึ่งสอดคล้องกับผลของพานิช ทินนิมิตร (2535) ที่รายงานไว้ได้ค่าร้อยละ 8.0, 8.0 และ 5.0 ตามลำดับ และเยื่อใยร้อยละ 16.75 ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Okiy (1987) รายงานไว้ร้อยละ 15.7 ส่วนกากสลัดจ์ประกอบด้วย วัตถุแห้งและไขมันร้อยละ 95.43 และ 16.12 ตามลำดับ ในขณะที่พานิช ทินนิมิตร (2535) รายงานไว้ร้อยละ 90 และ 21 ตามลำดับ โปรตีนและเยื่อใยร้อยละ 13.31 และ 15.95 ตามลำดับ แตกต่างเล็กน้อยจากรายงานของพานิช ทินนิมิตร (2535), Rajagopalan and Webb (1975) และ Webb, *et al.* (1977) โดยโปรตีนมีค่าร้อยละ 10, 10.2 และ 17.6 ตามลำดับ และเยื่อใยมีค่าร้อยละ 12.0, 11.40 และ 11.40 ตามลำดับ ส่วนเถ้ามีค่าร้อยละ 12.51 ซึ่งสูงกว่ารายงานอื่นๆ คือ ร้อยละ 11, 11.30 และ 11.30 ตามลำดับ สำหรับน้ำทิ้งรวมมีองค์ประกอบดังนี้ ไขมันร้อยละ 20.04 (ต่อน้ำหนักแห้ง) และโปรตีนร้อยละ 0.37 และมีปริมาณของแข็งทั้งหมด 38,180 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวม พบว่า กากสลัดจ์มีปริมาณโปรตีนมากกว่ากากปาล์มและน้ำทิ้งรวม ตามลำดับ ในขณะที่น้ำทิ้งรวมมีปริมาณไขมันสูงสุด รองลงมาคือ กากสลัดจ์และกากปาล์ม ตามลำดับ ส่วนปริมาณเยื่อใยของทั้งกากปาล์มและกากสลัดจ์มีค่าใกล้เคียงกัน

สำหรับปริมาณแร่ธาตุของวัสดุเศษเหลือทั้ง 3 ชนิด พบว่า กากปาล์มประกอบด้วย ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, โซเดียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม, เหล็ก

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	กากปาล์ม	กากสลัดจ์	น้ำทิ้งรวม**
ความชื้น	7.75	4.57	-
วัตถุแห้ง	92.25	95.43	-
โปรตีน (N x 6.25)	7.62	13.31	0.37
ไขมัน	9.87	16.12	20.04*
เยื่อใย	16.75	15.95	-
เถ้า	6.48	12.51	-
ของแข็งทั้งหมด	-	-	38,180 มก./ล
ไนโตรเจน	1.22	2.13	0.06
ฟอสฟอรัส	0.18	0.21	0.02
โพแทสเซียม	1.12	1.61	0.23
โซเดียม	0.01	0.02	0.003
แคลเซียม	0.35	1.09	0.03
แมกนีเซียม	0.31	0.40	0.05
เหล็ก	0.25	0.25	0.01
ทองแดง	0.0026	0.0052	0.00006

*ค่า oil & grease เท่ากับ 4,050 มก/ล.

**อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง)

และทองแดง ร้อยละ 1.22, 0.18, 1.12, 0.01, 0.35, 0.31, 0.25 และ 0.0026 ตามลำดับ ค่าฟอสฟอรัสต่ำกว่าผลของสมพงษ์ เทศประสิทธิ์ (2526) (ร้อยละ 0.32) ในขณะที่แคลเซียมมีปริมาณสูงกว่า (ร้อยละ 0.25) แต่มีปริมาณเพียงครึ่งหนึ่งของค่าที่ได้จากรายงานของจรัญ จันทลักขณา (2526) (ร้อยละ 0.75)

ส่วนกากสลัดจ์ประกอบด้วย ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, โซเดียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม, เหล็กและทองแดง ร้อยละ 2.13, 0.21, 1.61, 0.02, 1.09, 0.40, 0.25 และ 0.0052 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณโพแทสเซียม และแมกนีเซียม มีค่าต่ำกว่าที่ Muthuajah (1976 อ้างโดย Hwang, *et al.*, 1978) และ Hwang, *et al.* (1978) รายงานไว้คือ ปริมาณโพแทสเซียม ร้อยละ 3.96 และ 3.10 ตามลำดับ และปริมาณแมกนีเซียมร้อยละ 1.04 และ 1.88 ตามลำดับ ส่วนปริมาณแคลเซียมสูงกว่าที่พานิช ทินนิมิตร (2535), Rajagopalan, *et al.* (1975), Webb, *et al.* (1977), Muthujah (1976), Rajagopalan และ Webb (1975) และ Hwang, *et al.* (1978) รายงานไว้ร้อยละ 0.28, 0.75, 0.50, 0.42, 0.78, และ 0.21 ตามลำดับ เหล็กมีปริมาณสูงกว่าที่ Hwang และคณะ (1978) รายงานไว้ร้อยละ 0.25 เท่านั้น และทองแดง พบว่า มีค่าสูงกว่าที่ Rajagopalan, *et al.* (1975 อ้างโดย Hwang, *et al.*, 1978) และ Rajagopalan และ Webb (1975) รายงานไว้ร้อยละ 0.002 และ 0.003 ตามลำดับ แต่มีค่าต่ำกว่าที่ Hwang, *et al.* (1978) รายงานไว้ร้อยละ 0.05

น้ำทิ้งรวม ประกอบด้วย ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, โซเดียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม, เหล็กและทองแดง ร้อยละ 0.06, 0.02, 0.23, 0.003, 0.03, 0.05, 0.01 และ 0.00006 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าที่ต่ำกว่าที่ Okiy (1987 อ้างโดย อารี กังแฮ, 2536) รายงานไว้ คือ มีฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม, โซเดียม, แคลเซียม และแมกนีเซียม ร้อยละ 0.24, 0.99, 0.08, 0.97 และ 0.30 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุจากวัสดุเศษเหลือทั้ง 3 ชนิด ของโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่า กากสลัดจ์ มีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและทองแดง มากกว่ากากปาล์มและน้ำทิ้งรวม ตามลำดับ ปริมาณไนโตรเจนที่มากกว่าสอดคล้องกับค่าโปรตีนซึ่งมีมากที่สุดในกากสลัดจ์เช่นกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำวัสดุเศษเหลือจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ใน

การใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 เพื่อผลิตเอนไซม์

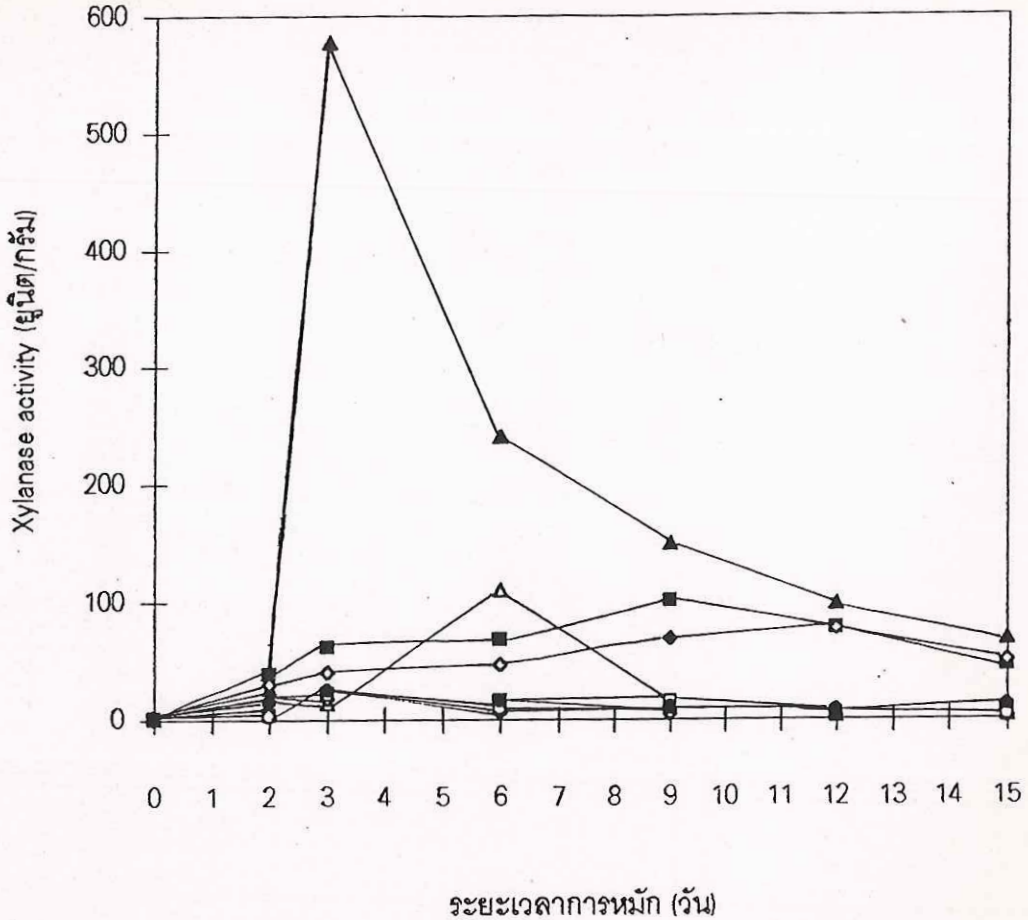
2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275

2.1 ผลของชนิดและแหล่งของสารอาหาร

ผลของการเลี้ยง *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 สูตรต่อการผลิตเอนไซม์ เพื่อเปรียบเทียบการใช้กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 12, 13) พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ซึ่งประกอบด้วยกากปาล์มและกลูโคส (ร้อยละ 0.2) เป็นแหล่งคาร์บอน และมียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อให้แอคทิวิตี้ของไซลาเนสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 576 ยูนิต/กรัม ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) คิดเป็นปริมาณที่สูงกว่าสูตร 1 และสูตร 5 เท่ากับ 5 และ 33 เท่า ตามลำดับ ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสจากการทดลองนี้ใกล้เคียงกับผลการเลี้ยง *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F ในฟางข้าว ซึ่งให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสเท่ากับ 540 ยูนิต/กรัมวัสดุหมัก ในวันที่ 4 ของการหมัก (วิเชียร สีสุข, 2532) ค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของ CMCase ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ที่มีองค์ประกอบต่างๆ เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่มีกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกากปาล์มค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุดเท่ากับ 14.42 ยูนิต/กรัม ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน ซึ่งสูงกว่าค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของ CMCase ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 (11.40 ยูนิต/กรัม หลังการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน) และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ค่าแอคทิวิตี้ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 101.06 ยูนิต/กรัม ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ CMCase คือ สูตร 2 และสูตร 4 โดยมีกากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นสับสเตรท ตามลำดับ ทั้งสองสูตรมีการเติมสารอาหารแร่ธาตุเดียวกัน (ประกอบด้วย กลูโคส และยูเรีย) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการวิจัยของอารี กังแฮ (2536) ค่าแอคทิวิตี้ไซลาเนสและ CMCase ที่ได้นี้จะสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (สูตร 1 และสูตร 3 ซึ่งประกอบด้วย โพลี-เปปโตน ยีสต์สกัด กลูโคส และโปรตีโอสเปปโตน) ดังรูปที่ 14 และ 15

เมื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมของการใช้กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นแหล่ง



รูปที่ 12 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)

—Δ— สูตร 1 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05, และน้ำกลั่น

—▲— สูตร 2 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

—□— สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

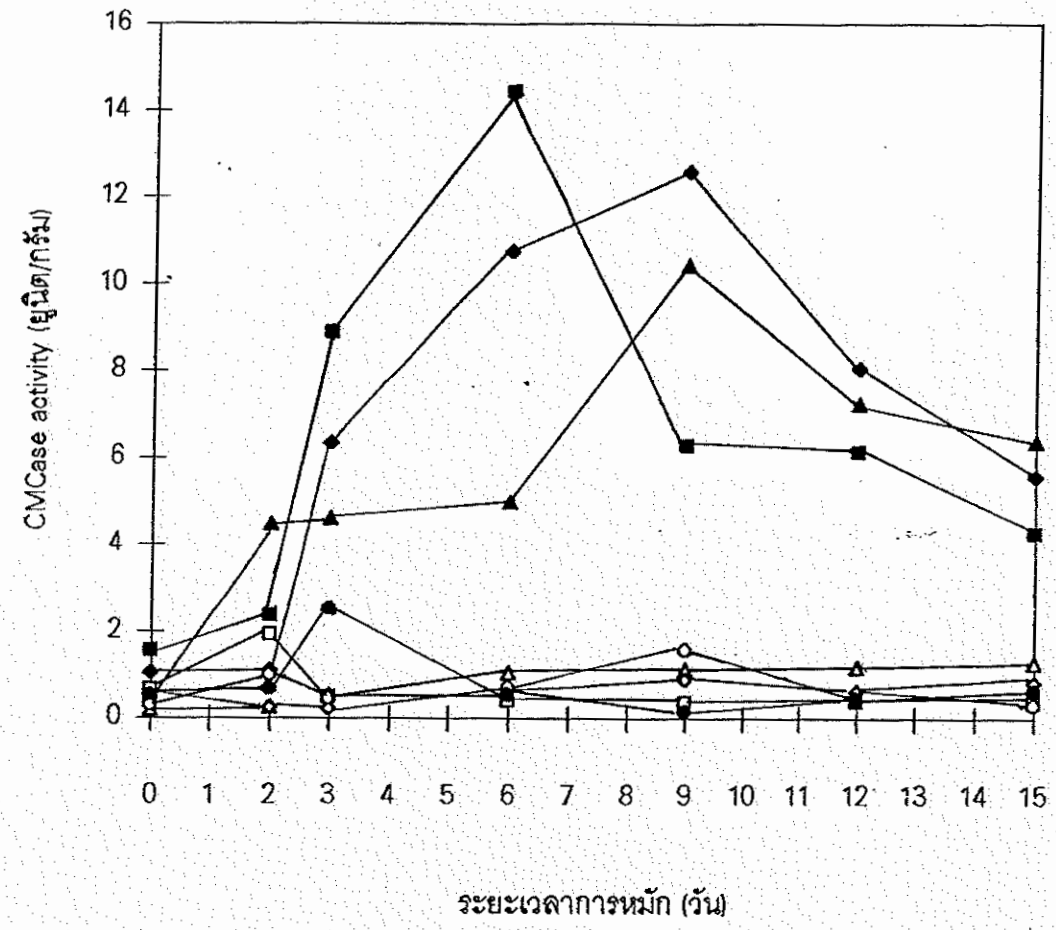
—■— สูตร 4 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—◇— สูตร 5 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—◆— สูตร 6 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—○— สูตร 7 กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

—●— สูตร 8 กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม



รูปที่ 13 การผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)

—Δ— สูตร 1 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำกลั่น

—▲— สูตร 2 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

—□— สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

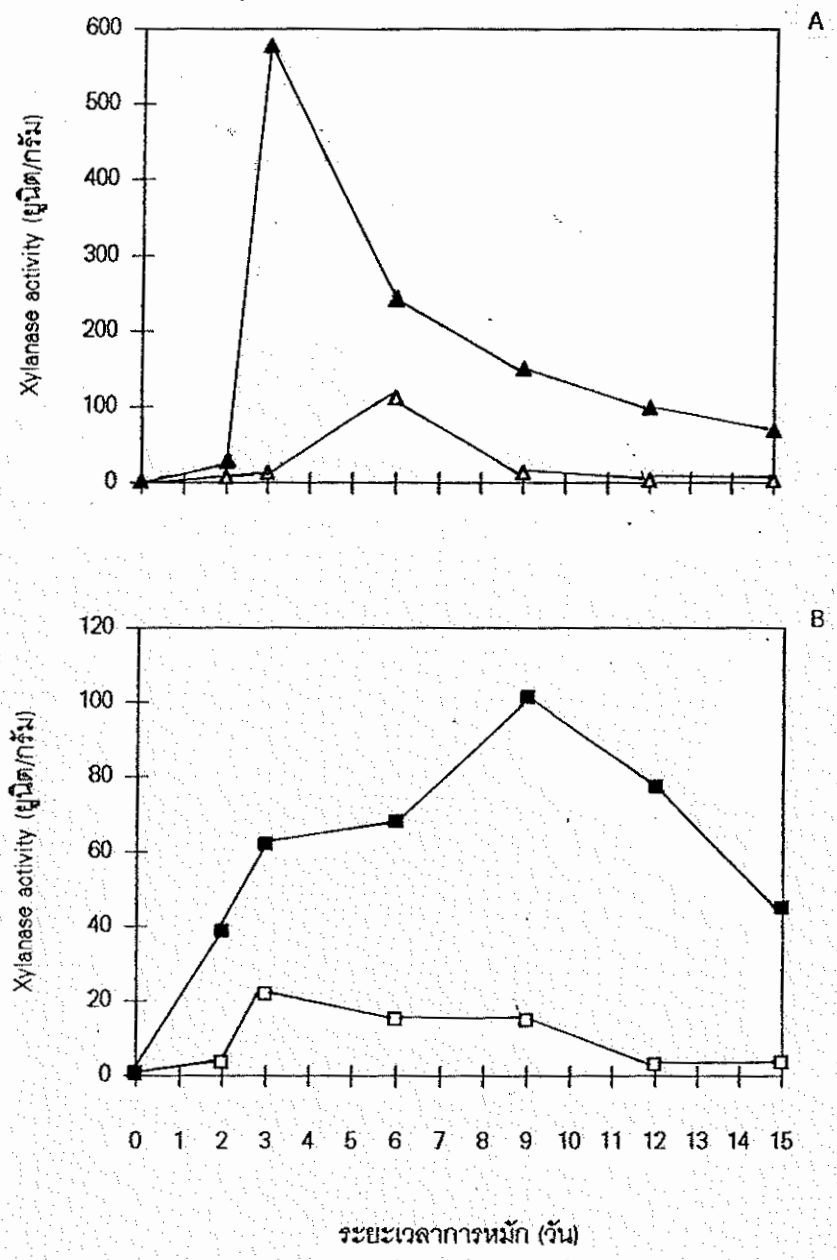
—■— สูตร 4 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—◇— สูตร 5 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—◆— สูตร 6 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—○— สูตร 7 กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

—●— สูตร 8 กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม



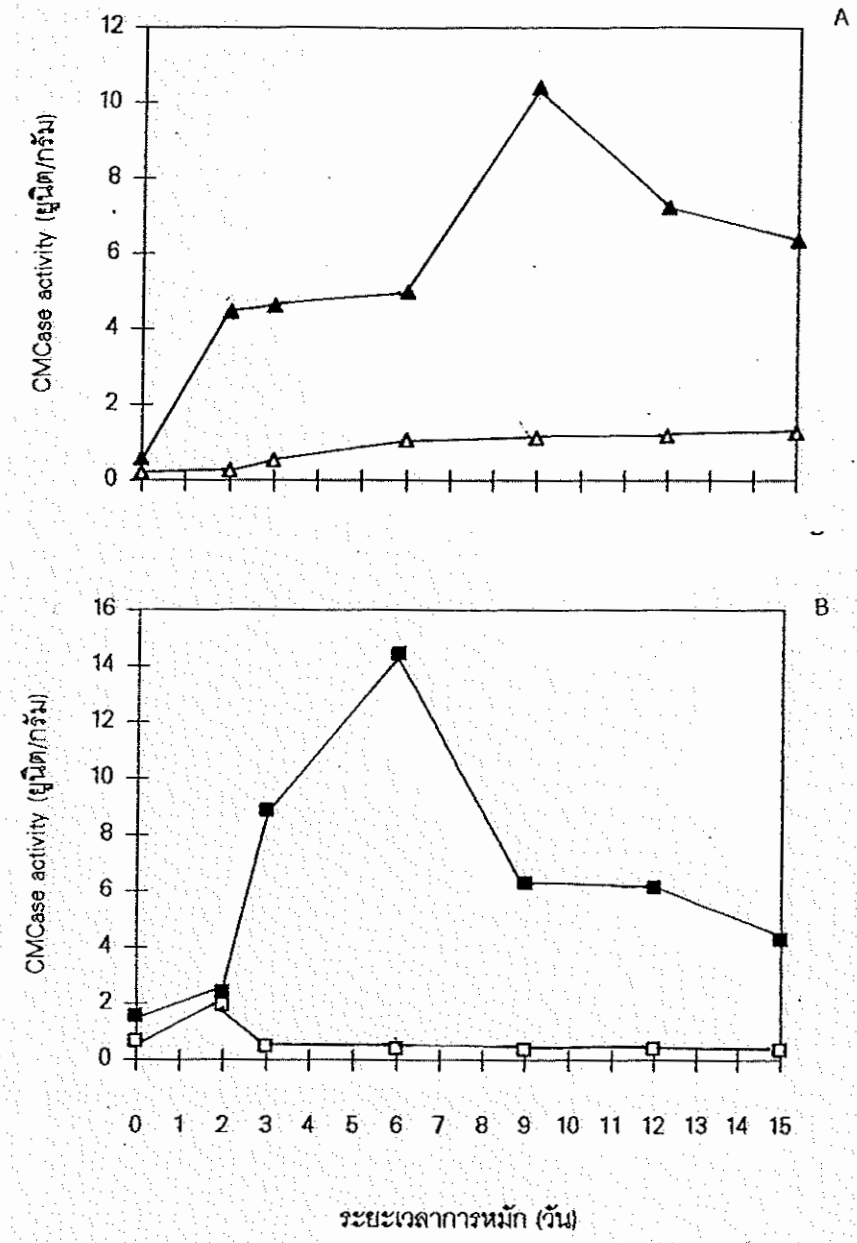
รูปที่ 14 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 1 และ2 (B) สูตร 3 และ 4 ที่อุณหภูมิห้อง(27±3 องศาเซลเซียส)

—Δ— สูตร 1 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำกลั่น

—▲— สูตร 2 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

—□— สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—■— สูตร 4 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม



รูปที่ 15 การผลิตเอนไซม์ CMCaseจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 1 และ2 (B) สูตร 3 และ 4 ที่อุณหภูมิห้อง(27±3 องศาเซลเซียส)

—Δ— สูตร 1 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำกลั่น

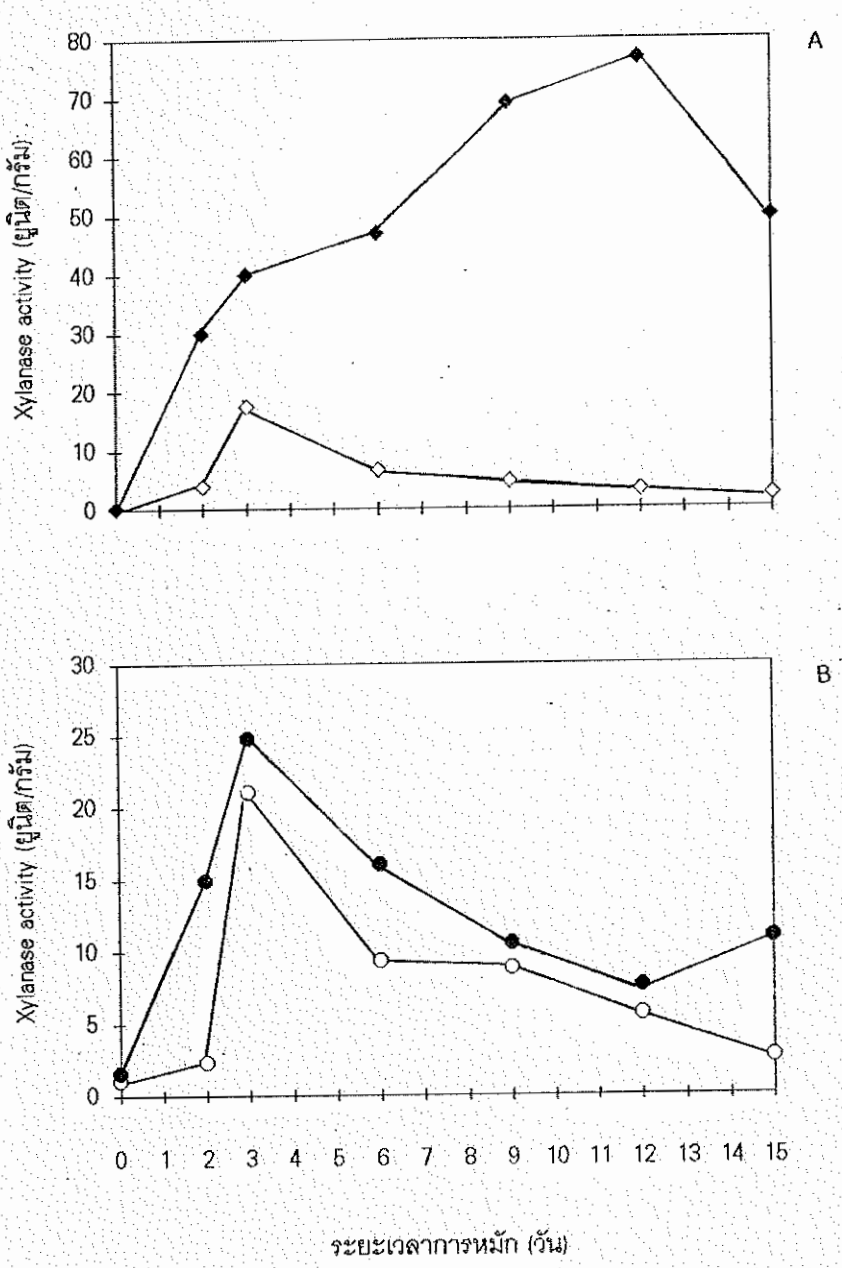
—▲— สูตร 2 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

—□— สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—■— สูตร 4 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

คาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4) พบว่า กากปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่าสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อให้ค่าแอคทิวิตี้สูงกว่า 5 เท่า แต่กากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่าสำหรับการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยมีการผลิตสูงขึ้นมากเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 3 วัน และให้ค่าแอคทิวิตี้สูงสุดของ CMCase ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งระยะเวลาการผลิตจะลดลง 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กากปาล์ม การที่กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลาเนสและ CMCase ตามลำดับนั้นอาจเนื่องจากกากปาล์มเป็นวัสดุเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการหีบน้ำมันผสม ซึ่งเป็นกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์มทั้งผล (สกัดแบบแห้ง) จึงประกอบด้วยเปลือกนอก กะลา และเนื้อในของเมล็ด ทำให้มีเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในปริมาณเท่าๆกัน แต่กากสลัดจ์ได้จากกระบวนการหีบน้ำมันแบบมาตรฐาน (สกัดแบบเปียก) ซึ่งผ่านกระบวนการต่างๆมีผลต่อปริมาณและคุณลักษณะขององค์ประกอบ เช่น การอบด้วยไอน้ำมีผลให้เฮมิเซลลูโลสละลายออกมาหลังการนึ่ง (Pamment, *et al.*, 1978) เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสจะเป็นองค์ประกอบแรกที่ถูกสกัดออกจากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลส (Saddler, *et al.*, 1983) การย่อยผลปาล์ม หีบน้ำมันปาล์มและการกรองน้ำมัน ทำให้ได้เศษเส้นใยซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลสและมีเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่าในกากปาล์ม *A. niger* ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสก่อนเอนไซม์ CMCase เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่ย่อยได้ง่ายกว่าเซลลูโลส (Chahal, 1986) และไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสจะขัดขวางการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Gamerith, *et al.* ,1992)

ผลของการใช้น้ำทิ้งรวมของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปรับความชื้นแทนการใช้น้ำกลั่น โดยเติมสารอาหารแร่ธาตุ (สูตร 5 และ 6) และไม่เติมสารอาหารแร่ธาตุใดๆ (สูตร 7 และ 8) (รูปที่ 16,17) พบว่า ในกรณีที่เติมสารอาหารแร่ธาตุ การเลี้ยงเชื้อในสูตร 6 ที่มีองค์ประกอบของสูตรเช่นเดียวกับสูตร 2 จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสและ CMCase สูงกว่าสูตร 5 ที่มีองค์ประกอบของสูตรเช่นเดียวกับสูตร 1 (สูตรเดิม) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้การไม่เติมสารอาหารอื่นและปรับความชื้นด้วยน้ำทิ้งรวม พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 8 ที่มีกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 7 ที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน



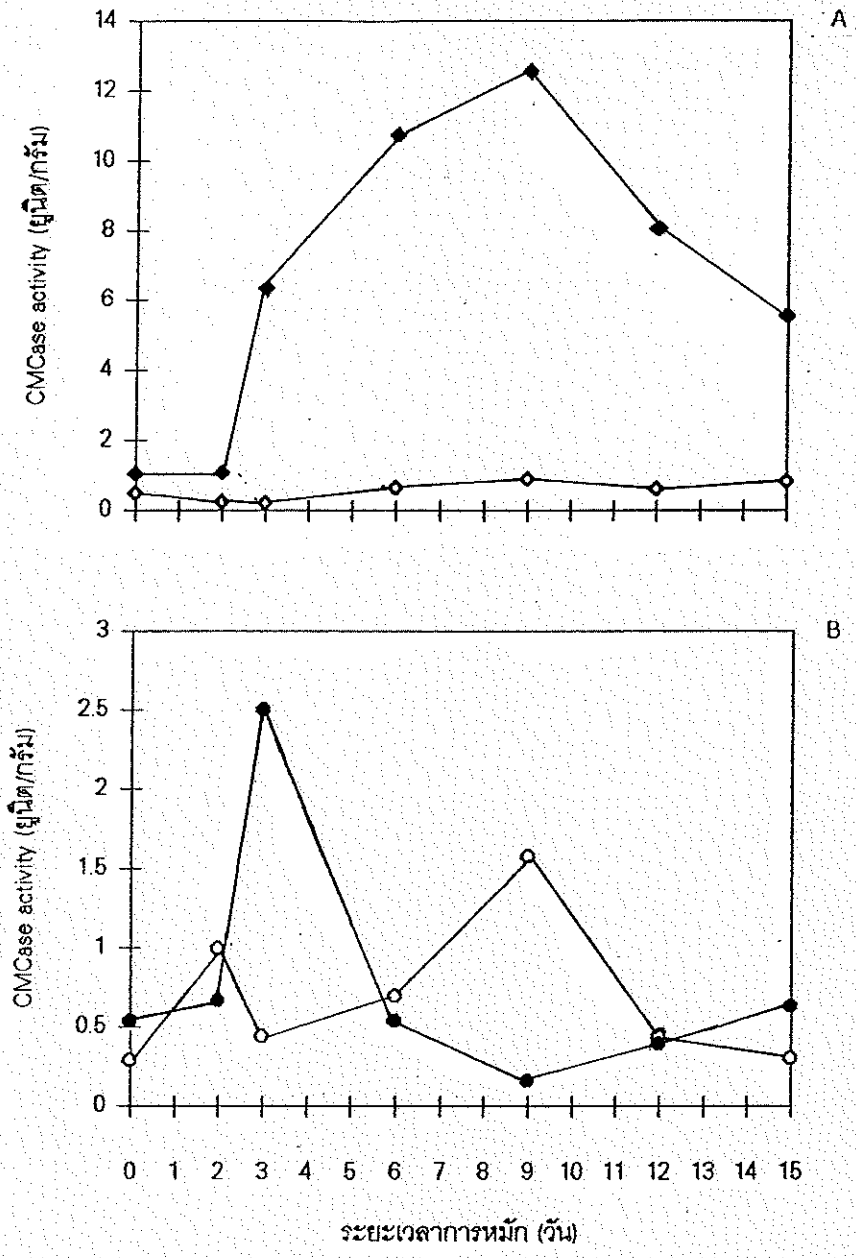
รูปที่ 16 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 5 และ 6 (B) สูตร 7 และ 8 ที่อุณหภูมิห้อง (27±3 องศาเซลเซียส)

—◊— สูตร 5 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำทิ้งรวม

—◆— สูตร 6 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำทิ้งรวม

—○— สูตร 7 กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

—●— สูตร 8 กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม



รูปที่ 17 การผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (A) สูตร 5 และ 6 (B) สูตร 7 และ 8 ที่อุณหภูมิห้อง(27±3 องศาเซลเซียส)

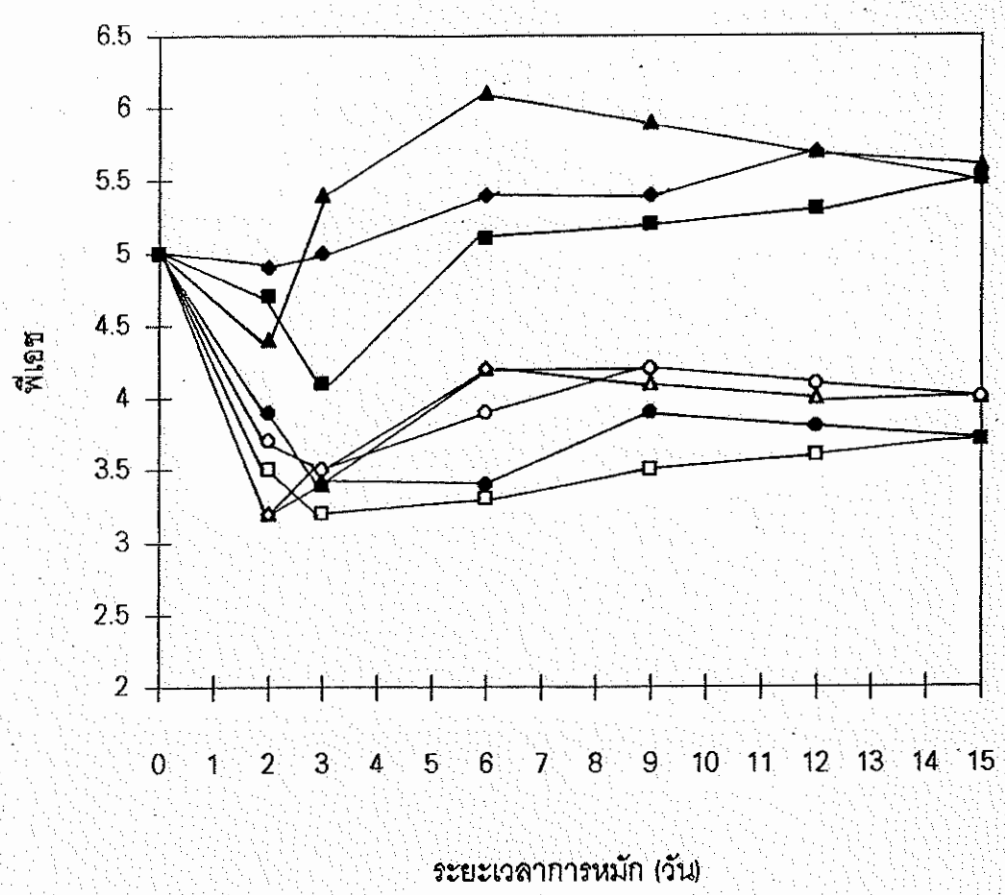
—◇— สูตร 5 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำทิ้งรวม

—◆— สูตร 6 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำทิ้งรวม

—○— สูตร 7 กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

—●— สูตร 8 กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

แต่แอคทิวิตี้ของไซลาเนสและ CMCase (สูตร 7 เท่ากับ 21.02 และ 1.57 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ และสูตร 8 เท่ากับ 24.79 และ 2.50 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ) ที่ได้น้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สารอาหารในน้ำทิ้งรวมมีปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของเชื้อ หรือเป็นผลมาจากปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งรวมที่มีอยู่มากกว่าปริมาณในกากปาล์มและกากสลัดจ์ ซึ่งอาจมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ในระหว่างการเลี้ยง *A. niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (รูปที่ 18) โดยในช่วง 3 วันแรกของการเลี้ยง พีเอชจะลดลงจาก 5.0 เป็น 3.2-4.9 จากนั้นพีเอชจะเพิ่มขึ้น ซึ่งเนื่องจากมีการสูญเสียโปรตีนเมื่อไมซี-เลียมเกิดการสลายตัวเอง (autolysis) (Deschamps, *et al.*, 1985) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 พีเอชลดลงเป็น 4.5 ในเวลา 2 วัน และเพิ่มขึ้นเป็นพีเอช 6.1 หลังการเลี้ยง 6 วัน การทดลองนี้จะให้ผลทำนองเดียวกับการเจริญของเชื้อ *Trichoderma aureoviride* บน beet pulp แบบอาหารแข็ง ซึ่งช่วงแรกของการเลี้ยงพีเอชลดลงจาก 5.0 เป็น 3.5 ต่อมาจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งพีเอช 6.1 (Illanes, *et al.*, 1992) ส่วนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 และ 6 พีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นๆ พีเอชอยู่ในช่วง 3.7-5.5 หากพีเอชของอาหารมีสภาพค่อนไปทางด่างจะเป็นสาเหตุให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสลดลง ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมของ *A. niger* NCIM 1207 ในการผลิตเซลลูเลสอยู่ระหว่าง 3.0-5.5 (Gokhle, *et al.*, 1990) ในการทดลองขั้นต่อไปเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4 เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ CMCase ที่มีค่าแอคทิวิตี้สูงสุดตามลำดับ



รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติกบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

—Δ— สูตร 1 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, โพลีเปปโตนร้อยละ 0.1, โปรตีโอสเปปโตนร้อยละ 0.05, ยีสต์สกัดร้อยละ 0.05 และน้ำกลั่น

—▲— สูตร 2 กากปาล์ม 5 กรัม, กลูโคสร้อยละ 0.2, ยูเรียร้อยละ 2.0 และน้ำกลั่น

—□— สูตร 3 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—■— สูตร 4 เช่นเดียงกับสูตร 2 แต่ใช้กากสลัดจ์แทนกากปาล์ม

—◇— สูตร 5 เช่นเดียวกับสูตร 1 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—◆— สูตร 6 เช่นเดียวกับสูตร 2 แต่ใช้น้ำทิ้งรวมแทนน้ำกลั่น

—○— สูตร 7 กากปาล์ม 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

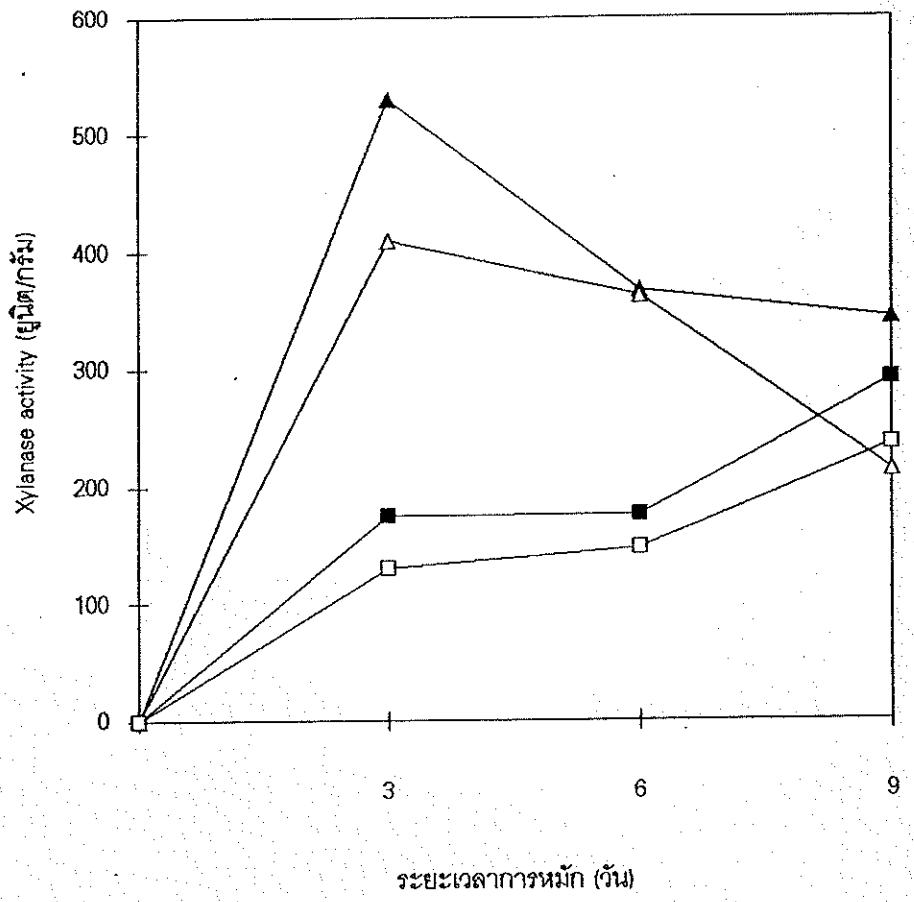
—●— สูตร 8 กากสลัดจ์ 5 กรัม และน้ำทิ้งรวม

2.2 ผลของการให้อากาศที่มีความชื้น

ผลของการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร ที่คัดเลือกไว้ (สูตร 2 และ 4) ในตู้บ่มที่ให้อากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 และควบคุมอุณหภูมิ (32± 2 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 พบว่า ในสูตรอาหารที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) การเลี้ยงเชื้อสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนส (530 ยูนิต/กรัม) สูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงในตู้บ่มที่มีการให้อากาศชื้น (409 ยูนิต/กรัม) อย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 19) ส่วนการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 4) การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องและในตู้บ่มที่ให้อากาศชื้น เชื้อให้แอคทิวิตี้ของไซลาเนส เท่ากับ 290 และ 235 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ หลังการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน และพีเอชจะเพิ่มขึ้นในช่วง 3 ถึง 6 วันของการหมัก ทั้งการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและในตู้บ่มที่ให้อากาศชื้น โดย 3 วันแรกของพีเอชที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในตู้บ่ม (พีเอช 6.2) สูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (พีเอช 5.35) และหลังจากนั้นพีเอชจะลดลง (รูปที่ 20)

ส่วนแอคทิวิตี้ของ CMCase จากการเลี้ยงเชื้อในสูตร 2 (รูปที่ 21) พบว่า การเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเชื้อให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงกว่าการเลี้ยงในตู้บ่มที่ให้อากาศชื้นหลังการเลี้ยง 9 วันโดย มีค่าเท่ากับ 17.5 และ 16.4 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 พบว่า ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องมีค่าสูงสุด (20.3 ยูนิต/กรัม) หลังการเลี้ยงเชื้อเพียง 6 วัน ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตจะสั้นลง 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับค่าสูงสุดที่จะได้จากการเลี้ยงในตู้บ่มและการใช้อาหารสูตร 2 ซึ่งกินเวลา 9 วัน

จากการทดลองนี้จะเห็นว่า กากปาล์ม (สูตร 2) เป็นสับสเตรทที่ดีในการผลิตไซลาเนส ส่วนกากสลัดจ์ (สูตร 4) เป็นสับสเตรทที่ดีกว่าในการผลิต CMCase โดยให้ค่าแอคทิวิตี้สูงกว่า และร่นระยะเวลาลงเหลือ 6 วัน (จาก 9 วันที่ใช้กากปาล์ม) การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องมีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองสูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่มีความชื้น อาจเนื่องจากอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 มีความ



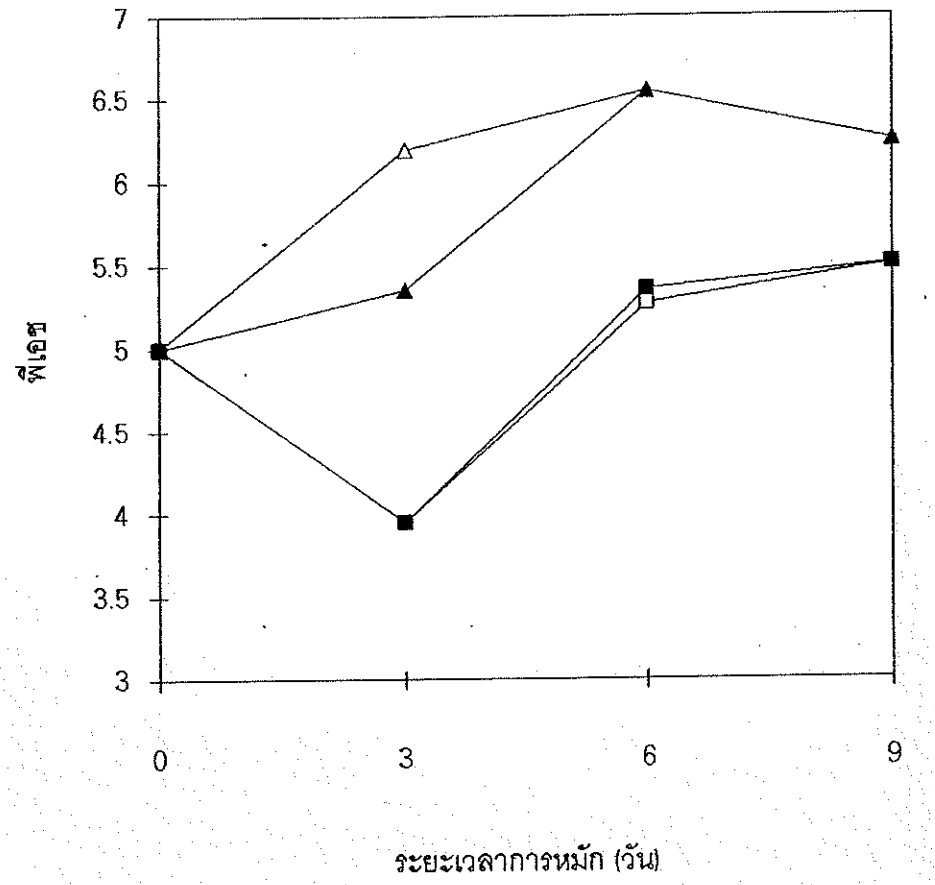
รูปที่ 19 ผลของการบ่มเชื้อภายใต้สภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ 100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์ม (สูตร 2) และกากสลัดจ์ (สูตร 4) เป็นแหล่งคาร์บอน

—▲— สูตร 2 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—Δ— สูตร 2 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)

—■— สูตร 4 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—□— สูตร 4 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)



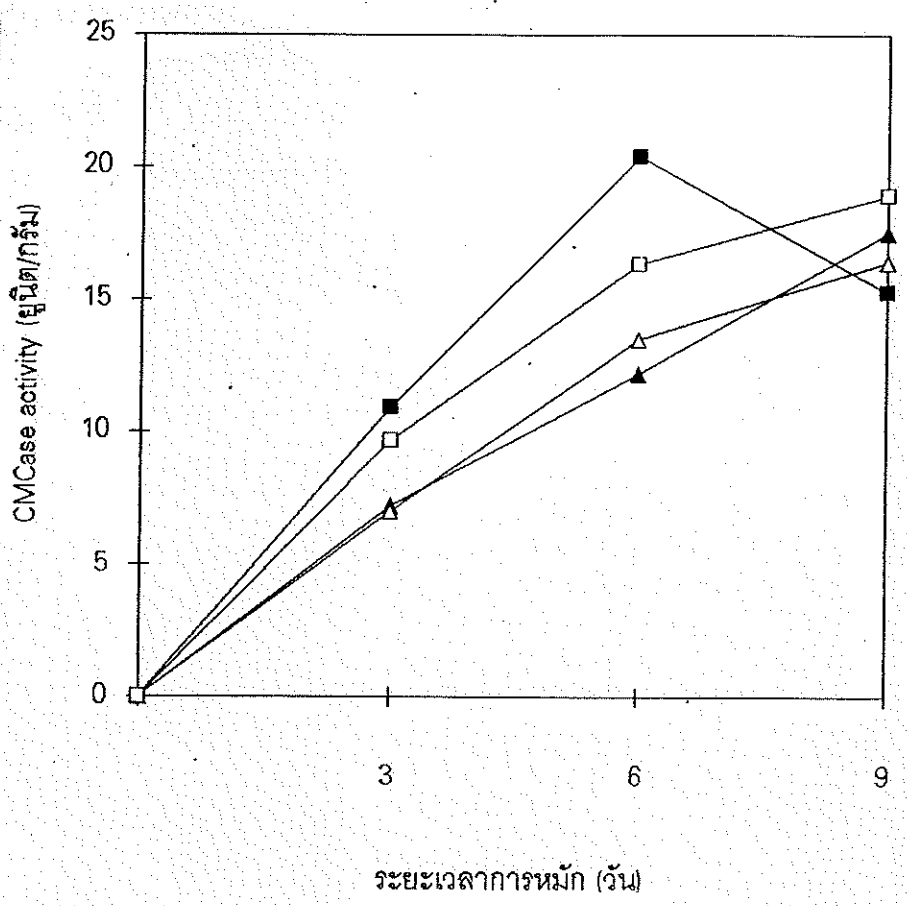
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติกบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2และ 4 บ่มภายใต้ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ 100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง

—▲— สูตร 2 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—Δ— สูตร 2 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)

—■— สูตร 4 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—□— สูตร 4 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)



รูปที่ 21 ผลของการบ่มเชื้อภายใต้สภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (ร้อยละ 100) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์ม (สูตร 2) และกากสลัดจ์ (สูตร 4) เป็นแหล่งคาร์บอน

—▲— สูตร 2 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—Δ— สูตร 2 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)

—■— สูตร 4 อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85)

—□— สูตร 4 ตู้บ่ม (32±2 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100)

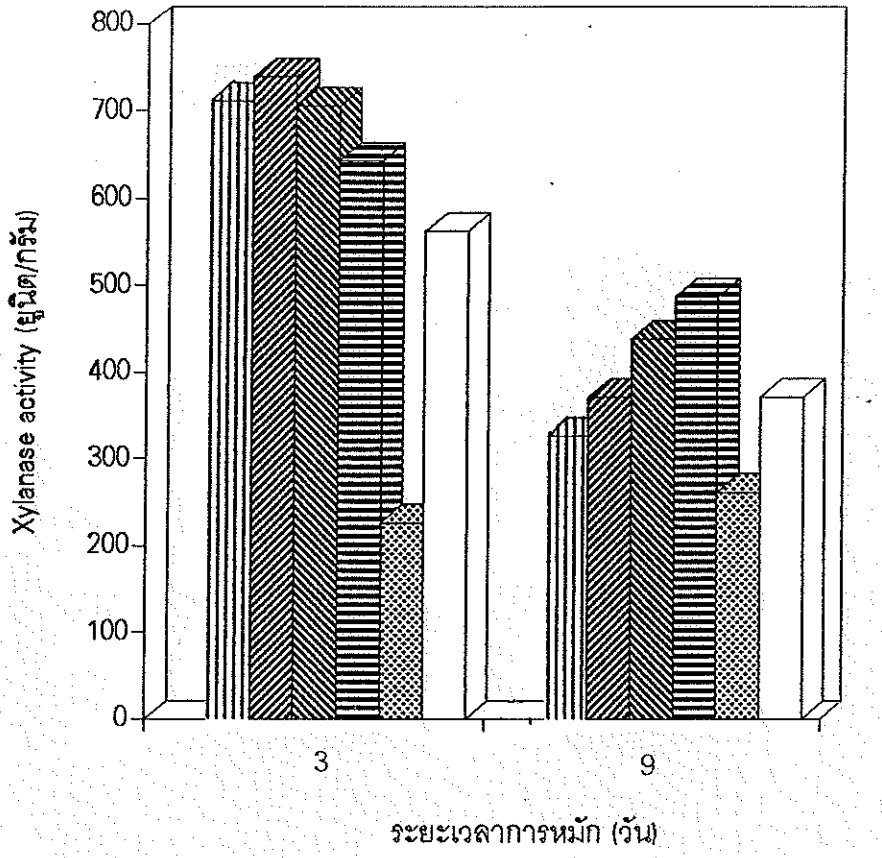
เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์มากกว่าเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 100 จากการสังเกตการเจริญของเชื้อในการเลี้ยงในตู้บ่มที่ให้อากาศชื้น พบว่า เชื้อเจริญไมซีเลียมมีสีขาวและสร้างสปอร์ช้ากว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 วัน อาจเนื่องจากเชื้อราต้องการสภาพความชื้นต่ำเพื่อสร้างสปอร์มากกว่าสภาพที่มีความชื้นสูง (Nishio and Nagai, 1981) การทดลองนี้แตกต่างจากการผลิตเอนไซม์ CMCase จากเชื้อ *T. reesei* QM 9414 ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลีในตู้บ่ม พบว่า การให้อากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 แก่สับสเตรทในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อทำให้ได้ค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงกว่าการไม่ให้อากาศที่มีความชื้น หรือการให้อากาศในวันที่ 2 และวันที่ 3 (Wijeyaratne, *et al.*, 1979) และความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศอาจมีความสัมพันธ์กับความชื้นของสับสเตรท ซึ่งระดับความชื้นของสับสเตรทมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อความชื้นสุดท้ายของสับสเตรทในการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4 เท่ากับร้อยละ 58.3 และ 65.1 ตามลำดับ ส่วนความชื้นสุดท้ายของสับสเตรทในสภาวะการเลี้ยงในตู้บ่มที่ให้อากาศชื้น ร้อยละ 59.8 และ 66.1 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงจะควบคุมความชื้นของสับสเตรทให้คงที่ได้ยาก และค่าความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์อาจแตกต่างกัน เช่น การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* WO 3 ต้องการ ความชื้นที่ต่ำกว่าความชื้นสำหรับการเจริญของเชื้อ จึงมีการลดความชื้นในระยะ stationary phase (Koyama, *et al.*, 1979) *Trichoderma reesei* QM 9414 และ *Sporotrichum cellulophilum*n การเจริญของเชื้อจะสูงสุดเมื่อความชื้นของสับสเตรทร้อยละ 60 และ 70 ตามลำดับ แต่การผลิตเอนไซม์จะสูงสุดเมื่อความชื้นร้อยละ 47 และ 49 ตามลำดับ (Kim, *et al.*, 1985)

เนื่องจากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้สูงและเจริญได้ดีบนกากปาล์ม และค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสที่ได้สูงกว่าค่า CMCase มาก การทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ในสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง

2.3 ผลการเลี้ยงเชื้อในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ

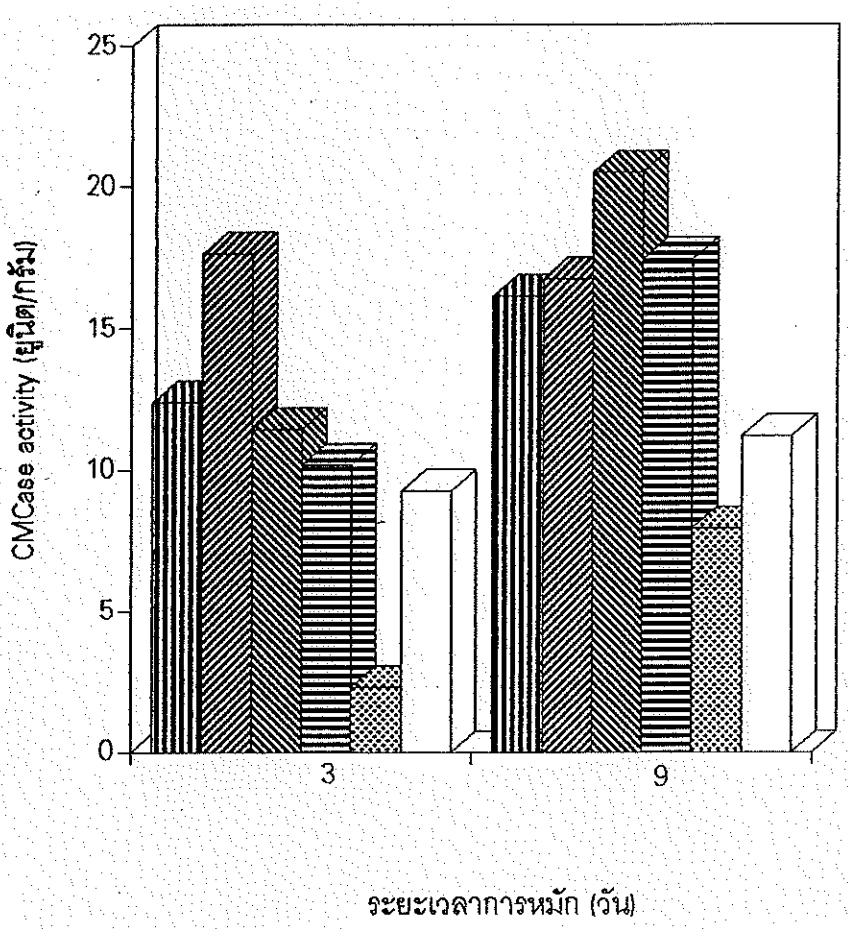
เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ในฟลาสก์ 2 ขนาด (250 และ 1,000 มล.), ถุงพลาสติก 2 ขนาด (6x8 นิ้ว และ 20x30 นิ้ว), กระด้ง และคอลัมน์ (รูปที่ 22, 23) พบว่า แอคทิวิตี้ของไซลาเนสที่ได้จากการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาดใหญ่มีค่าสูงสุดเท่ากับ 739 ยูนิต/กรัม หลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้ออื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (ภาคผนวก ค) รองลงมาคือ การเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาดเล็ก (710 ยูนิต/กรัม), ถุงพลาสติก ขนาดเล็ก (705 ยูนิต/กรัม), ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ (642 ยูนิต/ กรัม), คอลัมน์ (562 ยูนิต/กรัม) และกระด้ง (226 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแอคทิวิตี้ของไซลาเนสที่ได้จากการเลี้ยงในฟลาสก์ขนาดเล็กและถุงพลาสติกทั้ง 2 ขนาดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase พบว่า การเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติกขนาดเล็ก ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 20 ยูนิต/กรัม หลังการเลี้ยงเชื้อ 9 วัน ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้ออื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ ในฟลาสก์ขนาดใหญ่ (17.65 ยูนิต/กรัม หลังการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน), ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ (17.46 ยูนิต/กรัม), ฟลาสก์ขนาดเล็ก (16.18 ยูนิต/กรัม), คอลัมน์ (11.21 ยูนิต/กรัม) และกระด้ง (7.92 ยูนิต/กรัม) ตามลำดับ การเลี้ยงในฟลาสก์ทั้ง 2 ขนาดและถุงพลาสติกขนาดใหญ่ให้แอคทิวิตี้ของ CMCase ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในถุงพลาสติก 2 ขนาด พบว่า แอคทิวิตี้ไซลาเนสและ CMCase ในถุงพลาสติกขนาดเล็กมีค่าสูงกว่า อาจเนื่องจากการเลี้ยงในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ใช้ปริมาณสับสเตรทมากกว่าถุงพลาสติกขนาดเล็ก (สัดส่วน 60 ต่อ 1) จึงทำให้สับสเตรทมีความหนามากขึ้น (ประมาณ 0.2 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งความหนาของสับสเตรทมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ (Ahchara, *et al.*, 1985) สำหรับการใช้กระด้ง พบว่า เชื้อผลิตเอนไซม์ต่ำสุด อาจเนื่องจากผลของพีเอช โดยพีเอชมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 4.1 และเนื่องจากมีการสูญเสียความชื้นมาก ทำให้สับสเตรทมีลักษณะแห้งจึงเป็นการจำกัดการเจริญและเมตาบอลิซึมของเชื้อ (Oriol, *et al.*, 1988) และไมซีเลียมของเชื้อบนผิวของสับสเตรทไม่สม่ำเสมอ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pamment และคณะ (1978) ที่เลี้ยงเชื้อ *Chaetomium*



รูปที่ 22 ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง

- ฟลาสก์ ขนาด 250 มล.
- ฟลาสก์ ขนาด 1,000 มล.
- ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว
- ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว
- กระด้ง
- คอลัมน์



รูปที่ 23 ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ CMCase จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง

- ฟลาสก์ ขนาด 250 มล.
- ฟลาสก์ ขนาด 1,000 มล.
- ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว
- ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว
- กระด้ง
- คอลัมน์

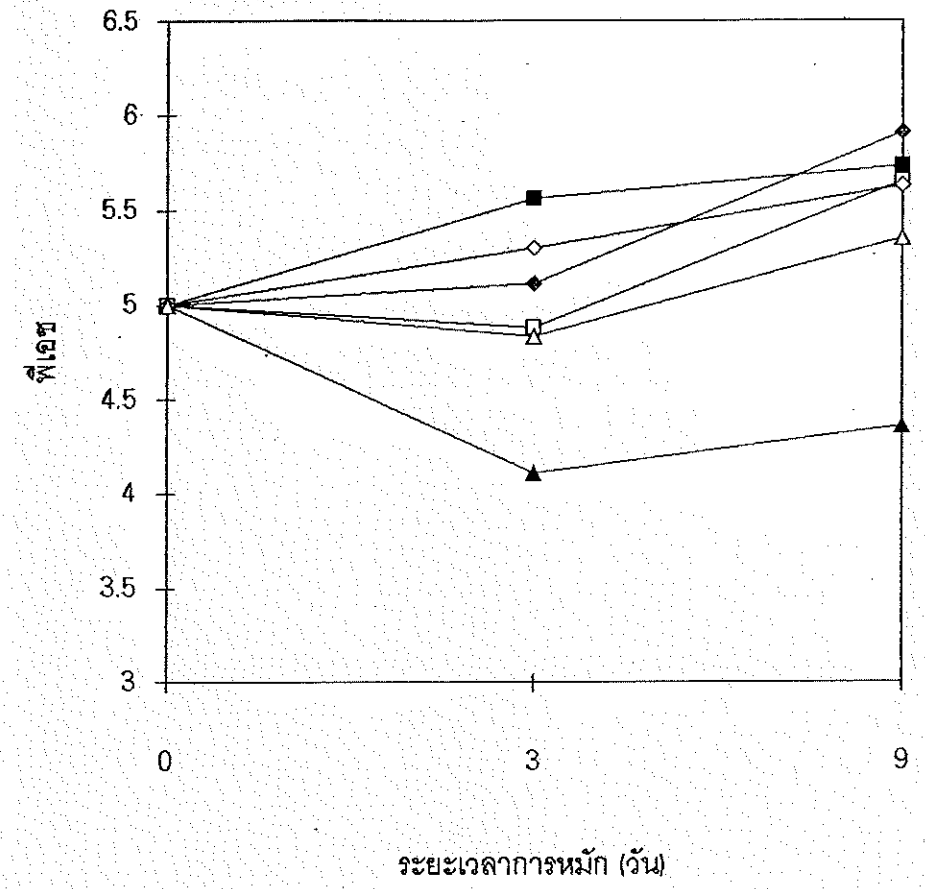
cellulolyticum ATCC 32319 แบบอาหารแข็งในถาด นอกจากนี้อาจเป็นผลจากการมีค่าพีเอชที่ต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบอื่นๆ โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.11 และ 4.36 ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 3 และ 9 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 24) ส่วนการเลี้ยงในคอลัมน์ พบว่า การเจริญของเชื้อไม่สม่ำเสมอโดยด้านบนเชื้อเจริญน้อยและสร้างสปอร์ช้ากว่าด้านล่างของคอลัมน์ เนื่องจากสับสเตรทด้านบนมีลักษณะแห้งกว่าด้านล่างซึ่งเกิดจากความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเชื้อ เมื่อให้อากาศเข้าไปในคอลัมน์อากาศจะพาความร้อนออกไปทำให้สับสเตรทสูญเสียความชื้น จึงควรให้อากาศที่มีความชื้นระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อเจริญได้เร็วขึ้นและเจริญพร้อมกันในทุกส่วนของคอลัมน์ (Lllanes, *et al.*, 1992, Alazard and Raimbault, 1981)

3. การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275

สารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและ dialysis มีโปรตีน 9.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนสและ CMCase เท่ากับ 291 และ 2.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

3.1 การใช้เอนไซม์แยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผลของการใช้สารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 เจือจาง 1 เท่า และเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ Meicellase และ Sumyzyme ที่มีแอคทิวิตี้ของไซลาเนส เท่ากับ 162.7, 170.2 และ 159 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และของ CMCase เท่ากับ 0.9, 40.6 และ 2.53 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งของเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (ตารางที่ 13 และ 14) พบว่า การใช้เอนไซม์จาก *A. niger* และเอนไซม์ทางการค้า ทำให้สารแขวนลอยในน้ำทิ้งเริ่มรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ และส่วนกลางของปริมาตรน้ำทิ้งในกระบอกตวงเริ่มมีส่วนที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลใสเกิดขึ้น หลังจากการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และในเวลา 60, 90 และ 120 นาที ส่วนของเหลวสีน้ำตาลใสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน (19 ชม.)พบว่า การใช้เอนไซม์สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งได้(รูปที่ 25) โดย



รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยง *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (สูตร 2) ที่อุณหภูมิห้อง ในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ

—◆— ฟลาสก์ ขนาด 250 มล.

—□— ฟลาสก์ ขนาด 1,000 มล.

—■— ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว

—◊— ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว

—▲— กระด้ง

—Δ— คอลัมน์

ตารางที่ 12 ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซลาเนสและ CMCase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 เป็นเวลา 3 วัน อุณหภูมิห้อง

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Yield (%)	Purification factor	Remark
Crude enzyme	3,500	5.33	32.99	6.18	115,465	100	1.00	Xylanase
			1.71	0.32	5,985	100	1.00	CMCase
Dialysis	350	9.96	291.01	29.21	101,853.5	88.21	4.72	Xylanase
			2.35	0.23	822.5	13.74	0.74	CMCase

ตารางที่ 13 ลักษณะการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า* บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ชุดควบคุม	เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275	Meicellase	Sunyzyme
30	- ของเหลวสีน้ำตาลขุ่นอยู่ด้านบน (6.4 มล.) - ตะกอนหนัก (43.6 มล.)	สารแขวนลอยรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ	- สารแขวนลอยรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ - ส่วนกลางของปริมาตรน้ำทิ้งมีของเหลวสีน้ำตาลใส 5 มล.	- สารแขวนลอยรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ - ส่วนกลางของปริมาตรน้ำทิ้งมีของเหลวสีน้ำตาลขุ่น 6.5 มล.
60	- ของเหลวสีน้ำตาลขุ่นอยู่ด้านบน (8 มล.) - ตะกอนหนัก (42 มล.)	- สารแขวนลอยรวมเป็นกลุ่มในลักษณะตะกอนเบา (30 มล.) และตะกอนหนัก (18 มล.) - ส่วนกลางของปริมาตรน้ำทิ้งมีของเหลวสีน้ำตาลใส 2 มล.	- สารแขวนลอยรวมกันในลักษณะตะกอนเบา (20 มล.) และตะกอนหนัก (20 มล.) - ปริมาตรของเหลวสีน้ำตาลใส 10 มล.	- สารแขวนลอยรวมกันในลักษณะตะกอนเบา (10 มล.) และตะกอนหนัก (30 มล.) - ปริมาตรของเหลวสีน้ำตาลขุ่น (10 มล.)
90	- ของเหลวสีน้ำตาลขุ่นอยู่ด้านบน (8.5 มล.) - ตะกอนหนัก (41.5 มล.)	- ตะกอนเบา (30 มล.) - ตะกอนหนัก (17 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส (3 มล.)	- ตะกอนเบา (20 มล.) - ตะกอนหนัก (10 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส (20 มล.)	เช่นเดียวกับที่ 60 นาที
120	- ของเหลวสีน้ำตาลขุ่นอยู่ด้านบน (10.5 มล.) - ตะกอนหนัก (39.5 มล.)	- ตะกอนเบา (24 มล.) - ตะกอนหนัก (20 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส(6 มล.)	- ตะกอนเบา (20 มล.) - ตะกอนหนัก (10 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส (20 มล.)	เช่นเดียวกับที่ 60 นาที
ข้ามคืน (19 ชม.)	- ของเหลวสีน้ำตาลขุ่น (19 มล.) - ตะกอนหนัก (31 มล.)	- ตะกอนเบา (16.5 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส (33.5 มล.)	- ตะกอนเบา (14 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลใส (36 มล.)	- ตะกอนเบา (27.5 มล.) - ตะกอนหนัก (13.5 มล.) - ของเหลวสีน้ำตาลขุ่น (9.0 มล.)

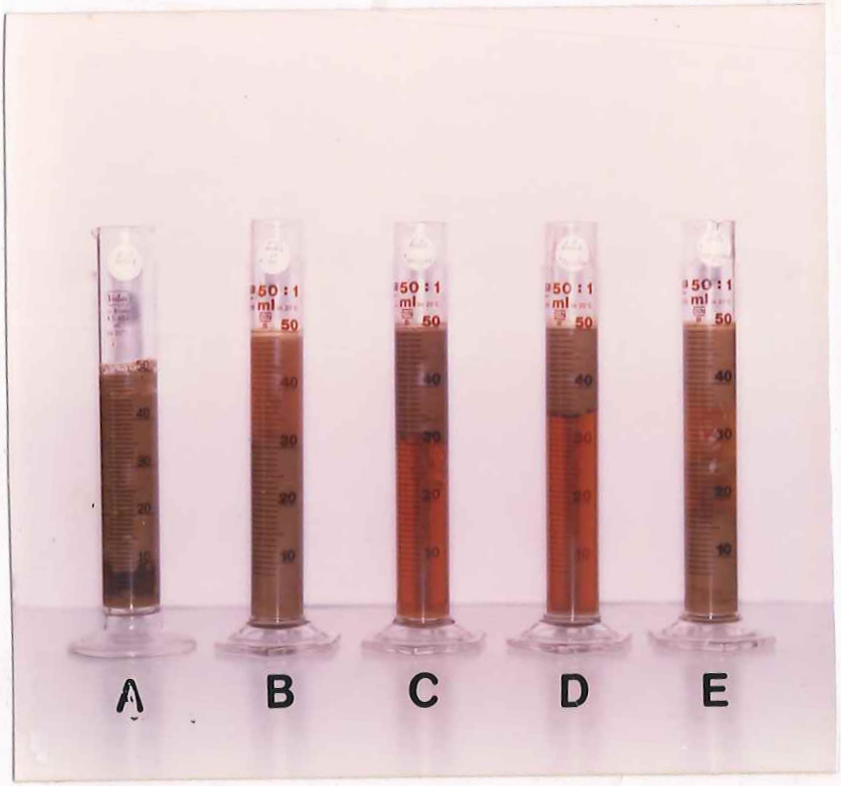
หมายเหตุ : * ปริมาตรของสารละลายผสม (50 มล.) ประกอบด้วยน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter 25 มล. ผสมกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) หรือสารละลายเอนไซม์ 25 มล.

ตารางที่ 14 การใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 แยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชม.

ลักษณะที่เกิดขึ้น	ชุดควบคุม	เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275	Meicellase	Sumyzyme
ปริมาตรตะกอนเบา (มล.)	-	16.5	14	27.5
ปริมาตรตะกอนหนัก (มล.)	31	-	-	13.5
ปริมาตรส่วนใส (มล.)	19	33.5	36	9.0
น้ำหนักแห้งของตะกอนเบา (ก/ล)	-	82.3	96.2	48.5
น้ำหนักแห้งของตะกอนหนัก (ก/ล)	97.6	-	-	44.3
Oil & Grease ของตะกอนเบา (มก/ล)	-	31,260	33,724	19,920
Oil & Grease ของตะกอนหนัก (มก/ล)	32,156	-	-	11,404
Oil & Grease ของส่วนใส (มก/ล)	770	300	100	1,220
COD ของส่วนใส (มก/ล)	27,324	55,044	70,092	53,856

หมายเหตุ - COD ของน้ำทิ้ง 229,680 มก/ล., Oil & Grease ของน้ำทิ้ง 31,160 มก/ล.

- ปริมาตรของสารละลายผสม (50 มล.) ประกอบด้วยน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter 25 มล. ผสมกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) หรือสารละลายเอนไซม์ 25 มล.



รูปที่ 25 ลักษณะการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากเครื่อง decanter ด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้า (Meicellase และ Sumyzyme) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 19 ชั่วโมง

A น้ำทิ้งจากเครื่อง decanter

B น้ำทิ้ง + น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

C น้ำทิ้ง + เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275

D น้ำทิ้ง + Meicellase

E น้ำทิ้ง + Sumyzyme

หมายเหตุ : ปริมาตรของสารละลายผสม (50 มล.) ประกอบด้วยน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter 25 มล. ผสมกับน้ำกลั่น (ชุดควบคุม) หรือสารละลายเอนไซม์ 25 มล.

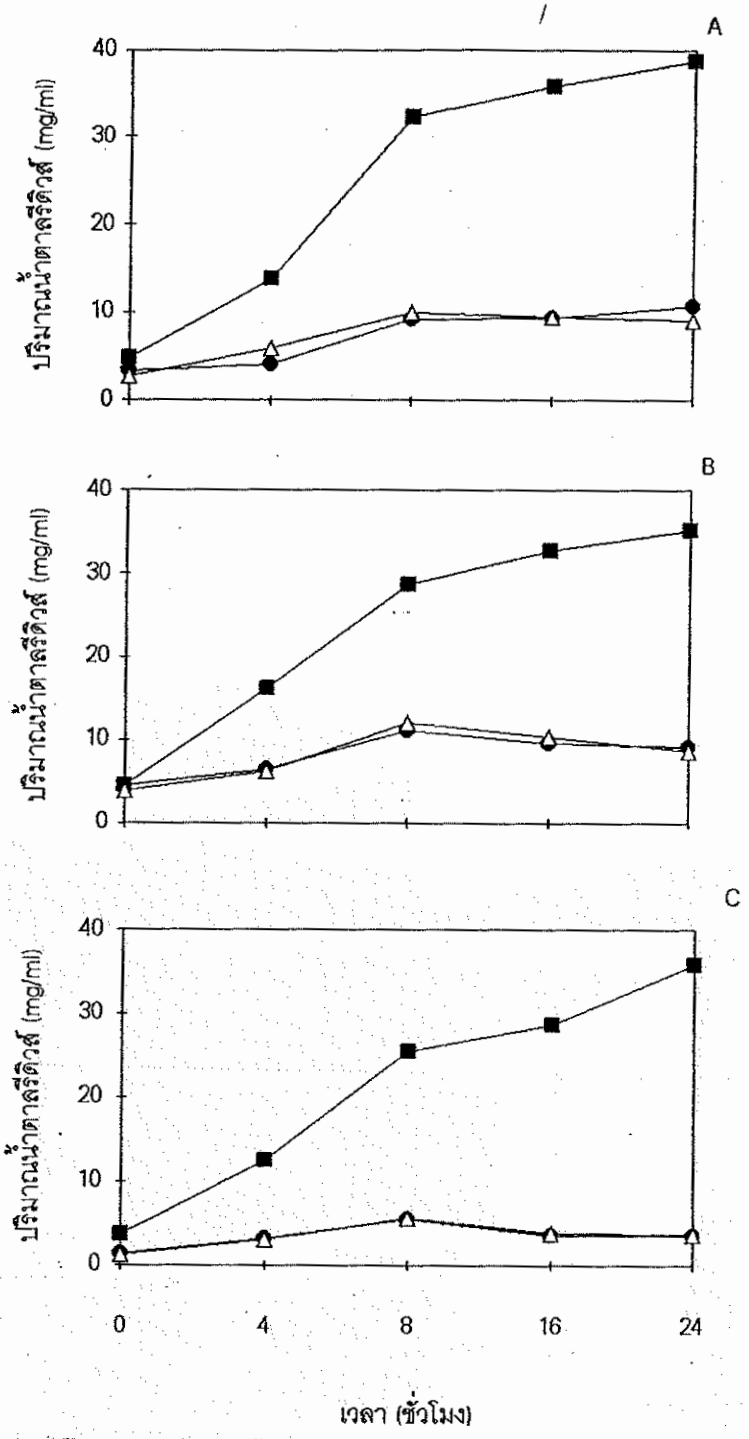
เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และ Meicellase ทำให้สารแขวนลอยลอยขึ้นและรวมตัวกันอยู่ด้านบนเป็นลักษณะตะกอนเบา มีปริมาตร 16.5 และ 14 มิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 33 และ 28 ของปริมาตรทั้งหมด เมื่อคำนวณโดยอาศัยข้อมูลจากตารางที่ 11 พบว่า การใช้เอนไซม์จาก *A. niger* และ Meicellase สามารถแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 71.4 และ 70.6 ตามลำดับ และมีผลให้ค่าซีโอดี (COD) ลดลงร้อยละ 76.0 และ 69.4 ตามลำดับ ที่น่าสนใจ คือ สามารถกำจัดน้ำมันและกรีส (oil & grease) ออกจากน้ำทิ้งได้เกือบหมด คิดเป็นร้อยละ 99.0 และ 99.7 ตามลำดับ ของเหลวที่เหลืออยู่ตอนล่างมีความใส มีค่าซีโอดีเหลืออยู่ 55,044 และ 70,092 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ของ เหลวส่วนล่างมีสีน้ำตาลใส ในขณะที่การใช้ Sumyzyme น้ำทิ้งจะปรากฏเป็น 3 ส่วน คือ ตะกอนเบา, ตะกอนหนัก และของเหลวสีน้ำตาล โดยมีปริมาตร 27.5, 13.5 และ 9.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ หากกำจัดตะกอนเบาออกจะสามารถลดปริมาณของแข็งลงได้ร้อยละ 69.8 และลดค่าน้ำมันและกรีสของน้ำทิ้งได้ร้อยละ 96.0 ค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 76.5 ส่วนชุดควบคุม (ใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์) ไม่ปรากฏตะกอนเบา ของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนหนักจะเป็นส่วนของน้ำที่แยกตัวออกเท่านั้น ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการใช้เอนไซม์ไม่สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้ง ไม่มีตะกอนเบาเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ไม่มีหรือมีกิจกรรมที่ต่ำมากที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงควรใช้อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองข้างต้นบ่งชี้ว่า เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 สามารถใช้ในการแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งได้ดีใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า และการที่เอนไซม์สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งได้ อาจเนื่องจากองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ซึ่งได้จากการกระบวนการหีบน้ำมันแบบมาตรฐานหรือแบบอบไอน้ำ ซึ่งการอบทะลายปาล์มด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ทำให้ผลปาล์มอ่อนนุ่มจึงมีผลให้เฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนที่ละลายน้ำได้ถูกสกัดออกมา (Saddler, *et al.*, 1983) และมีส่วนของเศษเส้นใยปนอยู่ในน้ำทิ้งหลังการแยกสลัดจ์ในลักษณะสารแขวนลอย ส่วนไซแลนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเกิดจาก side-chain ส่วนใหญ่ถูกตัดออกจากโครงสร้างหลัก (back-bone) ของไซแลนจะเกาะอยู่บนผิวของเส้นใยจึงทำให้เอนไซม์สามารถย่อยได้ทั้งไซแลนที่

ละลายและไม่ละลายน้ำ แต่การย่อยไซแลนที่ติดอยู่กับเส้นใยจะไม่เกินร้อยละ 20 เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ถูกจำกัดในการเข้าไปย่อยสลายไซแลนในเส้นใย (Viikari, *et al.*,1994 และ Kanteline *et al.*, 1993b อ้างโดย Ratto, *et al.*, 1994) ในกระบวนการทำเยื่อกระดาษในขั้นตอน pulping มีการเพิ่มขนาดของ pore ของเส้นใยจาก 10 เป็น 50 Å เพื่อให้เหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ไซลาเนสที่มีโมเลกุลค่อนข้างเล็ก (Kantelinen, *et al.*, 1991,1993 อ้างโดย Viikari, *et al.*, 1994) เมื่อเอนไซม์ย่อยไซแลนที่ละลายน้ำและไซแลนที่เกาะอยู่กับเศษเส้นใยทำให้สารแขวนลอยในน้ำทิ้งมีน้ำหนักลดลงน้ำมันจึงถูกแยกออกจากน้ำทิ้ง ทั้งสารแขวนลอยที่เหลือจากการย่อยด้วยเอนไซม์และน้ำมันจึงลอยเป็นตะกอนเบาอยู่ด้านบน ในการบำบัดน้ำเสียขั้นต้น (primary treatment) การทำให้สารแขวนลอยลอยขึ้นสู่ผิวน้ำทำโดยการเป่าอากาศลงไปในน้ำเสียโดยตรง เพื่อให้ฟองอากาศพาให้สารแขวนลอยเหล่านี้ลอยตัวขึ้นมา นอกจากนี้อาจใช้สารเคมีบางชนิดเติมลงไปช่วย ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ลอยตัว (floatation agent) ซึ่งจะไปลดแรงตึงผิวของน้ำเสียที่มีไขมันสูงทำให้สารแขวนลอยลอยตัวขึ้น (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529) ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งของการบำบัดน้ำเสียขั้นต้นที่จะกำจัดสารแขวนลอยและน้ำมันออกโดยการตักหรือกวาด (skim) เอาตะกอนเบาออกไป ซึ่งเป็นการลดปริมาณสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งที่จะเข้าสู่การบำบัดในขั้นที่สอง(secondary treatment) ต่อไป และเป็นการป้องกันปัญหาที่เกิดจากการมีน้ำมันปะปนอยู่ในน้ำเสีย

3.2 การใช้เอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มหรือกากปาล์ม เพื่อผลิตน้ำตาล

ผลของการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งป่าล์มและกากปาล์ม หลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเท่ากับ 12.4 กรัมต่อลิตร และ 60.3 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อใช้เฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์ม และกากปาล์มเป็นสับสเตรท เปรียบเทียบกับไซแลนทางการค้าในการย่อยด้วยเอนไซม์ *A. niger* ATCC 6275, Meicellase และ Sumyzyme บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 26) พบว่า การใช้ไซแลน



รูปที่ 26 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มเปรียบเทียบกับไซแลนทางการค้าด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 (A) Meicellase (B) และ Sumyzyme (C) ที่เวลาต่างๆ

—■— ไซแลนทางการค้า

—●— เฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์ม

—Δ— เฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์ม

ทางการค้าเป็นสับสเตรทจะได้น้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 24 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวส์ปริมาณ 38.8, 35.2 และ 35.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 776, 704 และ 718 มิลลิกรัมต่อกรัมสับเสตรท จากการใช้เอนไซม์ 3 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าปริมาณที่ได้จากการใช้เฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากน้ำนึ่งปาล์ม (9.26, 11.12 และ 5.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 185.2, 222.4 และ 108.2 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ) และเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากกากปาล์ม (9.97, 12.10 และ 5.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 199.4, 242 และ 113 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ) โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 จากการใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิด หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะลดลง การที่เฮมิเซลลูโลสที่สกัดจากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มให้ค่าน้ำตาลรีดิวส์ที่ต่ำกว่าไซแลนทางการค้าอาจเนื่องมาจากสับสเตรทเหล่านี้ละลายได้เพียงบางส่วนหลังการอบแห้งและมีปริมาณไซแลนต่ำกว่าไซแลนทางการค้า ระหว่างการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จะสังเกตเห็นว่า มีน้ำมันลอยปนอยู่ในสารละลาย แต่ไม่พบในการใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท นอกจากนี้การละลายของสับสเตรทในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พบว่า ไซแลนสามารถละลายได้ดีกว่าเฮ-มิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์ม ตามลำดับ ซึ่งไซแลนเป็นส่วนที่ละลายน้ำ (He, *et al.*, 1994) เนื่องจากร้อยละ 80 ของไซแลนเป็น pentosan ซึ่งมีโครงสร้างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของ 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid มี xylopyranose ที่ไม่มีกิ่งก้านในตำแหน่งที่ 5 หรือ 6 แต่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จะมี arafuranose (Saddler, *et al.*, 1983) แต่เฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์มจะได้จากการอบทะลายปาล์ม ซึ่งอาจทำให้ side-chain ของไซแลนละลายออกมาเช่นเดียวกับการ pulping จึงทำให้ความสามารถในการละลายของไซแลนลดลงและมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (Poutanen, *et al.*, 1990 อ้างโดย Viikari, *et al.*, 1994) หรือการสกัดด้วยน้ำจะเป็นการทำให้สารยับยั้งจากส่วนของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้จะถูกปล่อยออกมา เช่น furfural และ phenolic ซึ่งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Saddler, *et al.*, 1983) สำหรับเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากกากปาล์มเป็นการสกัดออกมาจากผลปาล์มประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ทำให้สกัดเฮมิเซลลูโลสออกมาได้ยากกว่า

ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Viikari, *et al.*, 1994) เนื่องจากการใช้สับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำการย่อย (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์จะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสับสเตรทที่ละลายน้ำ (He, *et al.*,1994) การเติมเอนไซม์อื่น เช่น เบตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase) ร่วมกับไซลาเนส จากเชื้อ *Humicola lanuginosa* จะทำให้การย่อยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 50 เป็นร้อยละ 90-100 (Kitpreechavanich, *et al.*, 1986)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งในการทดลองใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จาก *A. niger* เมื่อใช้เอนไซม์ผสมระหว่างของ *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F กับ *H. lanuginosa* ย่อยสลายฟางข้าว พบว่า การย่อยสลายสับสเตรทเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้การย่อยสลายจะลดลง นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายจะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้และระยะเวลาในการย่อยสลาย (วิเชียร สีสุข, 2532)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ เช่น สี พบว่า ไซแลนทางการค้าจะมีสีขาว แต่เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มมีสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากกระบวนการและวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการสกัดต่างกัน การที่น้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบ เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสทีสกัดได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มจึงมีน้ำมันปนอยู่ในสารละลายและอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วนประสิทธิภาพการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า Meicellase สามารถย่อยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และ Sumyzyme

3.3 การใช้เอนไซม์ในการทำให้น้ำผลไม้ใส

เนื่องจากเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้า (Meicellase และ Sumyzyme) มีสีน้ำตาลโดยเฉพาะเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 จะมีสีน้ำตาลเข้ม ทำให้หลังการเติมเอนไซม์น้ำสับปะรดมีสีน้ำตาล และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งสังเกต การเปลี่ยนแปลงของน้ำสับปะรด พบว่า การใช้เอนไซม์จาก *A. niger*

และ Sumyzyme ทำให้น้ำสับปะรดใสขึ้น และในส่วนของน้ำสับปะรดที่ใสจะมีตะกอนเล็กๆ ลอยปนอยู่ ส่วนด้านล่างจะมีตะกอนประมาณ 5 มิลลิลิตร หลังการบ่ม 30 นาที และ 1 มิลลิลิตร หลังการบ่ม 90 นาที ตามลำดับ เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน พบว่า ลักษณะของตะกอนจะแน่นขึ้นทำให้มีตะกอน 3 มิลลิลิตร เท่ากันในทั้งสองเอนไซม์และส่วนของน้ำสับปะรดที่ใสยังคงมีตะกอนเล็กๆปนอยู่ ซึ่งจากการที่น้ำผลไม้ประกอบด้วยสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน เพคติน แป้ง และเฮมิเซลลูโลส โดยเฉพาะเพคตินและเฮมิเซลลูโลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้น้ำผลไม้มีลักษณะขุ่น (Felix and Villettaz, 1983) อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์จะสามารถย่อยสารอินทรีย์ที่แขวนลอยให้มีโมเลกุลเล็กลง และเปลี่ยนสภาพจากสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำกลายเป็นสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535) หรือเกิดการจับตัวกันของเพคติน (Janda, 1983) จึงมักมีการเติมเอนไซม์ เช่น เพคติเนส, เฮมิเซลลูโลส, เซลลูโลส ในกระบวนการทำน้ำผลไม้หรือไวน์ แต่การใช้เอนไซม์ Meicellase พบว่า ไม่สามารถทำให้น้ำผลไม้ใสขึ้น อาจเนื่องจากน้ำสับปะรดมีค่าพีเอชต่ำ (3.9) การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในน้ำผลไม้สามารถใช้เป็นแนวทางที่จะนำไปใช้ในการทำให้ไวน์ใส

บทที่ 4

สรุป

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากปาล์ม กากสลัดจ์ และน้ำทิ้งรวมจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า กากปาล์มและกากสลัดจ์ มีปริมาณวัตถุแห้ง โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และความชื้น อยู่ในช่วง ร้อยละ (ต่อน้ำหนักแห้ง) 92.25-95.43, 7.62-13.31, 9.87-16.12, 15.95-16.75, 6.48-12.51 และ 4.57-7.75 ตามลำดับ และปริมาณแร่ธาตุ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและทองแดง จะอยู่ในช่วงร้อยละ (ต่อน้ำหนักแห้ง) 1.22-2.13, 0.18-0.21, 1.12-1.61, 0.01-0.02, 0.35-1.09, 0.31-0.40, 0.25-0.25 และ 0.0026-0.0052 ตามลำดับ ส่วนน้ำทิ้งรวม มีปริมาณโปรตีน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กแและทองแดง ร้อยละ (ต่อน้ำหนักของน้ำทิ้ง) 0.37, 0.06, 0.02, 0.23, 0.003, 0.03, 0.05, 0.01 และ 0.00006 ตามลำดับ ปริมาณไขมันร้อยละ (ต่อน้ำหนักแห้ง) 20.04 และปริมาณของแข็งทั้งหมด 38,810 มก./ล.

2. จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็ง โดยมีกากปาล์มหรือกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า

2.1 เมื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 สูตร ต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ คือ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ที่มีกากปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนส สูงสุด (576 ยูนิต/กรัม) ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 3 วัน ส่วนค่าแอคทิวิตี้ของ CMCase สูงสุด (14.42 ยูนิต/กรัม) ได้จากการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 4 ซึ่งมีกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอน หลังการเลี้ยงเชื้อ 6 วัน

2.2 ผลของความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ พบว่า การเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มที่มีการให้อากาศชื้น (ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 100) และควบคุมอุณหภูมิ (32± 2 องศาเซลเซียส) มีผลให้เชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ที่มีแอคทิวิตี้ต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อที่

อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ในสภาวะปกติ (ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 85 ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4

2.3 ผลของชนิดของอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 ในอุปกรณ์การเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ ได้แก่ ฟลาสก์ (ปริมาตร 250 และ 1,000 มล.), ถุงพลาสติก (ขนาด 6x8 นิ้ว และ 20x30 นิ้ว), กระด้ง และคอลัมน์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ปริมาตร 1,000 มล. และถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว ให้ค่าแอคทิวิตี้ของไซลาเนส (739 ยูนิต/กรัม) และ CMCase (20 ยูนิต/กรัม) สูงสุด

3. การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการ dialysis เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (Meicellase และ Sumyzyme) พบว่า

3.1 เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และ Meicellase สามารถแยกสารแขวนลอยออกจากน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นลักษณะตะกอนเบา ของเหลวสีน้ำตาลซึ่งอยู่ตอนล่างมีความใส ส่วนการใช้ Sumyzyme สารแขวนลอยอยู่ในรูปตะกอนเบาและตะกอนหนัก เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกปริมาณน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ร้อยละ 99.04, 99.70 และ 96.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน

3.2 เมื่อใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 , Meicellase และ Sumyzyme ย่อยสลาย เฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากน้ำนึ่งปาล์มหรือกากปาล์มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การย่อยเฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์มปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 มีค่าเท่ากับ 199.4, 242 และ 113 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์มได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดเท่ากับ 185.2, 222.4 และ 108.2 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ จากการสังเกต พบว่า ระหว่างการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากทั้ง 2 แหล่ง มีน้ำมันลอยอยู่ด้านบนของสารละลาย ส่วนการย่อยโดยใช้ไซแลนทางการค้าเป็นสับสเตรทได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มีค่าเท่ากับ 776, 704 และ 718 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง

3.3 ผลของการใช้เอนไซม์ *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้า (Meicellase และ Sumyzyme) ในการทำให้ผลไม้ใส พบว่า เอนไซม์จาก *A. niger* และ Sumyzyme สามารถทำให้น้ำสับปะรดใสขึ้น โดยด้านล่างเกิดตะกอนปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร หลังการบ่ม 30 นาที และ 90 นาที ตามลำดับ ส่วนการใช้ Meicellase ไม่สามารถทำให้น้ำสับปะรดใส และเนื่องจากเอนไซม์ทั้งสามมีสีน้ำตาล จึงมีผลทำให้น้ำสับปะรดที่ได้มีสีน้ำตาลเช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 ในฟลาสก์หรือขวดแบน โดยกลิ้งหรือเขย่าให้สับสเตรทแผ่กระจายทั่วพื้นที่ผิวภายใน ซึ่งจะเป็นการให้อากาศแก่เชื้อโดยใช้อุปกรณ์ที่มีราคาไม่แพง และทำได้ง่าย
2. ควรศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อที่เลี้ยงในตู้บ่มที่ให้อากาศที่มีความชื้น โดยสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อภายใต้สภาวะดังกล่าว
3. ควรศึกษาการผลิตเอนไซม์โดยเลี้ยงเชื้อในกระด้ง โดยวางถาดบรรจุน้ำไว้ในตู้บ่มด้วย
4. การประยุกต์ใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ควรศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์กับน้ำทิ้งจากเครื่อง decanter หรือความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์
5. ควรทดลองกำจัดสีและน้ำมันที่ยังเหลืออยู่ในน้ำทิ้งที่แยกสารแขวนลอยออกแล้ว เช่น การใช้จุลินทรีย์ หรือ pretreat ด้วยวิธีการอื่นๆเพื่อเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำทิ้งของโรงงาน
6. ควรศึกษาการแยกน้ำมันออกจากเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้จากน้ำนึ่งปาล์มหรือกากปาล์ม (เช่น การใช้ตัวทำละลาย) และศึกษาวิธีการฟอกสีของเฮมิเซลลูโลสที่สกัดได้

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ สิริสิงห. 2522. เคมีของน้ำ น้ำโสโครกและการวิเคราะห์. คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง, สำนักงานเศรฐกิจการเกษตร, คณะกรรมการนโยบายถั่วเหลือง และพืชน้ำมันอื่นๆ. 2532. นโยบายการพัฒนาปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ

จรัญ จันทลักขณา. 2526. แหล่งอาหารสัตว์สำหรับชนบท. ว. สุกรสาส์น 9(35) : 47-58.

ทวีศักดิ์ นิยมบัณฑิต, อุทัย คันโธ และนาม ศิริเสถียร. 2529. การใช้กากปาล์มน้ำมันชนิดกระเทาะเปลือกเป็นอาหารสุกรรุ่น-ขุน. ว. สุกรสาส์น. 13 (49) : 5-12.

นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

น้อย เกษมสุขสกุล. 2529. การผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงบนวัสดุที่เป็นของแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์. 159 หน้า.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และอัครวิทย์ กาญจนโอภาษ. 2532. ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดฮีมิ-เซลลูโลสจากฟางข้าว. รายงานวิจัย ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 28 หน้า.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งและคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงาน

น้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12 (12) : 169-176.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2523. ปาล์มน้ำมัน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พานิช ทินนิมิตร. 2535. การปรับปรุงคุณภาพของอาหารและการประยุกต์ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์บางชนิด. โภชนศาสตร์สัตว์ประยุกต์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2535. เครื่องดื่ม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

ยุทธนา ศิริวัธนนุกูล. 2530. การใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มกับอาหารสุกร. ว. สงขลานครินทร์. 9 : 437-443.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช, วิเชียร สีสุข, อัญชริดา สวาชร และนภา โล่ห์ทอง. 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสและไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งจากเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F. ว. เกษตรศาสตร์. สาขาวิทยาศาสตร์. 26 : 296-305.

วิเชียร สีสุข. 2532. การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus*

fumigatus Fresenius No. 4-45-1F. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 138 หน้า.

ศุภโชค วิริยโกศล และพิจิตร พิศสุวรรณ. 2526. เครื่องหีบน้ำมันเมล็ดในปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 5(1) : 35-39.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2529. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2534. ปาล์มน้ำมัน. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 37 (411) : 25-26.

สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2536. ปาล์มน้ำมัน. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 39 (434) : 22-23.

สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2537ก. ปาล์มน้ำมัน. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 40 (446) : 30-32.

สุดารัตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2537ข. ปาล์มน้ำมัน. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 40 (448) : 29-30.

สมพงษ์ เทศประสิทธิ์. 2526. การใช้กากปาล์มน้ำมันในอาหารโครุ่น. ว. สงขลานครินทร์. 5 (3) : 227-229.

อารี กังแฮ. 2536. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจากวัสดุเศษเหลือโรงงานน้ำมัน โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 127 หน้า.

Ahchara, P., Kinoshita, S., Kishimoto, M., Yoshida, T. and Taguchi, H. 1985. Effect fo rice

bran on the sawdust to cellulase activity and mycelial growth by *Pleurotus oseatus*. Annual Reports of ICBiotech. 8 : 302-305.

Alam, M., Gomes, I., Mohiuddin, G. and Hoq, M.M. 1994. Production and characterization of thermostable xylanase by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiancus* grown on lignocellulose. Enzyme Microb. Technol. 16 : 298-302.

Alazard, D. and Raimbault, M. 1981. Comparative study of amylolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid state cultivation. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12 : 113-117.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of Association of Official Chemists, 15thed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Verginia.

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 16thed. American Public Health Association Washington, D.C.

Buchholz, K., Puls, J., Godelmann, B. and Dietrichs, H.H. 1980/1981. Hydrolysis of cellulosic wastes. Process Biochem. 15 : 37-43.

Chahal, D.S. 1986. A new approach in solid state fermentation for cellulase production. *In* Biotecnology and Renewable Energy. (Moo-Young, M., Hasnain, S. and Lampty, J., eds.) pp. 57-69, England : Elsevier Applied Science Publishers.

Chavanich, S., Yoshioka, H. and Hayashida, S. 1981. A comparative study of cellulase and xylanase produced by some thermophilic fungi. Microbial Utilization of Renewable Resources. 2 : 72-76.

Christov, L.P. and Prior, B.A. 1993. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett.. 15 : 1269-1274.

Cuero, R.G., Smith, J.E. and Lacey, J. 1985. A novel containment system for laboratory scale solid particulate fermentations. Biotechnol. Lett.. 7 : 463-466.

Deschamps, F., Giuliano, G., Asther, M., Huet, M.C. and Roussost, S. 1985. Cellulase production by *Trichoderma hazinum* in static and mixed solid-state fermentation reactor under nonaseptic conditions. Biotechnol. Bioeng. 27 : 1385-1388.

Fan, L.T. and Lee,Y.H. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : derivation of a mechanistic model. Biotechnol. Bioeng. 15 : 2707-2733.

Fiechter, A. 1986. Biodegradation of lignocellulosic materials. Microbial Utilization of Renewable Resources. 5 : 283-290.

Felix, R. and Villettaz, J.-C. 1983. Wine. *In* Industrial Enzymology : the Application of Enzyme in Industry. (Godfrey, T. and Reichelt, J. eds.) pp. 411-421, New York : The Nature Press.

Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P. and Kubicek, C.P. 1992. Cellulase-

poor xylanase produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicelllose substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 315-322.

Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D.C., Wong, K.K.Y., Breuil, C. and Saddler, J.N. 1993. A comparison of two xylanases from the thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 508-514.

Glenn, D.R. and Rogers, L. 1988. A solid substrate fermentation process for an animal feed product : Studies on fungal strain improvement.. Austral. J. Biotechnol. 2 : 50-57.

Godfrey, T. 1983. Edible oils. *In* Industrial Enzymology : the Application of Enzyme in Industry. (Godfrey, T. and Reichelt, J., eds.) pp. 424-427. New York : The Nature Press.

Gokhle, D.V., Patil, S.G. and Bastawde, K.B. 1990. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. Appl. Biochem. Biotechnol. 30 : 99-109.

He, L., Bickerstaff, G.F., Paterson, A. and Buswell, J.A. 1994. Evaluation of catalytic activity and synergism between two xylanase isoenzymes in enzymic hydrolysis of two separate xylans in different states of solubility. Enzyme. Microb. Technol. 16 : 696-702.

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.

Janda, W. 1983. Fruit juice. *In* Industrial Enzymology : the Application of Enzyme in Industry. (Godfrey, T. and Reichelt, J., eds.) pp. 315-319. New York : The Nature Press.

Kim, J.H., Kishimoto, M., Seki, T. and Taguchi, H. 1982. Production of cellulase in solid-state ; Estimation of enzyme production by moisture content and respiration rate. Annual Reports of ICME. 5 : 193-200.

Kim, J.H., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H.and Ryu, D.D.Y. 1985. Cellulase production by a solid state culture system. Biotechnol. Bioeng. 7 : 1445-1450.

Kinoshita, S., Sriyotha, P., Lumyong, S., Sarawek, S. and Chisuksant, Y. 1983. Production of cellulase in solid culture by *Aspergillus* sp. Annual Reports of ICME. 6 : 289-292.

Kitpreechavanich, V., Hayashi, M. and Nagai, S. 1984. Production of xylan degrading enzymes by thermophilic fungi ,*Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. J. Ferment. Technol. 62 (1) : 63-69.

Kitpreechavanich, V., Yano, T., Nishio, N., Hayashi, M. and Nagai, S. 1986. Enzymatic saccharification of xylans to xylose. Microbial Utilization Renewable Resources. 5 : 142-148.

Koyama, Y., Tanaka, K., Yashida, T., Taguchi, H. and Pichangkura, S. 1979. Control of solid-state fermentation. Annual Reports of ICME. 2 : 29-42.

Kuhad, R.C. and Singh, A. 1993. Enhanced production of cellulase by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. World J. Microbiol. Biotechnol. 9 : 100-101.

Illanes, A., Aroca, G., Cabello, L. and Acevedo, F. 1992. Solid substrate fermentation of leached beet pulp with *Trichoderma aureoviride*. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 488-493.

Madamwar, D., Sangita, P. and Parikh, H. 1989. Solid state fermentation for cellulase and β-glucosidase production by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Bioeng. 67 (6) : 424-426.

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

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

Marsden, W.L., Gray, P.P and Dunn, W.W. 1982. Alternative pathway for glucose production from cellulose using *Trichoderma reesei* QM 9414 cellulase. Biotechnol. Lett. 4 : 589-594.

Moo-Young, M., Moreira, A.R. and Tengerdy, R.P. 1983. Principles of solid substrate fermentation. *In* The filamentous Fungi. Fungal Technology (Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. eds.) pp. 117-144, New York : Edward Arnold Pulishers.

Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Pichangkura, S. and Taguchi, H. 1981. Growth and enzyme production in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Annaual Reports of ICME. 4 : 69-79.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of gluocose. J. Biol. Chem. 153 : 375-380.

Nishio, N. and Nagai, S. 1981. Thermostable cellulase production by *Taralomyces* sp. in solid-state cultivation. Microbial Utilization of Renewable Resources. 2 : 211-216.

Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. and Viniegra-Gonzales, G. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 498-503.

Pamment, N., Robinson, C.W., Hilton, J.and Moo-Young, M. 1978. Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreatment sawdust.. Biotechnol. Bioeng. 20 : 1735-1744.

Pandey, A. 1991. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. Process Biochem. 26 : 355-361.

Pandey, A. 1992. Recent process development in solid-state fermentation. Process Biochem. 27 : 109-117.

Prasertsan, P.and Oi, S. 1992. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre. World J. Microbiol. Biotechnol.

8 : 536-538.

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

Rajagopalan, K. and Webb, B.H. 1975. Palm oil mill waste recovery as a by-product industry. Planter. 51 : 126-132.

Ratto, M., Mathrani, I.M., Ahring, B. and Viikari, L. 1994. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of kraft pulps. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 130-133.

Saddler, J.N., Yu, E.K.C., Mes-Hartree, M., Levitin, N. and Brown, H.H. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for product of liquid fuels. Appl. Environ. Microbiol. 45 (1) : 153-160.

Spano, L.A. 1977. Enzymatic hydrolysis of cellulosic material. *In* Symposium on Microbial Energy Conversion. (Schlegel, H.G. and Bannea, J. eds.) pp. 157-177, Oxford : Pergamon Press.

Tako, S., Kamagato, Y. and Sasaki, H. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurgenum* J. Ferment. Technol. 63 : 127-134.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.N. 1987. Inexpensive rapid proceduce for bulk purification of cellulase-free beta,1-4,D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30 : 96-100.

Tripathi, J.P. and Yadav, J.S. 1992. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleuotus ostreatus* : a pilot effort.. Animal Feed Science and Technol. 37 : 59-72.

Tsao, G.T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose Technology. *In* The Filamentous Fungi. (Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., eds.) pp. 296-326, New York : John Wiley & Son Inc.

Viikari, L., Kantelinen, A., Buchert, J. and Puls, J. 1994. Enzymatic accessibility of xylans lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 124-129.

Walch, E., Zemann, A., Schinner, F., Bonn, G. and Bobleter, O. 1992. Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. Biol. Technol. 39 : 173-177.

Webb, B.H., Hutagal, R.I. and Cheam, S.T. 1977. Palm oil waste as animal feed processing and utilization. *In* International Development in Palm Oil : 17-19 June 1976. (Earp, D.A. and Newall, W. eds.) pp. 125-145, Kuala Lumpur : The Incorporated Society of Planters.

Wijeyaratne, S.C., Waki, T., Suga, K. and Ichikawa,K. 1979. Production of cellulase on solid culture using wheat bran. Annual Reports of ICME. 2 : 213-225.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β- 1,4 - xylanase in microorganisms : function and applications. Microbiol. Rev. 52 (3) : 305-317.

Yoshioka, H., Chavanich, S., Nilubol, N. and Hayashida, S. 1981. Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Annual Reports of ICME. 4 : 89-97.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารวุ้นเอียง PDA (Potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันผรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดทซ์โทรส	20 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดทซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียวขนาด 16x150 มม. หลอดละ 5 มล. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี)

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. **ความชื้น** (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. อบภาชนะอลูมิเนียมในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (2.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว
3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (16 ชั่วโมง)
4. นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{100 \times \text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

$$\text{วัตถุแห้ง (ร้อยละ)} = 100 - \text{ความชื้น (ร้อยละ)}$$

2. ปริมาณไขมัน (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet appartus) ประกอบด้วย ขวดกลมสำหรับใส่ตัวทำละลาย, ซอคเลต (soxhlet), เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mentle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

1. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาด 250 มล. ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (2.0 กรัม) ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับในใส่ตัวอย่างคลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต
4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมัน 150 มล.แล้ววางบนเตา
5. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
6. ใช้เวลาในการสกัดไขมัน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต
8. นำขวดหาไขมันนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1 - 2 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. ปริมาณสารเยื่อใย (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดหาปริมาณสารเยื่อใย ซึ่งประกอบด้วย บีกเกอร์ ขนาด 600 มล. อุปกรณ์ควบแน่น และอุปกรณ์ให้ความร้อน
2. กระดาษกรอง
3. ขวดกรองแบบสูญญากาศ (suction flask)
4. กรวยกรอง (buchner funnel)
5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
6. ตู้อบไฟฟ้า
7. เตาเผา
8. โถดูดความชื้น
9. เครื่องชั่งไฟฟ้า

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก เข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์
3. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์

วิธีการ

1. นำกระดาษกรองวางบนกระจกนาฬิกา อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว ลงในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มล.
3. เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 200 มล.
4. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น พร้อมเปิดสวิทซ์ไฟ
5. ต้มให้เดือดนาน 30 นาที
6. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว
7. ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด
8. ถ่ายกากที่ได้ลงในบีกเกอร์ใบเดิม
9. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.25 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 200 มล.
10. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อกับอุปกรณ์ควบแน่นเช่นเดิมและต้มต่อ 30 นาที
11. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม
12. ล้างด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างหมดความเป็นด่าง
13. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 9.5 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 10 มล.
14. นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
15. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำอีกครั้ง 30 นาที จนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม

16. นำถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมกากที่อบแห้งแล้วไปเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และกระทำเช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณสารเยื่อใย (ร้อยละ)} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างตัวอย่างหลังอบและหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

4. ปริมาณเถ้า (A.O.A.C.,1990)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30 - 45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (2.0กรัม) ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ ซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 - 2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. ของแข็งทั้งหมด (Total solids) (APHA. AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. ถ้วยกระเบื้องสำหรับระเหย
2. ตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 103 องศาเซลเซียส
3. อ่างไอน้ำ
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. นำถ้วยระเหยล้างให้สะอาด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ตวงตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่า ใส่ลงในถ้วยระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
3. นำไประเหยให้แห้งในอ่างไอน้ำ
4. อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 นาที
6. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็ง(มิลลิกรัม)} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรตัวอย่าง}}$$

6. ปริมาณน้ำมันและกรีส (oil & Grease) (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริสิงห, 2522)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือที่ใช้สำหรับสกัด (Soxhlet)
2. เครื่องดูดสูญญากาศ
3. Buchner funnel
4. ขวดสกัด ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
6. โถดูดความชื้น
7. ตู้อบ

สารเคมี

1. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)
2. กระดาษกรอง
3. Diatomaceous - silica filter suspension (10 กรัมต่อลิตรของน้ำกลั่น)
4. ผ้าขาวบาง

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองใน Buchner funnel แล้วเทสารละลาย filter aid ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสูญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง
2. กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ และดูดให้แห้ง
3. ใช้ปากคีบหยิบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ใส่ลงในซอคเลต
5. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

6. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัด พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน
7. ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต
8. นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม)} \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

7. ซีโอดี (APHA,AWWA and WPCF, 1985)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์กลั่นไหลกลับ
   - ขวดกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
   - เครื่องควบแน่น
   - เตาให้ความร้อน (hot plate)
2. บิวเรต

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.025 นอร์มอล ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 12.259 กรัมในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟามิก (NH_2SO_3H) 0.12 กรัม แล้ว เจือจางจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
2. Sulfuric acid reagent

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 22 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น บรรจุขวดขนาด 1 ปอนด์ (2.65 ลิตร) เนื่องจากซิลเวอร์ซัลเฟตละลายยากมาก อาจใช้เวลา 1-2 วัน จึงละลายหมด

3. สารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.10 นอร์มอล

   3.1 การเตรียมสารละลาย

   ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

   3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย

   ปิเปตสารละลายมาตรฐานโพแทสเซี่ยมไดโครเมต (0.025 นอร์มอล) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น ไทเทรตด้วยสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเติมเฟอร์โรอิน 2-3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มัล)} = \frac{\text{ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (มล.)} \times 0.25}{\text{ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (มล.)}}$$

4. สารละลายเฟอร์โรอิน

   ละลาย 1-10 ฟีแนนโทรลีนโมโนเดรต ($C_{12}H_6N_2,H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$, $7H_2O$) จำนวน 0.695 กรัม เติมน้ำจนปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) ชนิดผง

6. เมอร์คิวรี่ซัลเฟต (HgSO4) ชนิดผลึกบริสุทธิ์หรือเป็นผง ใช้เป็นตัวกำจัดอนุภาคคลอไรด์(Cl^-) ในอัตราส่วน $HgSO_4$ ต่อ Cl^- =10:1

7. กรดซัลฟามิก (Sulfamic acid) ใช้ในกรณีที่กำจัดไนไตรดเท่านั้น

วิธีการ

1. เติมเมอร์คิวรี่ซัลเฟต 0.4 กรัม ลงในขวดกลม
2. เติมตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 20 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร และลูกแก้ว (glass bead) 3-5 เม็ด
4. ค่อยๆ เติม Sulfuric acid reagent 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายเมอร์คิวรี่ซัลเฟต ควรทำให้เย็นขณะเขย่า เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียของสารที่เป็นไอในตัวอย่าง (อาจแช่ในอ่างน้ำ)
5. กลั่นด้วยอุปกรณ์กลั่นไหลกลับประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น
6. ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เกินพอด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอร์โรอีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวปนน้ำเงินไปเป็นสีน้ำตาลปนแดง
7. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างน้ำ ทำเช่นเดียวกับตัวอย่าง (ข้อ 1-6)

การคำนวณ

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times N \times 8 \times 1{,}000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง(มล.)}}$$

A คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

B คือ ปริมาณสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (นอร์มัล)

8. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวส์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

สารเคมี

1. การเตรียม Low-alkalinity of Somogyi (สารละลาย A) การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

1.1 ละลายโปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้มปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

1.2 ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 1.2 เติมลงในสารละลายข้อ 1.1 แล้วเติมน้ำกลั่นต้มให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

2. การเตรียม Arsenomolybdate reagent of Nelson (สารละลาย B) การเตรียมสารละลายนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

2.1 ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

2.2 ละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 2.2 เติมในสารละลายข้อ 2.1 เติมน้ำกลั่นใช้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใช้

3. การเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสและไซโลสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลไซโลสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายดีแล้วดูดมา 2 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จาก stock solution นี้ นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสมาตรฐาน ความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ
3. เติมสารละลาย somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
4. เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 15 นาที
5. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล
6. สำหรับตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ก็วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-5

ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลอยู่สูงต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

<u>การคำนวณค่าแอคทิวิตี้ไซลาเนส</u>

ให้ค่าปริมาณน้ำตาลไซโลสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน = X มิลลิกรัม

จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์ = Y

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1{,}000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไซโลส} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์}}$$

(กรัม/โมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{มิลลิกรัมของไซโลส} \times 1{,}000 \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{150.13 \times 10 \times 0.5}$$

$$= 1.332XY = Z$$

จากกากปาล์มมีความชื้น ร้อยละ 7.75 แสดงว่า กากปาล์ม 5 กรัม จะมีความชื้นหรือปริมาณน้ำ = 0.38 มิลลิลิตร

เนื่องจากอัตราของกากปาล์มต่อน้ำกลั่นในการปรับความชื้น = 1 : 1 (5 กรัม : 5 มิลลิลิตร)

ดังนั้น กากปาล์มจะมีน้ำทั้งหมด = 0.38+5 = 5.38 มิลลิลิตร

สมมติ ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรท ร้อยละ 52.6

ความชื้นสุดท้ายหลังการเลี้ยงเชื้อ ร้อยละ 59.9

แสดงว่า ปริมาณน้ำเริ่มต้น 52.6 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำสุดท้าย 59.9 มิลลิลิตร

ปริมาณน้ำของกากปาล์ม (5 กรัม) 5.38 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำสุดท้าย = $\frac{5.38 \times 59.9}{52.6}$

= 6.13 มิลลิลิตร

ปริมาณน้ำกลั่นผสม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ที่ใช้ในการสกัด = 25 มิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาตรน้ำที่มีอยู่ในสับสเตรทหลังการเลี้ยงเชื้อ = 25+6.13 = 31.13 มิลลิลิตร

$$\text{ยูนิต/กรัมสับสเตรท} = \frac{\text{ยูนิต/มิลลิลิตร (ปริมาตรน้ำที่ใช้สกัดเอนไซม์ + ปริมาตรน้ำที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ)}}{\text{น้ำหนักกากปาล์มเริ่มต้น (กรัม)}}$$

$$= \frac{Z\ (25+6.13)}{5}$$

$$= (6.27)Z$$

<u>การคำนวณค่าแอคทิวิตี้ของCMCase</u>

เช่นเดียวกับการคำนวณแอคทิวิตี้ของไซลาเนส แต่ใช้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เทียบจากกราฟมาตรฐานแทน

<u>การคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆของเอนไซม์</u>

1. ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ (specific activity)

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน(มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$

2. ค่าแอคทิวิตี้รวมของเอนไซม์ (total activity)

ยูนิต = ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) x แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)

3. % Yield คำนวณจาก $\frac{\text{แอคทิวิตี้รวมของเอนไซม์ x 100}}{\text{แอคทิวิตี้รวมของเอนไซม์เริ่มต้น}}$

4. Purification factor คำนวณจาก $\frac{\text{ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์}}{\text{ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เริ่มต้น}}$

9. ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry, *et al.* (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 2 เปอร์เซนต์ ใน NaOH 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 เปอร์เซนต์ ใน sodium potassium tartrate 1.0 เปอร์เซนต์
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลายในข้อ 1. 50 มิลลิลิตร กับสารในข้อ 2. 1 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้)
4. สารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent นำมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ก่อนใช้

วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ
2. เติมสารละลาย alkali copper 3.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมสารละลาย Folin-ciocateus reagent 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน</u>

เตรียมโดยใช้ Bovine serum albumin ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
ตารางการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ผลของการใช้กากปาล์มและกากสลัดจ์เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	0	2	3	6	9	12	15
สูตร	แอคทิวิตี้ xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]						
1	1.43^{a}	7.39^{d}	13.34^{b}	110.67^{b}	13.19^{c}	3.11^{c}	2.35^{e}
2	0.84^{c}	26.56^{b}	576.60^{a}	240.94^{a}	149.73^{a}	98.38^{a}	68.25^{a}
3	0.20^{d}	3.57^{de}	21.71^{b}	15.17^{d}	14.78^{c}	2.85^{c}	3.55^{e}
4	0.50^{cd}	38.40^{a}	61.89^{b}	67.84^{bc}	101.07^{b}	77.19^{b}	44.80^{c}
5	0.27^{d}	3.86^{de}	17.45^{b}	6.58^{d}	4.59^{c}	3.11^{c}	2.29^{e}
6	0.15^{d}	29.95^{b}	40.11^{b}	47.02^{cd}	69.10^{b}	76.76^{b}	49.79^{b}
7	1.03^{b}	2.30^{e}	21.02^{b}	9.30^{d}	8.77^{c}	5.61^{c}	2.58^{e}
8	1.54^{a}	14.88^{c}	24.79^{b}	16.04^{d}	10.52^{c}	7.51^{c}	10.87^{d}
สูตร	แอคทิวิตี้ CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]						
1	0.20^{c}	0.25^{d}	0.52^{cd}	1.05^{d}	1.11^{d}	1.18^{b}	1.27^{c}
2	0.56^{bc}	4.46^{a}	4.60^{b}	4.96^{c}	10.41^{b}	7.23^{a}	6.35^{a}
3	0.65^{bc}	1.91^{bc}	0.48^{cd}	0.39^{d}	0.35^{d}	0.38^{b}	0.34^{c}
4	1.53^{a}	2.37^{b}	8.86^{a}	14.42^{a}	6.26^{c}	6.10^{a}	4.26^{b}
5	0.48^{bc}	0.26^{d}	0.22^{d}	0.64^{d}	0.90^{d}	0.61^{b}	0.82^{c}
6	1.05^{ab}	1.09^{cd}	6.34^{b}	10.73^{b}	12.56^{a}	8.04^{a}	5.56^{ab}
7	0.29^{bc}	0.99^{cd}	0.44^{cd}	0.69^{d}	1.57^{d}	0.44^{b}	0.30^{c}
8	0.53^{bc}	0.66^{d}	2.50^{c}	0.53^{d}	0.16^{d}	0.39^{b}	0.63^{c}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ผลการบ่มในตู้ที่ให้อากาศที่มีความชื้นและควบคุมอุณหภูมิ (32+2 องศาเซลเซียส) ต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger ATCC* 6275 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2 และ 4

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	6	9
สูตร	แอคทิวิตี้ xylanase (ยูนิต/กรัม)[1]		
2^2	530.04[a]	367.01[a]	343.11[a]
$2T^3$	409.05[b]	362.52[a]	213.69[a]
4^2	174.70[c]	175.32[b]	290.52[a]
$4T^3$	129.50[cd]	147.13[b]	235.15[a]
สูตร	แอคทิวิตี้ CMCase (ยูนิต/กรัม)[1]		
2	7.19[b]	12.18[a]	17.53[a]
2T	7.01[b]	13.48[a]	16.43[a]
4	10.94[a]	20.39[a]	15.29[a]
4T	9.69[a]	16.33[a]	18.93[a]

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

[2]บ่มที่อุณหภูมิห้อง

[3]บ่มในตู้ที่ให้อากาศที่มีความชื้น และควบคุมอุณหภูมิ (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ตารางภาคผนวกที่ ค3 ผลของอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	3	9
อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก	แอคทิวิตี้ xylanase (ยูนิต/กรัม)	
ฟลาสก์ ขนาด 250 มล.	710.94^{ab}	328.42^{bc}
ฟลาสก์ ขนาด 1,000 มล.	739.31^{a}	370.92^{abc}
ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว	705.90^{ab}	438.76^{ab}
ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว	642.93^{ab}	486.64^{a}
กระด้ง	226.52^{c}	261.34^{c}
คอลัมน์	562.74^{b}	371.47^{abc}
อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก	แอคทิวิตี้ CMCase(ยูนิต/กรัม)[1]	
ฟลาสก์ ขนาด 250 มล.	12.39^{b}	16.18^{ab}
ฟลาสก์ ขนาด 1,000 มล.	17.65^{a}	16.77^{ab}
ถุงพลาสติก ขนาด 6x8 นิ้ว	11.42^{b}	20.52^{a}
ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว	10.17^{b}	17.46^{ab}
กระด้ง	2.32^{c}	7.92^{c}
คอลัมน์	9.27^{b}	11.21^{bc}

[1]ในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรเหมือนหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ ค4 ผลของการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสที่แยกได้จากน้ำนึ่งปาล์มและกากปาล์มเปรียบเทียบกับเอนไซม์และไซแลนทางการค้า ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอนไซม์	สับสเตรท	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ชั่วโมงต่างๆ (มก/มล)				
		0	4	8	16	24
เอนไซม์จาก *A.niger* ATCC 6275	ไซแลนทางการค้า	4.85	13.83	32.29	35.80	38.80
	เฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์ม	3.37	4.15	9.26	9.33	10.66
	เฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์ม	2.73	5.90	9.97	9.47	9.15
Meicellase	ไซแลนทางการค้า	4.50	16.25	28.76	32.77	35.21
	เฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์ม	4.50	6.49	11.12	9.57	9.20
	เฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์ม	3.85	6.15	12.10	10.42	8.72
.Sumyzyme	ไซแลนทางการค้า	3.66	12.53	25.54	28.75	35.94
	เฮมิเซลลูโลสจากน้ำนึ่งปาล์ม	1.38	3.15	5.41	3.51	3.49
	เฮมิเซลลูโลสจากกากปาล์ม	1.20	3.03	5.65	3.80	3.62

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวจารุวรรณ มณีศรี

วัน เดือน ปี เกิด 16 กันยายน 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	2534

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)