รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้กากมะพร้าวจากการคั้นกะทิในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

Use of copra waste from coconut milk process for cellulase production by solid state fermentation

นางสาว ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

b00270273
RC00139

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การใช้กากมะพร้าวจากการคั้นกะทิในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2560 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 495,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560 (ขยายเวลา 6 เดือน)

หัวหน้าโครงการ นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

โครงงานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่กากมะพร้าวที่ผ่านการคั้นกะทิ โดยการนำมาใช้เป็นซับสเตรทในการหมักบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เราออกแบบการทดลองโดยการใช้กากมะพร้าวเป็นซับสเตรทในการหมักบนอาหารแข็งและใช้เชื้อ *Trichoderma reesei* ในผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองเริ่มจากศึกษาผลของการเติมรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี 4 อัตราส่วน ได้แก่ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี 3:2 ผลิตเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด เท่ากับ 0.27 ± 0.04, และ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ ขณะที่อัตราการเจริญของเชื้อรา และปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุด เมื่อเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:3 เท่ากับ 253.67 ± 14.96 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และ 0.46 ± 0.00 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ หลังจากนั้นได้ทำการหมักกากมะพร้าวที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:2 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 35 ลิตร เพื่อศึกษาอัตราการเติมอากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 vvm (ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของกากมะพร้าวต่อนาที) ความเร็วรอบ 6 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าเป็น 30 $^{\circ}$ซ พบว่าการเติมอากาศระหว่างหมักมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อรา และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้น โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็น 0.46 ± 0.09, 0.31 ± 0.04 และ 0.54 ± 0.22 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ และมีการเจริญของเชื้อราสูงสุด มีค่าปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 202.77 ± 87.17 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 3 ของการหมัก

คำสำคัญ: การหมักบนอาหารแข็ง, ถังหมักแบบหมุน, เอนไซม์เซลลูเลส, เชื้อรา *Trichoderma reesei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Use of copra waste from coconut milk process for cellulose production by solid state fermentation

Researcher: Miss Teerin Chysirichote

Faculty: Engineering **Department:** Food Engineering

ABSTRACT

This project aims to add value of copra waste obtained from coconut milk process by using it as a substrate for solid-state fermentation (SSF) of cellulase. We designed the process of fermentation of copra waste to produce cellulase by *Trichoderma reesei*. Firstly, we studied the effect of nitrogen source supplementary by adding wheat bran into copra waste with the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3 and culturing at 30 °C for 7 days. The SSF was conducted in 250 mL Erlenmeyer flask and monitored the fungal growth by glucosamine measurement and the activity of cellulase consisting of exoglucanase endoglucanase and beta-glucosidase. The highest productions of exoglucanase (0.24 ± 0.02 U/g dry substrate) and endoglucanase (0.40 ± 0.02 U/g dry substrate) were obtained in the SSF of copra waste and wheat bran in the ratio of 3:2, while the highest fungal growth and beta-glucosidase were shown in the ratio of 3:3 as 253.67 ± 14.96 mg/g dry substrate, 0.46 ± 0.00 U/g dry substrate, respectively.Then we studied the SSF in the 35 rotary drum fermentor fermentation by using copra waste to wheat bran at the ratio of 3:2, forced aeration at 0.5, 1,0 and 1.5 vvm (volume of air/ volume substrate/ minute), inlet air Temperature 30 °C, rotating speed 6 rpm. The results show that the forced aeration increased the growth and the cellulase production. The highest were found in the SSF with aeration 1.0 vvm as 0.46 ± 0.09, 0.31 ± 0.04 and 0.54 ± 0.22 U/g dry substrate, respectively. Also, the SSF with 1.0 vvm aeration showed the highest fungal growth (202.77 ± 87.17 mg/g dry substrate) on the third day.

Keywords: Solid state fermentation, Rotary fermentor, cellulase, *Trichoderma reesei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับการสนับสนุนการวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณคณาจารย์ ประจำภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ทุกท่านสำหรับการให้คำแนะนำและแนวคิดต่างๆ ในการทำโครงงานนี้เพื่อให้โครงงานมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการบริการด้านเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และวิเคราะห์ต่างๆ

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากปริญญานิพนธ์เล่มนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ
หัวหน้าโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
ABSTRACT	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูป	vii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน	1
1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เชื้อรา (Fungi)	3
2.2 เชื้อรา *Trichoderma reesei*	5
2.3 เซลลูโลส	6
2.4 เซลลูเลส	8
2.5 การหมัก (Fermentation)	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	18
3.2 วิธีการดำเนินงาน	21
3.3 การวิเคราะห์	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน)	28
4.2 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราการเติมอากาศ	33
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	40
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สำนักหอสมุดจัดทำขึ้นเพื่อใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม 42

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6 45

ก.1 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 46

ก.2 วารสารระดับนานาชาติ 47

ภาคผนวก ข สรุปการใช้จ่ายเงิน 58

ประวัติผู้วิจัย 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สปีชีส์ของเชื้อรา *T. Reesei*	6
2.2	ข้อดีและข้อเสียของการหมักบนอาหารแข็งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลว	10
2.3	การแปลงกลูแคนเป็นกลูโคสที่ซับสเตรทต่างกัน	17
4.1	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ	29
4.2	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	วงจรการเจริญของเชื้อรา	4
2.2	ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* เมื่อมองด้วยตาเปล่าและลักษณะทางสัณฐาน	5
2.3	โครงสร้างของเซลลูโลส	7
2.4	โครงสร้างสายเซลลูโลส	7
2.5	กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส	8
2.6	ถังหมักแบบถาด	13
2.7	(1) traditional packed-bed bioreactor และ (2) Zymatis packed-bed bioreactor	14
2.8	(1) ถังหมักแบบหมุน และ (2) ถังหมักแบบมีใบกวน	14
2.9	(1) Gas-solid fluidized bed bioreactors และ (2) Stirred-aerated bioreactors	15
3.1	องค์ประกอบภายนอกของถังหมักแบบหมุน (ก) ตัวถังชั้นนอก และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นนอก	21
3.2	องค์ประกอบภายในของถังหมักแบบหมุน (ก) ตัวถังชั้นใน และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นใน	22
3.3	การประกอบถังหมักชั้นนอกและชั้นในเข้าด้วยกัน	22
3.4	ลักษณะการติดตั้งถังหมักแบบหมุนเข้ากับระบบปรับอากาศ	22
3.5	ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในถังหมัก (ก) ภาพตัดขวาง และ (ข) ภาพมุมบน	23
3.6	รูป 2 มิติของถังหมักแบบหมุน	24
4.1	ความชื้นระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	31
4.2	ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	31
4.3	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	32
4.4	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	32
4.5	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	ความชื้นระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	37
4.7	ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	37
4.8	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	38
4.9	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	38
4.10	ค่ากิจกรรมเอนไซม์บต้ากลูโคซิเดสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

มะพร้าว (cocos nucifea L.) เป็นพืชเศรษฐกิจ นอกจากเราจะใช้ประโยชน์จากการบริโภคสดแล้ว ยังมีการนำมาคั้นกะทิ หรือสกัดน้ำมัน ซึ่งผลพลอยได้คือได้กากมะพร้าว (coconut copra) จำนวนมาก โดยกากมะพร้าวส่วนใหญ่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ แต่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากกากมะพร้าวเมื่อผ่านการคั้นกะทิแล้วจะเหลือโปรตีนเพียงร้อยละ 1.2 แต่มีเส้นใยจำนวนมากถึงร้อยละ 12 ทำให้ใช้ได้น้อยในสูตรอาหารสัตว์ โดยไม่เกินร้อยละ 15 ในอาหารสัตว์ปีก (Narumon, 2008) และร้อยละ 20 ในอาหารสุกร ทำให้เหลือกากมะพร้าวส่วนหนึ่งที่ทิ้งโดยไม่ได้ใช้ประโยชน์ จากปัญหาดังกล่าวจึงคิดที่จะนำกากมะพร้าวที่เหลือมาใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าให้แก่กากมะพร้าว

Trichoderma reesei เป็นเชื้อราประเภทเส้นใย ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic) และเจริญได้ดีในระดับอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) 20 - 40 $^{\circ}$ซ มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์เซลลูเลสจำนวนมาก ซึ่งนำมาย่อยเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชและชีวมวล ซึ่งในกากมะพร้าวมีเซลลูโลสจำนวนมาก จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์เป็นซับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส *T.reesei* มีความสำคัญในเชิงพานิชย์และอุตสาหกรรม ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง ที่ใช้เซลลูเลสเป็นกระบวนการแรกในการเปลี่ยนสารชีวมวลเป็นน้ำตาล และนำไปผลิตเป็นเอทานอลต่อไป หรือในอุตสาหกรรมอาหาร ที่ใช้เซลลูเลสในการผลิตน้ำผลไม้ เซลลูเลสจะช่วยในการสกัดน้ำผลไม้ และทำให้ได้น้ำผลไม้ที่ใสโดยไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน (Bhat , 2000) จากประโยชน์ของเซลลูเลส จากที่ได้กล่าวมาทำให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้น

กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) เป็นวิธีหมักเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งปราศจากน้ำอิสระ แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วาทิต, 2545) มักมีปัจจัยอื่นๆที่ต้องควบคุมเช่น ความชื้น, อุณหภูมิ, สารอาหาร โดยสารอาหารที่สำคัญอย่างหนึ่งคือแหล่งไนโตเจน เนื่องจากจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ แต่บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตเจนได้ดีเร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ (สมใจ, 2537) ซึ่งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

โครงงานนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีซึ่งเป็นตัวแทนปริมาณแหล่งไนโตรเจนเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการหมักบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยจะใช้เชื้อรา *T. reesei* ในการทำการทดลอง พร้อมทั้งสร้างถังหมักแบบหมุน เพื่อศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมต่อการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน

1.2.1 ศึกษาผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อ *T. reesei* โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจน

1.2.2 ศึกษาผลการเติมอากาศในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อ *T. reesei* ในถังหมักแบบถังหมุน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ถังหมักแบบถังหมุนในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง

1.3.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei*

1.3.3 ทราบอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) และอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสม ในการหมักเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei*

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1.4.1 ออกแบบและสร้างถังหมักแบบถังหมุน ลักษณะเป็นถังทรงกระบอกแนวนอน 2 ชั้น ถังชั้นนอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร และยาว 70 เซนติเมตร ถังชั้นในมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร และยาว 50 เซนติเมตร โดยชั้นถังข้างในสามารถหมุนได้ และมีท่อเติมอากาศจากด้านล่าง

1.4.2 ขอบเขตตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

1.4.2.1 ตัวแปรต้น

- อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่อัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2, 3:3
- อัตราการเติมอากาศ 0.5, 1.0, 1.5 vvm (vvm คือ ลิตรต่อลิตรของวัสดุหมักต่อนาที)

1.4.2.2 ตัวแปรตาม

- ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดปริมาณเอนไซม์ 3 ชนิด คือ endoglucanase , exoglucanase และ beta-glucosidase
- การเจริญของเชื้อโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน

1.4.2.3 ตัวแปรควบคุม

- ชนิดของเชื้อคือ *T. reesei* TISTR3080
- ปริมาณเชื้อ *T. reesei* เริ่มต้น แต่ละการทดลอง 1×10^{6} สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง
- ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทร้อยละ 60 (ฐานเปียก)
- ความเร็วรอบในการหมุนของถังหมัก กำหนดเริ่มต้น 6 รอบต่อนาที
- ภาชนะในการหมักได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักแบบถังหมุน
- อุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ สำหรับการทดลองในขวดรูปชมพู่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ตู้บ่ม สำหรับการทดลองในถังหมักโดยควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา (Fungi)

รา หรือ เชื้อรา เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดราซึ่งโตในรูปของใยหลายเซลล์ที่เรียกว่าไฮฟา (hypha) ในทางตรงกันข้าม เชื้อราที่สามารถเติบโตในรูปแบบของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจะเรียกว่า ยีสต์ ซึ่งเชื้อรามีลักษณะทั่วไปแตกต่างจากยีสต์ โดยเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นใยมากกว่ายีสต์ เส้นใยเชื้อราเกิดจากเซลล์หลายเซลล์ต่อกัน หรืออาจติดต่อทะลุถึงกันตลอดเป็นเซลล์เดียวขนาดยาวมากก็ได้ เชื้อราได้รับสารอาหารโดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ให้เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) และย่อยโปรตีน (protein) ให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย เชื้อราส่วนใหญ่ดำรงชีพแบบทั้งที่เป็นอิสระ หรือเป็นผู้ย่อยสลายซากอินทรีย์ (saprophyte) บางชนิดเป็นปรสิต (parasite) และบางชนิดสามารถดำรงชีวิตโดยเป็นได้ทั้ง parasite และ saprophyte

เชื้อรามีโครงสร้างเรียงตัวกันเป็นเส้นใย (multicellular filamentous fungi) เส้นใยราแต่ละเส้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร อาจแตกแขนงได้มากมาย เมื่อรวมกลุ่มจำนวนมากจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยรา หรือไฮฟา จะมีลักษณะเป็นเซลล์ติดต่อกันหลายเซลล์มีผนังกั้นหรืออาจมีลักษณะคล้ายท่อยาวตลอดไม่มีผนังก้นภายในประกอบด้วยส่วนประกอบของเซลล์ โดยเส้นใยมีลักษณะแตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ เส้นใยไม่มีผนังกั้น (nonseptate hypha) เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) แบ่งเซลล์เป็นห้องๆ มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) และเส้นใยมีผนังกั้นแต่มีหลายนิวเคลียส (multinucleate) กลุ่มของเส้นใยราอาจมีลักษณะหลวมๆ หรือแน่นมากๆ ก็ได้ ส่วนปลายของเส้นใยราจะมีการเจริญที่ทำให้เกิดการยืดยาวออกไป สามารถแบ่งหน้าที่ของเส้นใยราออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนสืบพันธุ์ (fertile hypha) ส่วนเวเจเตติฟ (vegetative part) ส่วนสืบพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ซึ่งตามปกติสปอร์จะชูขึ้นไปในอากาศ เกิดจากกลุ่มใยราซึ่งเป็นส่วนเวเจเตติฟ ส่วนเวเจเตตีฟนี้อาจอยู่บนผิวอาหารหรือแทงลงไปในอาหารก็ได้เพื่อดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของเชื้อรา (มยุรา และคณะ, 2555)

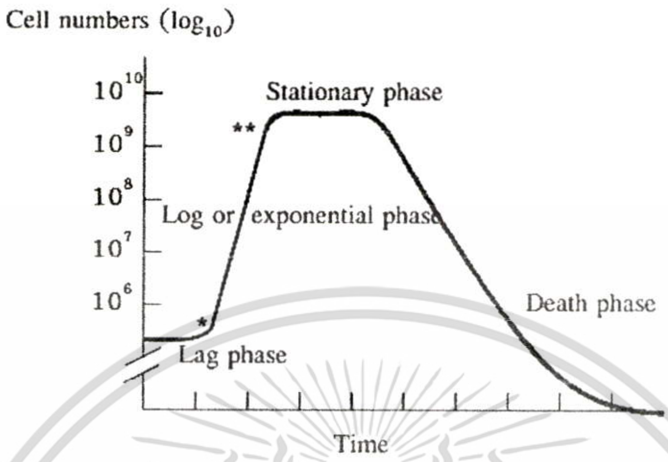
2.1.1 การเจริญของเชื้อรา

การเติบโตของเชื้อรา เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น เชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous fungi หรือ mold) การเจริญเติบโตจะทำให้เส้นใยมีความยาวและมีการแตกแขนงมากขึ้น อาจวัดการเจริญจากขนาดของโคโลนี (colony) หรือน้ำหนักแห้ง (biomass) ของเส้นใย การเจริญเติบโตของเชื้อราขึ้นอยู่กับสารอาหารและปัจจัยอื่นๆ ของสภาพแวดล้อม การเพาะเลี้ยงเชื้อราจึงสามารถทำได้โดยตัดส่วนของเส้นใยไปเพาะเลี้ยงในสารอาหารใหม่ โดยเชื้อราสามารถแบ่งเซลล์เจริญยืดยาวออกจากส่วนปลายทุกด้านของเส้นใย (มยุรา และคณะ, 2555)

ในการเจริญเติบโตของเชื้อราจะแบ่งวงจรการเจริญเติบโตออกเป็นระยะต่างๆโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) โดยปกติแล้วแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ Lag phase เป็นระยะที่เชื้อราจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนเชื้อรายังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งเซลล์, Log phase หรือ Exponential phase เป็นช่วงที่เชื้อราเริ่มแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว, Stationary phase เป็นช่วงที่การเจริญเริ่มคงที่ และ Death phase เป็นระยะที่เชื้อราจะตายอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วงจรการเจริญของเชื้อรา

ที่มา: มัณฑนา (2545)

สำหรับการเจริญของเชื้อราในระยะ log phase หรือ exponential phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้ (สมใจ, 2537)

$$dx/dt = \mu x \qquad (2.1)$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

t คือ เวลา มีหน่วยเป็น วัน

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็น (วัน$^{-1}$)

เมื่ออินทิเกรต สมการที่ 2.1 จะได้

$$X_0 = X_t e^{\mu t} \qquad (2.2)$$

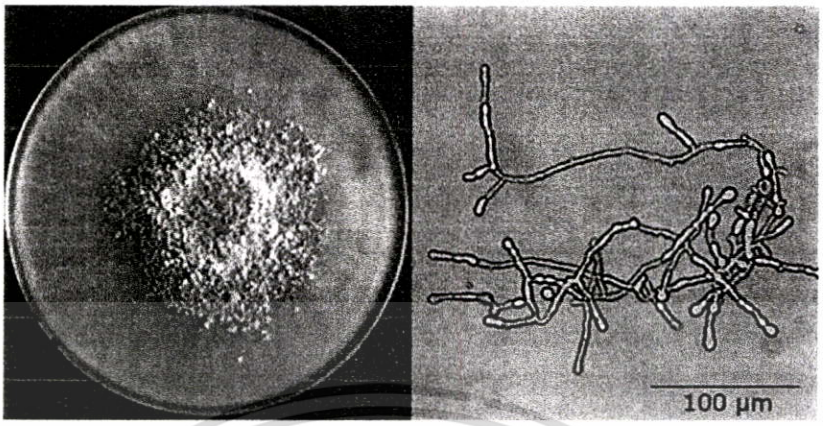
เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

X_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t วัน

e = ฐานของ natural logarithm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อรา *Trichoderma reesei*



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* เมื่อมองด้วยตาเปล่าและลักษณะทางสัณฐาน

ที่มา: *Ben Chaabane* (2013)

เป็นเชื้อราชนิดเส้นใย (filamentous fungus) ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic) และเจริญเติบโตได้ดีในระดับอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) 20 - 40 °ซ เชื้อรา *T. reesei* เป็นเชื้อราจำพวกซาโปรไฟต์ (saprophyte) ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์ และแหล่งอินทรีย์วัตถุเป็นอาหาร เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในดินทุกแห่งสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด และสร้างเส้นใยสีขาวและผลิตโคนิเดีย (conidia) หรือสปอร์ (spore) มากมายรวมเป็นกลุ่ม เห็นเป็นสีเขียว บางชนิดอาจมีสีขาวหรือสีเหลือง เชื้อรา *T. reesei* เป็นศัตรูต่อเชื้อที่เป็น สาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีเป็นปรสิต (mycoparasite) และแบ่งปันการใช้อาหารกับเชื้อโรค (competition) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตยาปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพิษ (toxins) และน้ำย่อยจำพวกเอนไซม์ (enzyme) เชื้อราที่เรียกว่า *T. reesei* เชื้อราดังกล่าวถูกค้นพบเป็นครั้งแรก เมื่อเชื้อรานี้เกิดขึ้นในชุดทหารเครื่องแบบ และเต็นท์ผ้าใบระหว่างช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 จากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้า จนพบว่าเชื้อรานี้หรือสายพันธ์ข้างเคียงสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถย่อยสลายเส้นใยพืชให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลน้ำตาลได้ การค้นพบดังกล่าว ช่วยให้สามารถผลิตเชื้อราที่ออกแบบให้ผลิตเอนไซม์หรือสารเร่งปฏิกิริยา ที่คุ้มค่าในการลงทุนในการย่อยสลายเซลลูโลสในผนังเซลพืช ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนชีวมวลสู่เชื้อเพลิง เพื่อการคมนาคมขนส่ง และสารเคมีที่จะใช้เป็นหน่วยแรกในการนำไปสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆต่อไป ในคู่มืออนุกรมวิธานของ Rifai (1969) ได้จำแนกเชื้อรา*Trichoderma* ออกเป็น 9 สปีชีส์ (ผ่องศรี และคณะ, 2551) ดังตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สปีชีส์ของเชื้อรา *T. reesei*

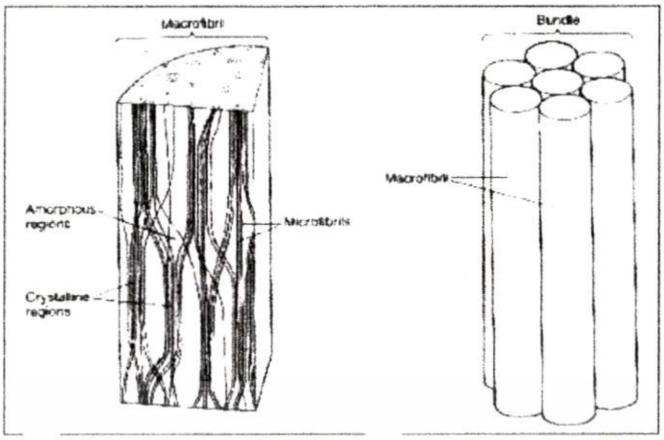
จีนัส	สปีชีส์
Trichoderma reesei	*piluliferum Webster and Rifai*
	polysporum Rifai
	hamatum (Bon.) Bain
	Koningii Oud
	aureoviride Rifai
	harianum Rifai
	- *longibrachaitum Rifai* - *pseudomokoningil Rifai* - *virile Pere*
	citrinoviride Bisset
	atroviride Bissett

T. reesei มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมจุลินทรีย์ เนื่องจากความสามารถผลิตเซลลูเลสได้ หลายสายสายพันธุ์ของ *T. reesei* ได้รับการพัฒนาตั้งแต่ถูกค้นพบ โดยเน้นหนักในการเพิ่มการผลิตเซลลูเลส ได้มีการพัฒนาโปรแกรมที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม ซึ่งนำไปสู่สายพันธ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้มากกว่าเดิม 20 เท่า

2.3 เซลลูโลส

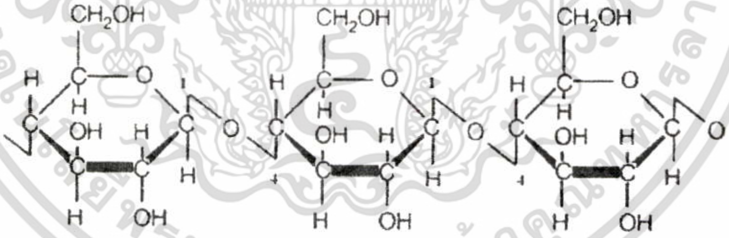
เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมากลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped units) ที่เรียกว่าไมเซล (micells) บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จากไมเซล 10 ถึง 20 หน่วยเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (crystalline) (รูปที่ 7) จึงถูกย่อยสลายได้ยากเป็นส่วนประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช เช่น ฝ้ายมีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 97-99 จัดว่าเป็นเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์เรียงขนานและยึดติดกันด้วยแรงกระจายตัว (dispersion force) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่นทำให้เซลลูโลสเซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆได้ช้า เพราะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ยังพบเซลลูโลสในสาหร่ายและฟังไจหลายชนิด รวมทั้งในสัตว์ทะเลหลายชนิด และเนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์จึงเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน (จุรีรัตน์ และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา: จุฑามาศ (2553)

ในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ (polymer) เชื่อมกันด้วย **β** -1, 4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน (Dalton) การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (มูรนีย์, 2557)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสายเซลลูโลส
ที่มา: พิมพ์เพ็ญ และนิตยา (สืบค้น วันที่ 27/05/2560)

2.3.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกการย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์คือน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่การย่อยที่ไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์และเซลลูโลสจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง น้ำตาลกลูโคสจะไม่ถูกสลายต่อไป จึงได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ และไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการปะปนออกมา

การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์จุลินทรีย์ในสภาพที่มีออกซิเจนผลของการย่อยสลายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อนและจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นนี้

เอกสารนี้เป็นของ... ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาจากย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ได้แก่ การระบายอากาศ อุณหภูมิ แหล่งอาหารหลักเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลีซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทานอล กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก กรดซักซินิก กรดบิวไทริก และกรดแลกติก เป็นต้น เอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์มีหลายชนิดทั้งเชื้อรา และแบคทีเรีย ที่นิยมนำมาใช้คือเซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *T. reesei* (ผ่องศรี และคณะ, 2551)

2.4 เซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับซับสเตรทจำพวกเซลลูโลส เป็น complex enzyme ที่มีส่วนประกอบต่างๆ กัน ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติจำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่ และคุณลักษณะที่ต่างกัน กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเบต้ากลูโคซิเดส (beta-glucosidase) (รูปที่ 2.9)

รูปที่ 2.5 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา จุฑามาศ (2553)

กลไกการทำงานของเซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่

(1) เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ สลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกของซับสเตรทสังเคราะห์ได้ เช่น คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (CMC) โดยทำปฏิกิริยาภายในโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม ทำให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น oligomer และน้ำตาลกลูโคสบางส่วน

(2) เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์สามารถย่อยสลายจากปลายด้าน non-reducing end และปลายด้าน reducing end ได้ด้วย

(3) เบต้ากลูโคซิเดส เป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

เอนไซม์เซลลูเลส สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ดังตัวอย่างต่อไปนี้

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากอาหารสัตว์มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่มีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละชนิด อีกทั้งยังย่อยได้ยาก จุลินทรีย์ในลำไส้สัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลส เช่น สุกร และสัตว์ปีก จึงเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในอาหารสัตว์ เพื่อให้เอนไซม์ไปย่อยสลายเซลลูโลส ทำให้สัตว์สามารถใช้โปรตีน และไขมันจากอาหารเหล่านั้น และลดอาหารตกค้างในกระเพาะ

อุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากสิ่งสกปรกในเสื้อผ้าประกอบไปด้วยสารอินทรียหลายชนิด มีที่ทั้งละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ การนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผสมกับสารซักฟอก เพื่อช่วยให้การซักผ้ามีประสิทธิภาพและขจัดส่วนของเส้นใยที่แยกออกมา ทำให้เนื้อผ้าสว่าง ไม่หมอง และนิ่ม

อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และนำน้ำตาลกลูโคสไปหมักด้วยเชื้อยีสต์ หรือแบคทีเรียเพื่อให้ได้เป็นเอทานอล

อุตสาหกรรมกระดาษ นำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงของกระดาษ เนื่องจากเยื่อกระดาษประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อเอนไซม์ไปเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเยื่อกระดาษ ก็จะเกิดผลิตภัณฑ์บางส่วนที่ละลายน้ำได้ อนุภาคขนาดเล็กๆ สามารถจับตัวเป็นก้อน ทำให้รีดน้ำออกจากกระดาษได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการทำให้หมึกหลุดออกจากกระดาษในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ รีไซเคิล โดยเอนไซม์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลส ทำให้หมึกหลุดออกมาง่าย (จุฑามาศ, 2553)

2.5 การหมัก (Fermentation)

การหมักในทางชีวเคมี เป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน (Klein และคณะ, 2004)

การหมักในเชิงอุตสาหกรรม เป็นการหมักจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเห็ดรา ที่ทำโดยตั้งใจเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ ที่สามารถใช้เป็นอาหารหรือเพื่อประโยชน์อื่น ๆ ในอุตสาหกรรมสารเคมีที่มีขายทั่วไปบางอย่าง เช่น กรดน้ำส้ม กรดซิตริก และเอทานอล ล้วนผลิตโดยวิธีการหมัก (Chisti, 1999)

2.5.1 การหมักในอาหารเหลว (Submerge state fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยใช้สารตั้งต้นอยู่ในสภาพอาหารที่เป็นของเหลว ซึ่งในอาหารเหลวจะมีการเติมสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน ธาตุอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราสามารถเพาะเลี้ยงได้ในถังหมัก โดยกระบวนการหมักอาหารเหลวโดยใช้ถังหมัก ประกอบไปด้วยส่วนของการให้อากาศและกวนให้องค์ประกอบในถังหมักเข้ากันดี และอุปกรณ์ตรวจวัดปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำและการเกิดฟอง กระบวนการหมักที่นิยมในระดับอุตสาหกรรมเป็นวิธีแบบ batch และแบบ fed-batch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักในสภาพอาหารเหลวมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เป็นระยะๆ ได้ หากหมักแบบ fed-batch culture ลดการเกิดการปนเปื้อนใช้แรงงานน้อย แต่การหมักแบบนี้มีประสิทธิต่ำในการหมักที่ใช้ลิกโนเซลลูโลส ค่าใช้จ่ายสูงและได้เอนไซม์ความเข้มข้นน้อยกว่าการหมักบนอาหารแข็ง (จุฑามาศ, 2553)

2.5.2 การหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

หมายถึง เป็นกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอาศัยน้ำซึ่งอยู่ ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับในวัสดุหมัก ดังนั้นการหมักชนิดนี้จึงมักจะเหมาะกับการใช้จุลินทรีย์ประเภทรา ซึ่งสามารถเจริญได้ในวัสดุหมักที่มีปริมาณน้ำน้อย (ภูษิต และคณะ, 2556) ปัจจุบันได้มีการนำเอาวัตถุดิบตกค้างจากอุตสาหกรรมเกษตรมาเพิ่มมูลค่าโดยการนำมาใช้เป็นวัสดุในการหมักด้วยวิธีการหมักบนอาหารแข็ง เนื่องจากหาง่ายและมีราคาถูก นอกจากนั้นยังพบว่ากระบวนการหมักบนอาหารแข็งเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานและสร้างของเสียน้อย รวมทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Pandey, 2003) การหมักบนอาหารแข็งมีข้อดีหลายอย่างเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารเหลว ดังแสดงในตารางที่ 2 (Couto และ Sanroman, 2006)

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของการหมักบนอาหารแข็งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลว

ข้อดี	ข้อเสีย
- ได้ผลผลิตที่สูง - การไหลเวียนของออกซิเจนดี - ต้นทุนต่ำ - ใช้พลังงานน้อย - วิธีการหมักไม่ซับซ้อน - สภาวะการหมักคล้ายกับแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ หลายชนิด	- ความยากในการขยายสเกล - ประสิทธิภาพในการผสมต่ำ - ควบคุมตัวแปรในการหมักยาก (เช่น ความเป็นกรด-ด่าง, ความร้อน, ความชื้น, สารอาหาร) - มีปัญหาเกี่ยวกับการสะสมความร้อน - โอกาสในการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สูงทำให้ต้องเสีย ค่าใช้จ่ายในการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์เพิ่ม

2.5.2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง

2.5.2.1.1 ความชื้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการความชื้นแตกต่างกันเช่น เชื้อราไม่ชอบเจริญในอาหารที่มีความชื้นมากหรือเปียก แต่จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความชื้นอยู่บ้าง ในขณะที่แบคทีเรียหรือยีสต์มักเจริญในอาหารที่มีลักษณะเปียกแฉะ มีน้ำอยู่มากเป็นต้น ความชื้นมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา การถ่ายโอนก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และการถ่ายเทความร้อน ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา (สุภัตรา, 2556) เชื้อราส่วนใหญ่ในการหมักบนอาหารแข็งสามารถเจริญได้ดีที่ความชื้นของวัสดุหมักอยู่ในช่วงร้อยละ 40 ถึง 65 (ธัญรัตน์ และคณะ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.1.2. ค่าพีเอช

ค่าพีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์จำพวกรามักเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นต่ำ เช่น *Aspergillus awamori* และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 สำหรับ *Trichoderma reuse* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 (เนริสา, 2543) ในระหว่างการหมักค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนีย หรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตแล้วเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ โดยบัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา สำหรับการควบคุมพีเอชสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง แต่ไม่นิยมทำในอาหารแข็งมากนัก (สัญทัศน์, 2553)

2.5.2.1.3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน โดยเชื้อราจะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่กว้าง คือที่ 0-62 °ซ (มยุรา และคณะ, 2555) นอกจากนั้นอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์สูงสุด จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (optimum temperature) ในการทำงานของเอนไซม์นั้นเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 °ซ (มูรนีย์, 2557) โดยในระหว่างการเจริญของเชื้อราจะมีความร้อนเกิดขึ้น และถ่ายเทไปยังอาหารจนทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิอาจเพิ่มสูงมากจนเชื้อราไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดังนั้นในการหมักบนอาหารแข็งจึงต้องมีการควบคุมให้มีความเหมาะสม

2.5.2.1.4.แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมาก และนิยมใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรืออาจใช้ข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเมล็ดข้าวบาร์เลย์ แลคโตส น้ำแช่ข้าวโพด ฟาร์มามีเดียร์ กากถั่วเหลือง และน้ำมันพืช เป็นต้น (สมใจ, 2537)

2.5.2.1.5. แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการหมัก ได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้น แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน สำหรับวัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง และฟาร์มามีเดียร์ เป็นต้น (สมใจ, 2537)

2.5.2.1.6. อากาศ

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย การเจริญ และกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนวัตถุดิบ หรือสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจขึ้นอยู่กับสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียจะมากจะน้อยเพียงใดขึ้นกับชนิด และปริมาณของแบคทีเรีย จำนวนรอบของการเขย่าหรือกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

การหมักแบบอาหารแข็งการให้อากาศมีบทบาท 2 ประการ คือ เป็นแหล่งให้ออกซิเจนกับแบคทีเรีย และเพื่อเป็นแหล่งออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ไอน้ำและสารที่ระเหยได้อื่นๆ อากาศที่ให้มักอิ่มตัวด้วยน้ำ หรือปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ และอัตราการให้อากาศขึ้นกับธรรมชาติของจุลินทรีย์ ความต้องการออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ปริมาณความร้อนที่เกิดจากเมตาบอลิซึม ความหนาของชั้นซับสเตรทคาร์บอนไดออกไซด์และสารระเหยได้ที่ปลดปล่อยออกมา และช่องอากาศในซับสเตรท โดยอัตราการให้อากาศต่ำจะมีคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าอากาศสูง ซึ่งจะมีผลต่อบรรยากาศในถังหมัก ทำให้ไม่มีศักยภาพในการผลิต แต่อัตราการให้อากาศสูงจะทำให้ความชื้นของซับสเตรท และความชื้นสัมพัทธ์สูญเสียได้มาก ทำให้ซับสเตรทแห้งหรือต้องใช้ตัวปรับความชื้นสัมพัทธ์ (humidifier) (สัญทัศน์, 2553)

2.5.2.1.7. สารอาหารอื่นๆ

สารอาหารอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เช่น วิตามิน และแร่ธาตุ แหล่งวิตามินจะเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factor) และทำหน้าที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ แหล่งของแร่ธาตุมีผลต่อการรักษาสมดุลของสารละลายภายใน และภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้ ซึ่งเกลือแร่จะมีผลต่อการถ่ายเทอิเลกตรอนในรูปของอิออน เพื่อช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ (สุภัตรา, 2556) โดยแร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งควรเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Mg, P, K, S, Ca และ Cl ส่วนวิตามิน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดจะสังเคราะห์วิตามินได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมวิตามินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2537)

2.5.2.2 ถังหมักสำหรับกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

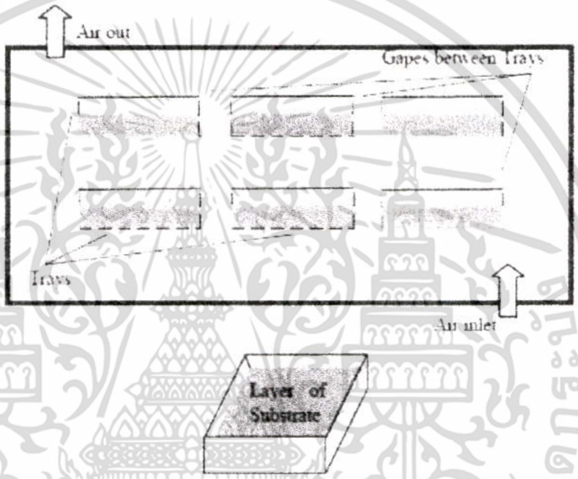
ถังหมักทั่วไปที่ใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งแบ่งออกเป็น 4 ประเภทขึ้นอยู่กับชนิดของการเติมอากาศหรือการผสม ได้แก่ ไม่มีการผสมและการเติมอากาศ ไม่มีการผสมแต่มีการเติมอากาศ มีการผสมแต่ไม่มีการเติมอากาศ และมีทั้งการผสมและการเติมอากาศ (Ali และ Zulkali, 2011)

2.5.2.2.1 ถังหมักแบบไม่มีการผสม และการเติมอากาศ

ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบถาด (Tray bioreactor) เป็นถังหมักอย่างง่าย มีมานานหลายศตวรรษใช้ในการผลิตแบบดั้งเดิมสำหรับการหมักอาหารเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทมเป้ ซุปมิโซะ โคจิ และซอสถั่วเหลือง (Tokuoka และคณะ, 2010) ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักแบบถาดแสดงดังรูปที่ 2.3 ซึ่งภายในถังหมักจะประกอบด้วยถาดหลายถาดวางแยกกันเป็นชั้นๆ เพื่อให้มีช่องว่างสำหรับให้อากาศไหลผ่าน โดยทั่วไปด้านบนของถังหมักจะเป็นแบบเปิดส่วนด้านข้างล่าง หรือด้านข้างอาจจะเจาะรูเพื่อช่วยในการระบายอากาศที่ผิวหน้าของซับสเตรท (Ali และ Zulkali, 2011, Yang และคณะ, 2008) ส่วนอุณหภูมิในระบบอาจจะปล่อยให้เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม หรือที่ถาดอาจติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิเพื่อควบคุมอุณหภูมิตามสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก็ได้ ถังหมักชนิดนี้ช่วยให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงขึ้นในระหว่างการหมัก แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้พื้นที่ในการหมักมาก นอกจากนี้เมื่อต้องการขยายขนาดจะทำให้ปริมาณอาหารที่ต้องใช้มากและหนาขึ้น ทำให้มีปัญหาในเรื่องของการถ่ายเทความร้อน และการควบคุมตัวแปรต่างๆ เช่นความชื้น พีเอช อุณหภูมิ จะทำได้ยากขึ้น (มัณฑนา, 2545)

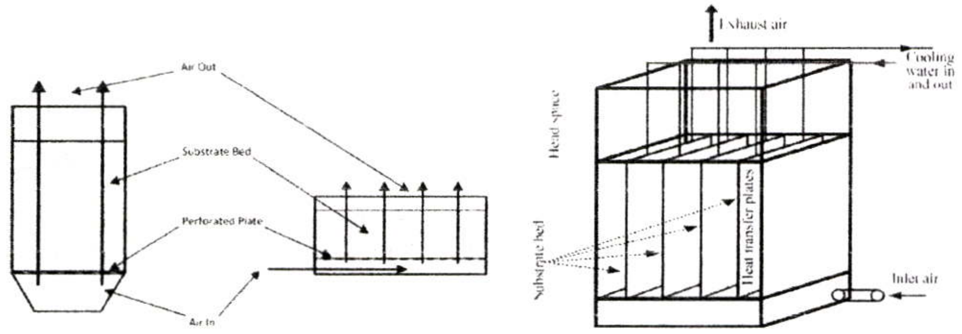


รูปที่ 2.6 ถังหมักแบบถาด
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

2.5.2.2.2 ถังหมักแบบไม่มีการผสม แต่มีการเติมอากาศ

ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบแพคเบด (Packed-bed bioreactors) อากาศจะถูกเป่าผ่านแผ่นเพลทที่มีรูพรุน กระจายไปยังชั้นของซับสเตรท ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักแบบแพคเบด ตัวคอลัมน์ของถังสามารถวางตัวได้ทั้งแนวตั้งและแนวนอนหรือมุมอื่นๆ การเติมอากาศจะเติมจากส่วนไหนของคอลัมน์ก็ได้ สำหรับถังแนวตั้งสามารถเติมอากาศจากด้านบนหรือด้านล่างของถังได้ ในส่วนของการระบายความร้อนตัวคอลัมน์อาจหุ้มด้วย วอเตอร์แจ๊คเก็ต เรียกว่า traditional packed-bed bioreactor หรือใช้แผ่นถ่ายเทความร้อนแทรกเข้าไปภายในตัวถัง เรียกว่า Zymatis packed-bed bioreactor ลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.4 (Ali และ Zulkali, 2011) ข้อดีของถังหมักแบบแพคคือ สามารถควบคุมตัวแปรของระบบได้ เช่นความชื้น และอุณหภูมิได้ดีกว่าแบบถาด ข้อเสียของการหมักแบบนี้คือ ยากที่จะแยกผลิตภัณฑ์ หรือนำผลิตภัณฑ์ออกจากคอลัมน์ และรูปแบบการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ไม่สม่ำเสมอ (มัณฑนา, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

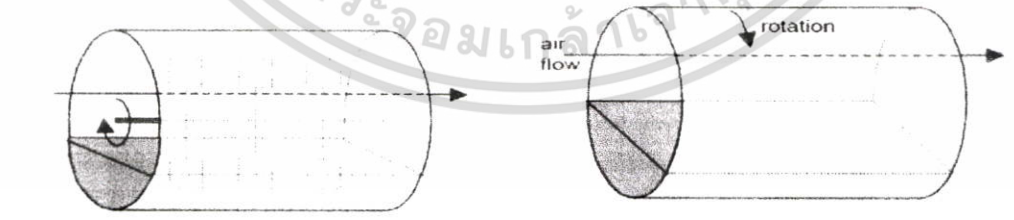


(1) (2)

รูปที่ 2.7 (1) traditional packed-bed bioreactor , (2) Zymatis packed-bed bioreactor
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

2.5.2.2.3. ถังหมักแบบมีการผสม แต่ไม่มีการเติมอากาศ

ถังหมักประเภทนี้ ได้แก่ ถังหมักแบบหมุน และถังหมักแบบมีใบกวน (Rotating-drum and stirred-drum bioreactors) ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักประเภทนี้คือ ตัวถังเป็นถังทรงกระบอกวางตัวในแนวนอน ภายในถังจะประกอบไปด้วยชั้นของซับสเตรท และมีอากาศไหลผ่านช่องว่างของซับสเตรท กลไกการทำงานของถังหมักแบบหมุน และแบบมีใบกวนจะต่างกัน โดยถังหมักแบบหมุน ตัวถังจะหมุนรอบแกนกลางของถัง อาจนำแผ่นกั้น (baffles) มาช่วยในการเคลื่อนที่ของซับสเตรท ส่วนถังหมักแบบมีใบกวน ตัวถังจะอยู่นิ่ง แต่จะติดตั้งใบกวนเพื่อช่วยในการผสมของซับสเตรทแทน (Ali และ Zulkali, 2011) ดังรูปที่ 2.5 โดยในการผสมมีทั้งแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง ผลจากการหมุนหรือการกวนจะทำให้เกิดการเสียดสี และอาจทำลายเส้นใยจุลินทรีย์ โดยข้อเสียของถังหมักแบบหมุน การควบคุมอุณหภูมิทำได้ยาก ไม่สามารถระบายความร้อนด้วยการใช้ระบบน้ำหล่อเย็นเหมือนในระบบแพคเบด นอกจากนี้ปริมาตรที่ใช้ในการหมักมีเพียง 30% ของปริมาตรทั้งหมดของถังหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักชนิดนี้ได้แก่ เอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ และอาหารสัตว์ (มัณฑนา, 2545)



(1) (2)

รูปที่ 2.8 (1) ถังหมักแบบหมุน, (2) ถังหมักแบบมีใบกวน
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

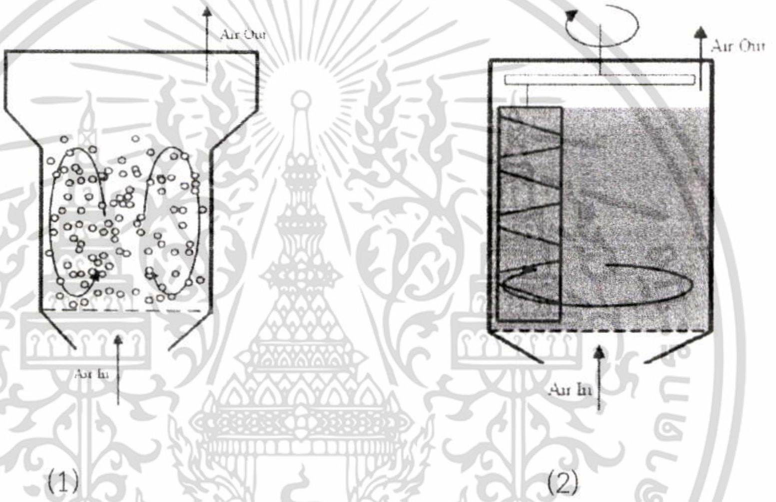
2.5.2.2.4 ถังหมักแบบมีการผสมและการเติมอากาศ

ถังหมักประเภทนี้ ได้แก่ ถังหมักแบบ ASFB (Air-solid fluidized reactor) ลักษณะของถังหมักแบบนี้จะใช้คอลัมน์สูง มีการอัดอากาศไหลเข้าทางด้านล่างด้วยความเร็วที่ทำให้อาหารลอยตัวได้ อาจใช้ใบกวนเพื่อช่วยให้อาหารแข็งกระจายตัว นอกเหนือจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สามารถใช้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้แรงจากอากาศอย่างเดียว หลักการของถังหมักชนิดนี้จะให้ก๊าซไหลขึ้นผ่านเบดของของแข็งด้วยความเร็วสูง ของแข็งจะแขวนลอยในก๊าซ เบดลักษณะนี้จะเรียกว่าฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized bed) สาหรับความเร็วของก๊าซขาเข้าจะต้องสูงกว่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิดไดซ์เบด โดย เบดจะมีลักษณะเหมือนน้ำเดือด แทนที่จะเป็นฟอง ก๊าซจะเป็นตัวของแข็งเคลื่อนที่ลอยทั่วคอลัมน์ ข้อดีของการใช้ ASFB คือทำให้กระบวนการอัดอากาศได้ผลดีขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับการหมักแบบอื่น ถังหมักชนิดนี้ใช้ ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งในระหว่างการหมักจะมีการกระเพื่อม เพื่อป้องกันการเกาะตัวเป็นของแข็งที่ผนังของถังหมัก (มัณฑนา, 2545)

ถังหมักแบบมีใบกวน ซับสเตรทจะถูกกวนมีทั้งแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง อากาศจะถูกเป่าผ่านซับสเตรท การวางตัวของซับสเตรทคล้ายกับแบบแพคเบด ตัวถังจะอยู่นิ่ง แต่มีการติดตั้งใบกวนช่วยในการผสมซับสเตรท และมีการเติมอากาศด้านล่างของถังหมัก



รูปที่ 2.9 (1) Gas-solid fluidized bed bioreactors, (2) Stirred-aerated bioreactors
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Metarhizium anisopliae เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ดี โดยเชื้อราสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อย่อยสลายผนังลำตัวของแมลง ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหารแข็งทำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณที่สูงมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ และสามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร เช่น รำข้าวสาลี และเปลือกถั่วมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์เพื่อลดต้นทุนการผลิต

อภิวิชญ์ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาเรื่องการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง *M. anisopliae* เป็นเชื้อราที่เป็นศัตรูต่อแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โดยโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่เชื้อราผลิตขึ้น เพื่อย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวเหยื่อขณะที่เชื้อราเข้าทำลาย ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง ซึ่งจากเมล็ดธัญพืชและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้งหมด 11 ชนิด ซึ่งพบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมโปรติเอส 167 ± 12.9 ยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อทำ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อราด้วยรำข้าวสาลีร่วมกับเพปโตน พบว่าการกระตุ้นให้เชื่อราสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 305.8 ± 10.2 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05 แต่ทั้งนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา และ pH ล้วนแต่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราซึ่งจะได้ทำการศึกษาวิจัยที่เหมาะสมอื่นๆต่อไป

การศึกษาเชิงเปรียบเทียบการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ โดยฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดลิกนิน ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma* การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น ลำต้นข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีปริมาณมาก หาง่าย ราคาถูก และที่สำคัญคือประกอบด้วยพอลิแซ็กคาร์ไรด์ โครงสร้างทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยเซลลูโลสในซับสเตรทต่างๆ ได้แก่ กระดาษกรอง ฟางข้าวที่ผ่าน และไม่ผ่านการกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อดูรูปแบบการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากซับสเตรทที่มีคุณลักษณะเฉพาะแตกแต่งกัน

ชุติเดช และคณะ (2557) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลส (กลูแคน) ในซับสเตรทต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลลูโลสในกระดาษกรอง ถูกย่อยเป็นกลูโคสได้มากสุดร้อยละ 50 รองลงมาคือ ฟางข้าวที่กาจัดลิกนินร้อยละ 43 และไม่กำจัดลิกนินร้อยละ 8 อัตราการย่อยใน ช่วงแรกของเซลลูโลสในซับสเตรทต่างๆมีความสัมพันธ์กับปริมาณและโครงสร้างของเซลลูโลสและปริมาณลิกนิน

ตารางที่ 2.3 การแปลงกลูแคนเป็นกลูโคสที่ซับสเตรทต่างกัน (เอนไซม์ 15 FPU/กรัม; ซับเตรทร้อยละ 1.5 มวลต่อปริมาตร ; pH 4.8 (สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์) ; 37 °ซ)

Substrate (1.5 g loading)	Glucan content (g glucose equivalent)	Glucose in hydrolysate (g) at 24 h	Glucan conversion (%)
Filter paper	1.6	0.8	50.0
Rice straw	0.5	0.04	8.0
Delignified rice straw	0.7	0.3	42.9

เนริสา (2543) ได้ศึกษาเรื่องการผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรพบว่า เมื่อนำ *Trichoderma reesei* Rut C-30 เลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิด คือรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เปลือกถั่วลิสง และชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ารำข้าวสาลีให้กิจกรรมของไซแลนเนสสูงสุด 23.931 ยูนิต/มิลลิลิตร และรำข้าวเจ้ามีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุด 0.656 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนมากที่สุด โดยมีปริมาณ 26.10 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนเปลือกถั่วมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 35.13 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง โดยที่การมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงในรำข้าวสาลี มีผลส่งเสริมการผลิตไซแลนเนสได้ เมื่อนำรำข้าวสาลีมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้กิจกรรมของไซแลนเนสสูงสุด 27.946 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ conrn steep liquor เมื่อศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงผลของสารที่มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส 3 ชนิด คือ ไซแลน ไซโลส และ beta-methyl - xyloside พบว่าไซแลนมีผลต่อการผลิตไซแลนเนสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ไซโลสและ beta-methyl-xyloside มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มขึ้น โดยไซโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.85 เท่า และ beta-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.32 เท่า

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุสำหรับการสร้างถังหมักแบบแพคเบด

1) แผ่นอลูมิเนียมอัลลอยด์ ความหนา 1 มิลลิเมตร

2) แผ่นสแตนเลส 304 ความหนา 1 มิลลิเมตร

3) เพลาสแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว

4) หน้าแปลนแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร

5) มุ้งลวดอลูมิเนียม

6) ท่อ PVC ขนาด 3 หุน

7) ตลับลูกปืน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว

8) เหล็กกล่องสี่เหลี่ยมความยาว 6 เมตร

9) coupling สำหรับมอเตอร์ กำลัง 15 วัตต์

10) ปะเก็นยาง

11) แผ่นไม้

3.1.2 วัสดุสำหรับการเพาะเชื้อ

1) เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar, PDA)

3) น้ำกลั่น

3.1.3 วัสดุสำหรับการหมัก

1) เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080

2) ซับสเตรทที่ใช้ในการทดลอง คือ กากมะพร้าว ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

3) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง คือ รำข้าวสาลี ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

3.1.4 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์ผล

3.1.4.1 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)

2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3) โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)

4) โพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ($KHSO_4$)

5) แอมโมเนียมซัลฟาเมต ($H_6N_2SO_3$)

6) MBTH (methyl -2- benzothai zolinone hydrazine hydrochloride)

7) เฟอร์ริคคลอไรด์ 6-ไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)

8) กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (D-(+)-Glucosamine hydrochloride)

9) น้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.2 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1) โซเดียมอะซิเตรทแอนไฮดรัส (CH_3COONa)
2) กรดอะซิติก (CH_3COOH)
3) 3,5–Dinitrosalicylic acid (DNS)
4) โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$)
5) กลูโคสบริสุทธ์ (D-(+)-Glucose)
6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
7) CMC (Carboxymethylcellulose)
8) cellobiose
9) กระดาษกรอง Advantec เบอร์ 1

3.1.5 อุปกรณ์

3.1.5.1 อุปกรณ์สำหรับการสร้างถังแบบแพคเบด

1) สว่านไฟฟ้า
2) กรรไกรตัดเหล็ก
3) ประแจ
4) ไขควง
5) เครื่องเชื่อม
6) เลื่อยจิ๊กซอ
7) คีมย้ำรีเวท

3.1.5.2 อุปกรณ์สำหรับเพาะเชื้อ

1) จานเพาะเชื้อ
2) แท่งแก้วสามเหลี่ยม
3) ไมโครปิเปต
4) ขวดเก็บเชื้อ
5) กล้องจุลทรรศน์
6) เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม
7) ตะเกียงแอลกอฮอล์
8) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
9) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.5.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมซับสเตรท

1) กะละมัง
2) ทัพพี
3) เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 3 กิโลกรัม
4) บีกเกอร์
5) อลูมิเนียมฟอยล์
5) กระบอกตวง
6) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.4 อุปกรณ์สำหรับกระบวนการหมัก

1) ถังหมักแบบหมุน 35 ลิตร
2) ตัวกรองอากาศขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำจากวัสดุ PTFE
3) อุปกรณ์ปรับอัตราการไหลอากาศ
4) ชุดปรับความชื้นอากาศ
5) ปั๊มลม
6) มอเตอร์ กำลัง 15 วัตต์
7) ตัวปรับความเร็วรอบมอเตอร์
8) ชิลเลอร์
9) ชุดปรับอุณหภูมิอากาศ
10) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
11) สำลีก้อน
13) ตู้บ่ม

3.1.5.5 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

1) ช้อนตักตัวอย่าง
2) ถุงเก็บตัวอย่าง
3) ตู้อบลมร้อน
4) ครกบดตัวอย่าง
9) แท่งแก้ว
10) บีกเกอร์
11) ปั๊มสุญญากาศ (Vacumm pump)
12) ขวดเก็บตัวอย่าง
13) หลอดทดลอง

3.1.3.6 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ผล

3.1.3.6.1 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความชื้น

1) ถ้วยอะลูมิเนียม
2) ตู้อบลมร้อน
3) โถแก้วดูดความชื้น
4) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

3.1.3.6.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Libra S12)
2) คิวเวทท์ (Cuvette)
3) หลอดทดลอง
4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)
5) ไมโครปิเปต
6) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot Plate & Magnetic Stirrer)
8) กระบอกตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

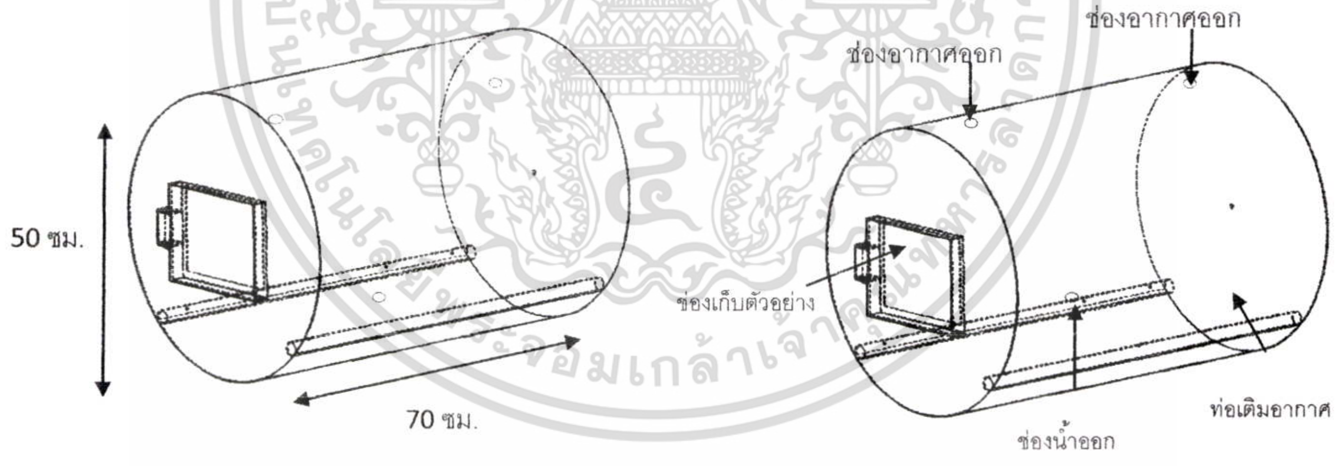
9) ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร (Volumetric flask)
10) บีกเกอร์
11) เครื่องชั่งน้ำหนัก

3.1.3.6.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Libra S12)
2) คิวเวทท์ (Cuvette)
3) หลอดทดลอง
4) ไมโครปิเปต
5) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
6) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot Plate & Magnetic Stirrer)
7) กระบอกตวง
8) บีกเกอร์
9) อ่างน้ำร้อน (Water bath)
10) เครื่องชั่งน้ำหนัก

3.2 วิธีการดำเนินงาน

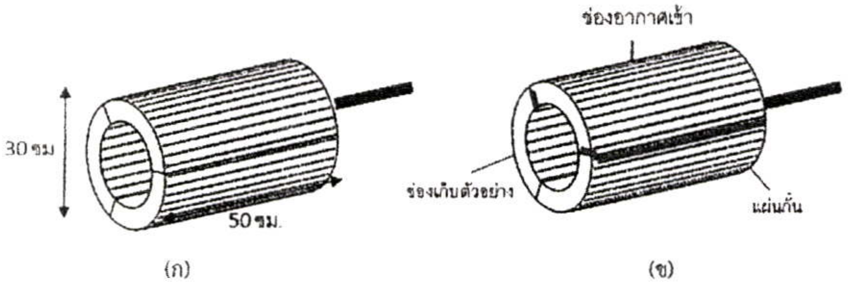
3.2.1 การออกแบบถังหมักแบบหมุน



(ก) (ข)

รูปที่ 3.1 องค์ประกอบภายนอกของถังหมักแบบหมุน
(ก) ตัวถังชั้นนอก และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นนอก

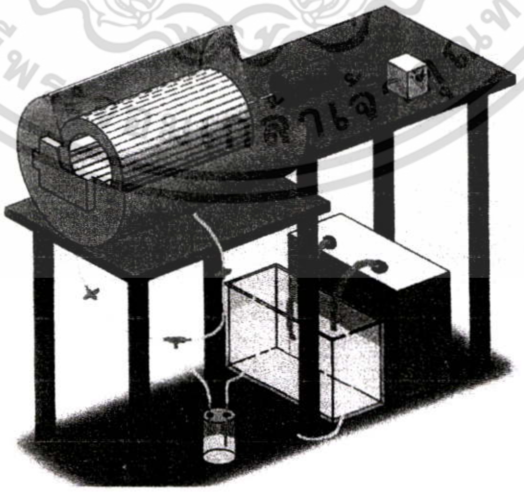
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 องค์ประกอบภายในของถังหมักแบบหมุน
(ก) ตัวถังชั้นใน และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นใน

3.2.2 การประกอบถังหมักแบบหมุน

รูปที่ 3.3 การประกอบถังหมักชั้นนอกและชั้นในเข้าด้วยกัน

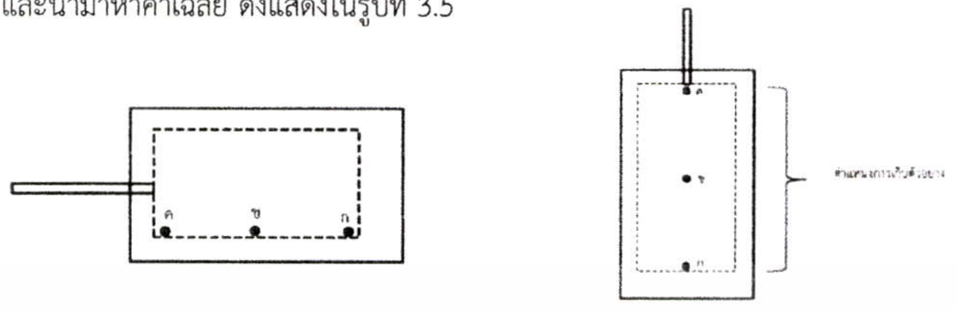


รูปที่ 3.4 ลักษณะการติดตั้งถังหมักแบบหมุนเข้ากับระบบปรับอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การเก็บตัวอย่างภายในถังหมักแบบหมุน

เก็บตัวอย่าง 3 จุด คือ (ก) ด้านหน้าสุดของถัง, (ข) จุดกึ่งกลางถัง และ (ค) ด้านหลังสุดของถังหมัก และนำมาหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงในรูปที่ 3.5



(ก) (ข)

รูปที่ 3.5 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในถังหมัก (ก) ภาพตัดขวาง และ (ข) ภาพมุมบน

3.2.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดย ใส่ PDA (Potato dextrose agar) ในอัตราส่วน 39 กรัมต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาพักให้เย็น และใส่จานเพาะเชื้อ รอให้แข็งตัว แล้วนำเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเข้าตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 30 °ซ รอการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บสปอร์ โดยใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 5×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.5 การเตรียมซับสเตรท

นำกากมะพร้าวไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นปรับความชื้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ

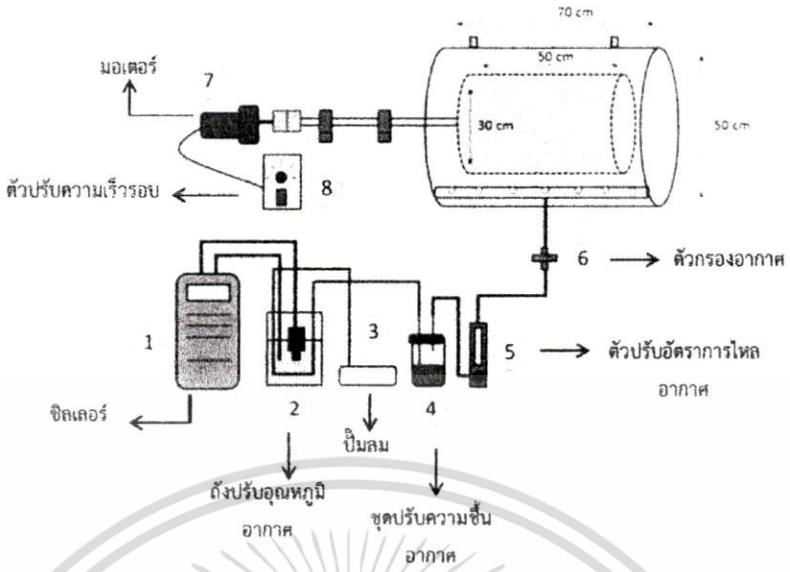
3.2.6 การหมัก

3.2.6.1 การหมักเพื่อหาอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสม ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 20 มิลลิลิตร อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ศึกษาคือ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 ปริมาณเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 เริ่มต้นแต่ละการทดลอง 1×10^{6} สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทร้อยละ 60 (ฐานเปียก) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ โดยตู้บ่ม ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

3.2.6.2 การหมักเพื่อหาอัตราการเติมอากาศด้วยถังหมักแบบหมุน

ทำการหมักในถังหมักแบบหมุนโดยเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่อัตราส่วน 3:2 ศึกษาอัตราการเติมอากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 vvm (vvm คือ ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของกากมะพร้าวต่อนาที) น้ำหนักซับสเตรท 2.8 กิโลกรัม กำหนดความเร็วรอบเริ่มต้นในการหมุนของถังหมักเป็น 6 รอบต่อนาที ร้อยละของปริมาณเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 เริ่มต้นแต่ละการทดลอง 1×10^{6} สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าเท่ากับ 30 °ซ ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน (ระบบการควบคุมสภาวะการหมักในถังหมักแบบหมุน ดังรูป 3.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.6 รูป 2 มิติของถังหมักแบบหมุน

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ความชื้น

นำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักก่อนอบ จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}$ซ จนน้ำหนักคงที่ หลังอบนำไว้ในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักหลังอบ คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสมการที่ (3.1)

$$\text{ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)} = \frac{\text{มวลเปียกของวัสดุ (กรัม)} - \text{มวลแห้งของวัสดุ(กรัม)}}{\text{มวลเปียกของวัสดุ(กรัม)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำตัวอย่างจากการหมักมาอบจนน้ำหนักคงที่แล้วบดให้ละเอียดเก็บตัวอย่างมา 10 มิลลิกรัม และใส่กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น ร้อยละ 60 ต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปรับความความเข้มข้นให้เหลือร้อยละ 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 121 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับให้ค่าความเป็นกรดด่าง ให้เป็นกลาง โดยการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรโดยการเติมน้ำกลั่นจากนั้นแบ่งมา 0.5 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไนไตร ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร มา 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยมวลต่อปริมาตร มา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 3 นาทีจากนั้น เติม MBTH ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว และเติม เฟอริคคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์กลูโคซามีนโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณหา

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกลูโคซามีนจากสมการ (3.2) ซึ่งได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคซามีน ซึ่งได้จาก ดังแสดงในภาคผนวก ข.3

สมการมาตรฐาน

$$y = 0.0406x + 0.0071 \ (R^2 = 0.9806) \quad \textbf{(3.2)}$$

แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

แกน x คือ ค่าปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมกลูโคซามีนต่อมิลลิลิตร)

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.3)

$$\text{ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)} = \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีน(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการสกัด(มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)}} \quad (3.3)$$

3.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม กระดาษกรอง Advantec เบอร์ 1 ขนาด 2 × 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS

คำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสตามหลักของ The International Union of Biochemistry ในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังสมการที่ (3.4)

$$\text{Filter paper activity (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = 0.185 \times \quad (3.4)$$

*ค่า x ที่ได้จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคส

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.5)

$$\text{Filter paper activity (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)} = \frac{\text{Filter paper activity (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (3.5)$$

3.3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม CMC (Carboxymehylcellulose) ร้อยละ 2 ใน CH_3COONa ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็น จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

คำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสตามหลักของ The International Union of Biochemistry ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังสมการที่ (4)

CMC Unit (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = 0.185 x (3.6)

*ค่า x ที่ได้จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคส

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.7)

$$\text{Cellobiase activity (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)} = \frac{\text{CMC Unit (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (3.9)$$

3.3.5 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Beta-glucosidase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม CH_3COONa 2 มิลลิลิตร และเติมเซลลูโลไบโอส ที่มีความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ในสารละลาย CH_3COONa 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็น ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

คำนวณหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสตามหลักของ The International Union of Biochemistry ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังสมการที่ (6)

Cellobiase Unit (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = 0.185 x (3.8)

*ค่า x ที่ได้จากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคส

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.9)

$$\text{Cellobiase activity (ยูนิตต่อกรัมซับเตรทแห้ง)} = \frac{\text{Cellobiase Unit (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (3.9)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

หลังจากสกัดเอนไซม์จากกากมะพร้าวหมักด้วยการแช่สารละลายบัฟเฟอร์ CH_3COONa (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) นำสารละลายส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการยับยั้งปฏิกิริยา นำไปเขย่า 3 นาที จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 3, 6 หรือ 9 มิลลิลิตร (แล้วแต่ความเข้มของสารละลาย) แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959)

คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสจากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคส ดังนี้

สมการมาตรฐาน

ที่การเจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

$$y = 22.89x + 0.2133 \ (R^2 = 0.9803) \qquad (3.10)$$

ที่การเจือจางด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร

$$y = 14.906x - 0.0059 \ (R^2 = 0.9732) \qquad (3.11)$$

ที่การเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

$$y = 7.7103x + 0.0816 \ (R^2 = 0.9791) \qquad (3.12)$$

เมื่อ แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

แกน x คือ ค่าปริมาณความเข้มข้น (มิลลิกรัมกลูโคสต่อมิลลิลิตร)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน)

จากการหมักกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) เป็นเวลา 7 วัน ที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 นำไปวัดความชื้น ปริมาณกลูโคซามีน ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นดังนี้

4.1.1 ความชื้น

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลีลงในการหมัก (อัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:0) พบว่าหลังการหมักความชื้นมีการลดลงจากความชื้นเริ่มต้น โดยมีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 21.68 ± 15.60 (ฐานเปียก) ซึ่งพบว่าในอัตราส่วน 3:0 นี้ มีความชื้นต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการหมักโดยมีการเติมรำข้าวสาลี ดังรูปที่ 4.1 อาจเนื่องมาจากวัสดุแต่ละชนิดมีการดูดซับน้ำที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีในการหมัก หลังการหมักพบว่าความชื้นมีการลดลงจากตอนเริ่มต้น และพบว่าเมื่อเติมรำข้าวสาลีลงไปในการหมักช่วยให้การดูดซับน้ำดีขึ้น โดยการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:1 พบว่าหลังการหมักความชื้นมีการลดลงจากเริ่มต้น โดยมีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.70 ± 13.08 เมื่อปรับอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:2 พบว่ามีความชื้นโดยเฉลี่ยตลอดการหมักใกล้เคียงกันเท่ากับร้อยละ 27.70 ± 13.08 และเมื่อทดลองปรับอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีให้เท่ากันคือที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:3 พบว่ามีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 26.70 ± 13.55 ซึ่งจากการเติมรำข้าวสาลีในการหมักมีความชื้นที่สูงกว่าแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) ดังรูปที่ 4.1

ซึ่งความชื้นที่ลดลงระหว่างการหมัก อาจเนื่องมาจากผลของการหายใจของเชื้อรา ทำให้เกิดความร้อนขึ้นระหว่างการหมัก และในการหมักในขวดทดลองรูปชมพู่ไม่มีการระบายความร้อนของซับสเตรทที่เพียงพอ เมื่อมีความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้น้ำมีการระเหยออกไปจากซับสเตรท

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.1.2.1 การเจริญของเชื้อรา

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:0 เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 โดยการหาปริมาณกลูโคซามีน ในตัวอย่างกากมะพร้าวบดแห้ง พบว่าที่การเริ่มของการหมักมีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นเท่ากับ 55.97 ± 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และในวันที่ 5 ของการหมักพบว่า เชื้อรามีการเจริญสูงที่สุด วัดปริมาณกลูโคซามีนได้ 75.96 ± 21.55 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง (ดังรูปที่ 4.2)

ในการหมักโดยมีการรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้เชื้อรา พบว่าเชื้อรามีการเจริญเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเชื้อราสูงสุด จากการวัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 73.54 ± 1.60 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 253.67 ± 14.96 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ถัดมาเป็นอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อลำข้าวสาลีที่ 3:2 และ 3:1 ตามลำดับ โดยการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 64.92 ± 3.85 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง วัดการเจริญสูงสุดของเชื้อราได้ในวันที่ 6 ของการหมัก มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 157.36 ± 23.29 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:1 วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 55.97 ± 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง มีการของเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการหมัก มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 75.96 ± 21.55 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ซึ่งจากปริมาณกลูโคซามีนที่วัดได้จากการเติมรำข้าวสาลีทั้ง 3 อัตราส่วนคือ 3:1, 3:2, และ 3:3 มีค่ามากกว่าที่อัตราส่วน 3:0 แสดงว่าเชื้อรามีการเจริญที่การหมักแบบมีการเติมรำข้าวสาลีดีกว่าไม่มีการเติมรำข้าวสาลี ดังรูปที่ 4.2

4.1.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา (Specific growth rate)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณกลูโคซามีน โดยใช้การคำนวณจากสมการ การเจริญของเชื้อราที่ระยะ exponential (สมการที่ 2.2) ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองพบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:2 และ 3:1 ตามลำดับ โดยในการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:0 มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$)
3:0	0.024
3:1	0.034
3:2	0.062
3:3	0.091

4.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.06 ± 0.16 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:1 และ อัตราส่วน 3:3 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:2 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.23 ± 0.08 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:3 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.19 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 1 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสสูงกว่า (รูปที่ 4.3) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

4.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.027 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:1 และ อัตราส่วน 3:3 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:2 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.21 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัม ซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:3 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.17 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงกว่า (รูปที่ 4.4) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

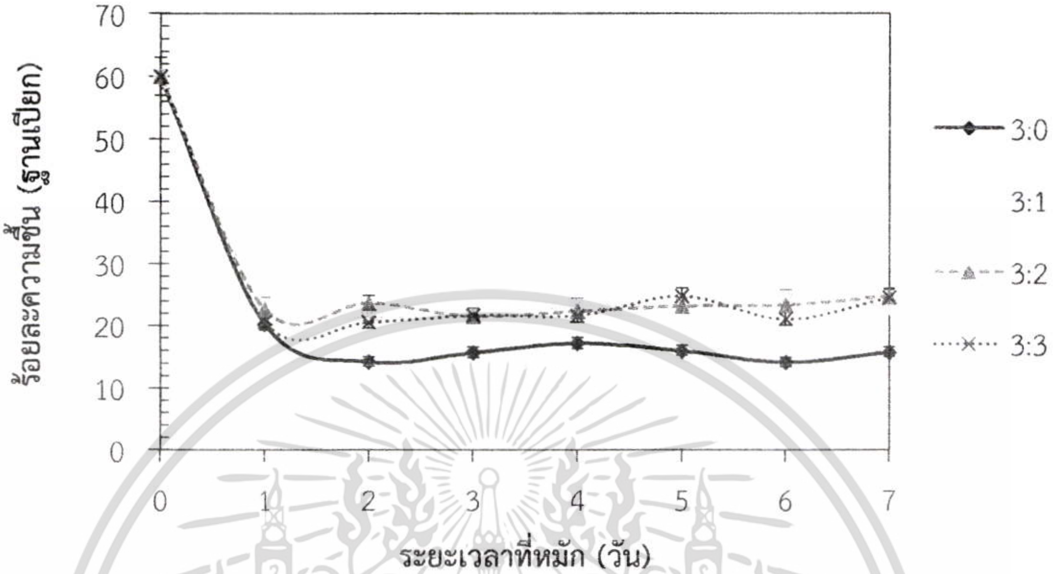
4.1.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 0.37 ± 0.2 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

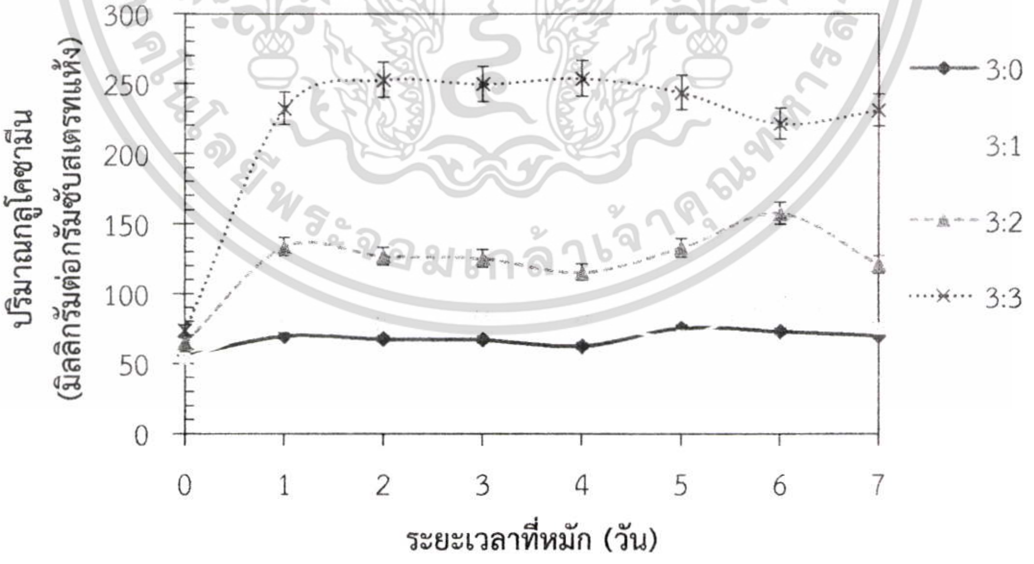
ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:2 และ อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:3 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.00 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:2 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนสิทธิ์เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่า (รูปที่ 4.5) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

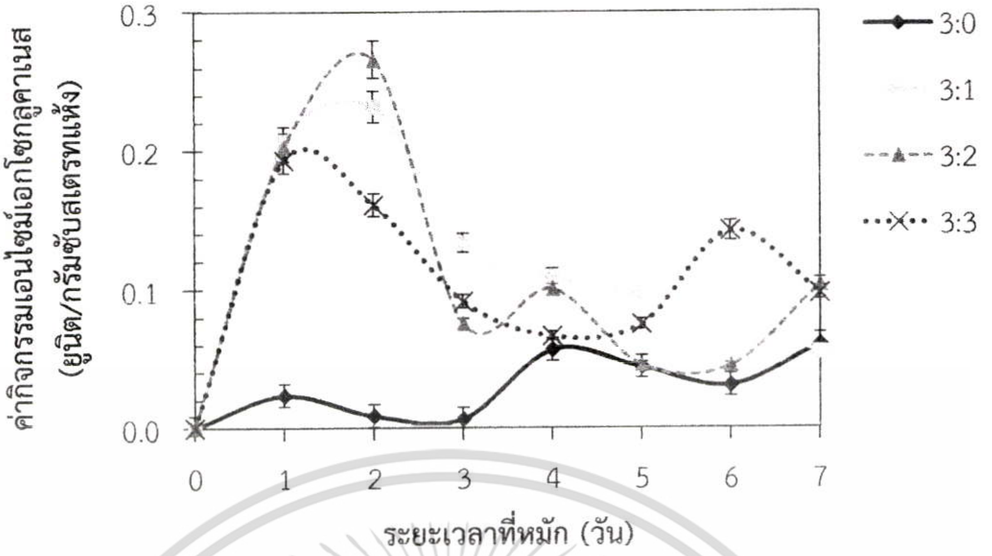


รูปที่ 4.1 ความชื้นระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

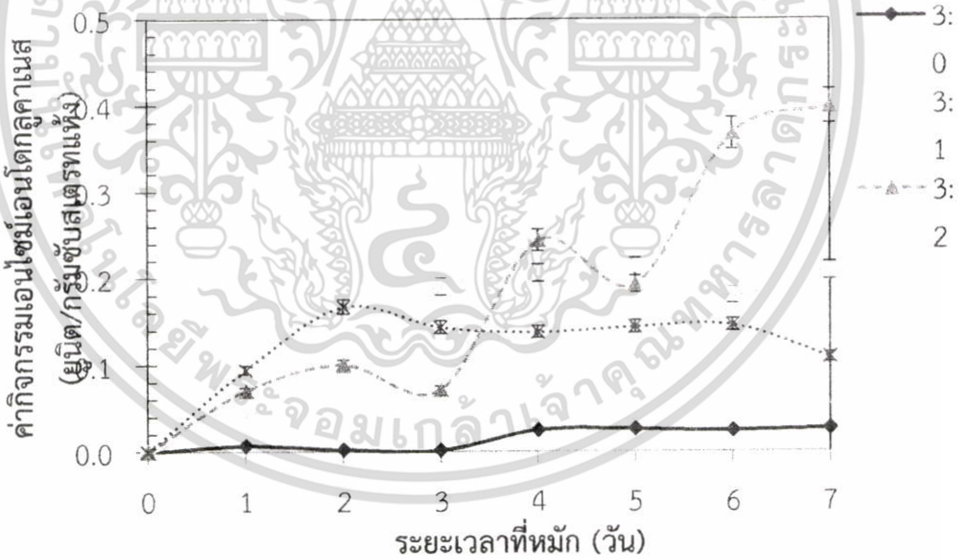


รูปที่ 4.2 ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

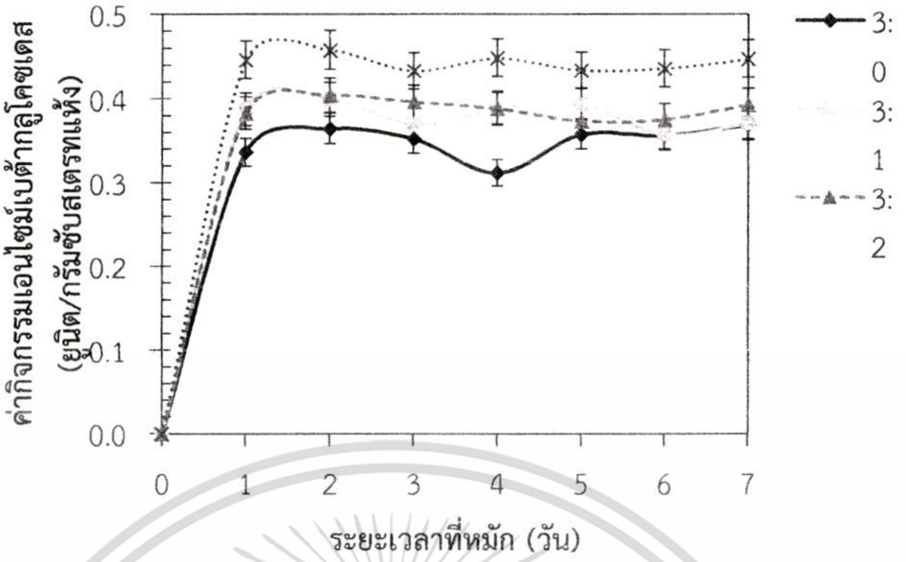


รูปที่ 4.3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3



รูปที่ 4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

4.2 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราการเติมอากาศ

จากการหมักกากมะพร้าวโดยเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 35 ลิตร โดยเลือกใช้อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 เป็นเวลา 5 วัน วัน มีการควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าที่ 30 °ซ ควบคุมความเร็วรอบที่ 6 รอบต่อนาที ความชื้นเริ่มต้นในการหมักเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) อัตราการเติมอากาศที่ศึกษาคือ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm นำไปวัดความชื้น ปริมาณกลูโคซามีน ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นดังนี้

4.2.1 ความชื้น

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นพบว่าความชื้นมีการลดลงจากตอนเริ่มต้น โดยอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm มีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.48 ± 15.98 (ฐานเปียก) เมื่อทำการทดลองปรับอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm พบว่ามีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.97 ± 15.70 (ฐานเปียก) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm และเมื่อการทดลองหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยเพิ่มอัตราการเติมอากาศให้มีปริมาณมากขึ้น โดยปรับอัตราการเติมอากาศเป็น 1.5 vvm พบว่าความชื้นมีการลดต่ำลงมากที่สุด โดยวัดความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักได้เท่ากับร้อยละ 24.65 ± 17.44 (ฐานเปียก)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศความชื้นสูงกว่ากว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ โดยความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 28 ± 15.25 (ฐานเปียก) (ดังรูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงว่าการหมักแบบเติมอากาศในถังหมักแบบหมุนมีผลต่อความชื้น โดยการเพิ่มปริมาณอากาศในอัตราสูง มีผลทำให้ซับสเตรทมีความแห้งมากขึ้น และสูญเสียความชื้นไป

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.2.2.1 การเจริญของเชื้อรา

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 โดยการหาปริมาณกลูโคซามีน ในตัวอย่างกากมะพร้าวบดแห้ง พบว่าที่การอัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm มีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 79.70 ± 15.03 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 202.77 ± 87.18 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง, ที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 107.78 ± 37.69 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 161.06 ± 10.77 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 71.32 ± 6.08 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 151.12 ± 4.48 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการเจริญของเชื้อราต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 64.92 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 133.72 ± 4.76 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง (รูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ

อัตราการเติมอากาศ (vvm)	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$)
0 (หมักในขวดรูปชมพู่)	0.089
0.5	0.082
1.0	0.101
1.5	0.093

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา (Specific growth rate)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณกลูโคซามีน โดยใช้การคำนวณจากสมการ การเจริญของเชื้อราที่ระยะ exponential (สมการที่ 2.2) ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองพบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาคือ 1.5 , 0 และ 0.5 vvm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

4.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.09 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.44 ± 0.06 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.33 ± 0.07 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการผลิตไซม์เอกโซกลูคาเนสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก (รูปที่ 4.8)

แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสมากที่สุด

4.2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm และ 0.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.31 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.28 ± 0.09 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.33 ± 0.07 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ มีการผลิตไซม์เอนโดกลูคาเนสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.24 ± 0.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก (รูปที่ 4.9)

แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนสมากที่สุด

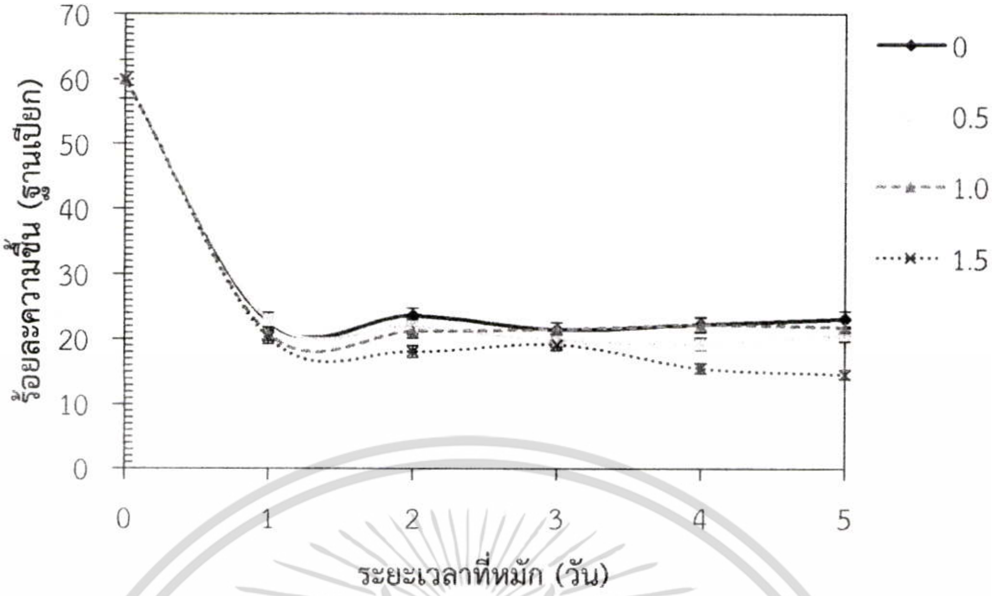
4.2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.54 ± 0.21 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก

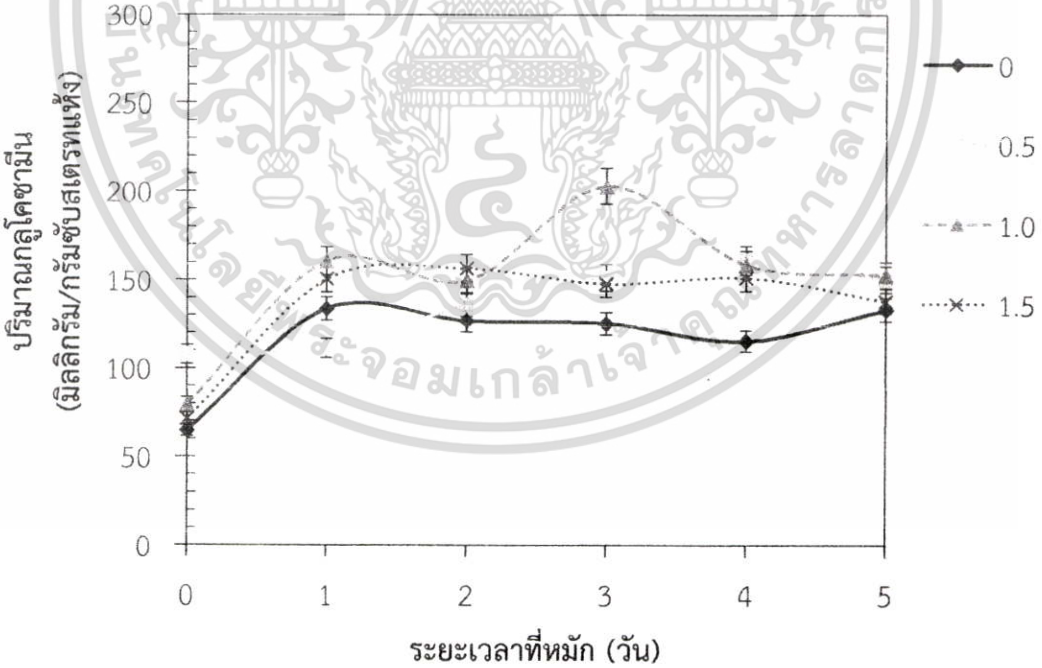
เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการผลิตไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศที่ 1.0 และ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก (รูปที่ 4.10)

แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนสมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

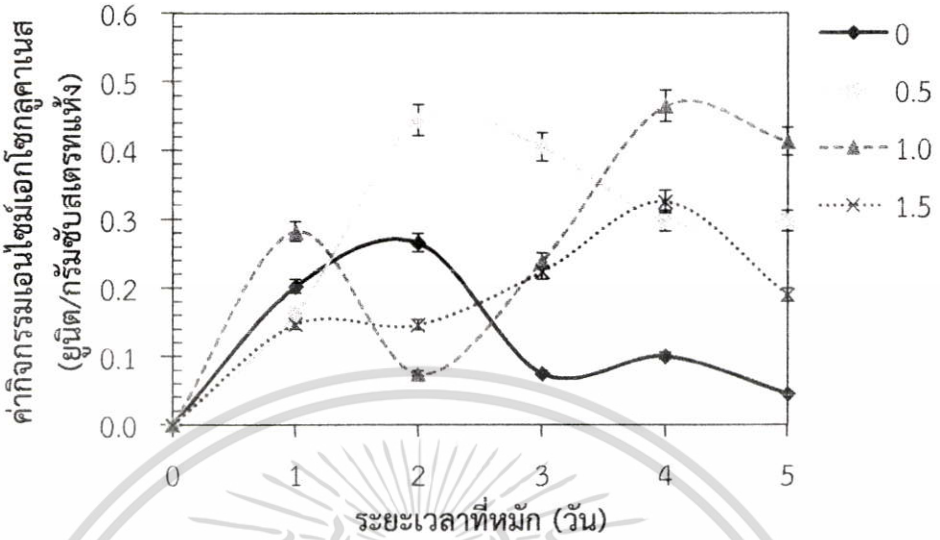


รูปที่ 4.6 ความชื้นระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

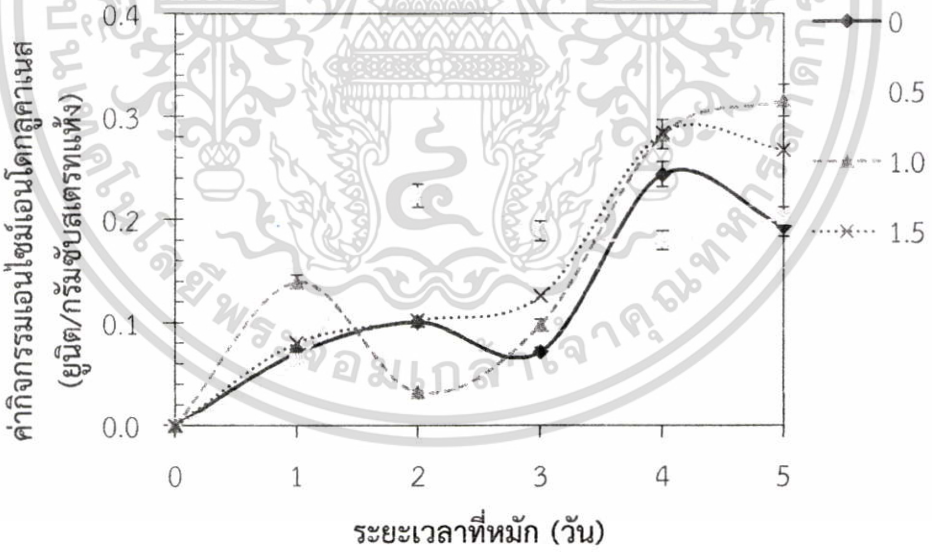


รูปที่ 4.7 ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

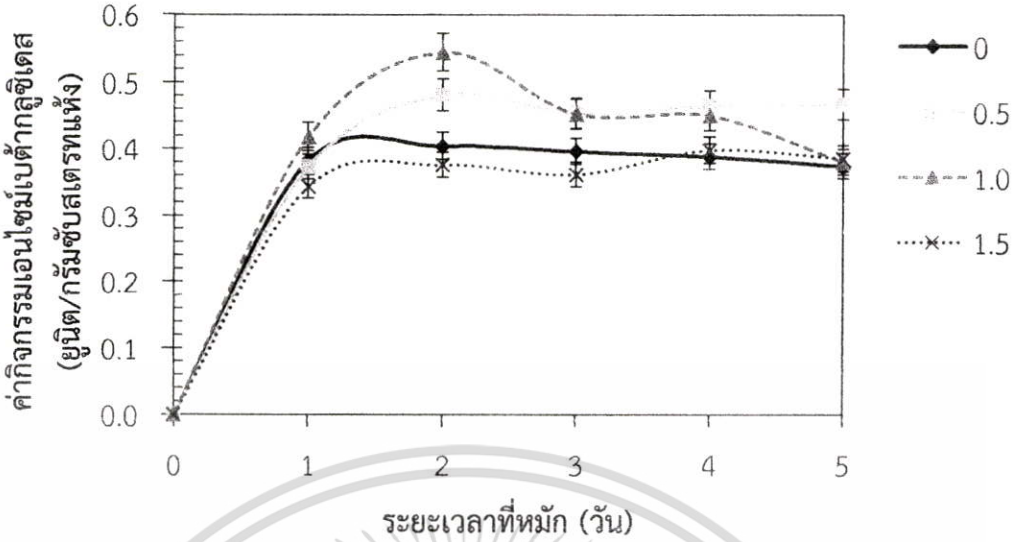


รูปที่ 4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm



รูปที่ 4.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การเติมรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในระหว่างการหมักนั้นส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา และอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080 โดยการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ในขณะที่อัตราส่วน 3:3 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูซิเดสและการเจริญของเชื้อรา เมื่อทำการทดลองการเติมอากาศในถังหมักแบบหมุนโดยการหมักในอัตราส่วนกากพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 พบว่าการเจริญและอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 ในขวดรูปชมพู่โดยไม่มีการเติมอากาศ พบว่าอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส รวมทั้งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080 อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปรุงชุดปรับความชื้นอากาศ โดยใช้ถังที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ให้สามารถบรรจุน้ำได้มากขึ้น ช่วยให้มีปริมาณที่มาก ไม่ต้องเติมน้ำบ่อย แต่ควรเติมระยะ เพื่อให้อากาศมีความชื้นตลอดเวลา
2. ในกระบวนการหมักควรมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา และควรระวังการปนเปื้อนในระหว่างทำการหมัก
3. ในการหมักในถังหมักแบบหมุน ควรเปลี่ยนตะแกรงรองซับสเตรทให้มีความถี่ของช่องน้อยลง เพื่อป้องกันการหกของซับสเตรทตามรูตะแกรงระหว่างที่ถังหมักมีการหมุนเพื่อกวนซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

งานประชุมวิชาการ: 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB2018), Tokyo, Japan January 18-20, 2018

หัวข้อ: Used of Copra waste and Wheat Bran for Cellulase Production by *Trichoderma Reesei* in Solid State Fermentation

เอกสารเผยแพร่: International Conference Proceedings Series by ACM (Scopus)

สถานะ: อยู่ระหว่างการตีพิมพ์

6.2 วารสาร ระดับนานาชาติ

ชื่อวารสาร: Journal of Chemical and Biochemical Quarterly (Impact factor 0.923)

ชื่อเรื่อง: Cellulase production by *Aspergillus niger* ACTT 16888 on copra waste from coconut milk process in layered-packed bed bioreactor

สถานะ: อยู่ระหว่างการแก้ไขครั้งที่ 1

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จุฑามาศ รธา. 2553. *การผลิตเอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อราที่แยกจากดิน*. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

จุรีรัตน์ สุดชะเน, ชนานันท์ หุตางกูร, ปิ่นหทัย ขำคมเขต และพวงผกา คุ้มสีไว. 2555. *การคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายชานอ้อยเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลโดย saccharomyces cerevisiae*. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

ชุติเดช เพิ่มศรีบรูสุข, ปริปก พศิสุวรรณ และกนก รัตนะกนกชัย. 2557. การศึกษาเชิงเปรียบเทียบการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่าน การกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma*. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีบางขุนเทียนกรุงเทพ

ธัญรัตน์ สหายา, จรัญ ฉัตรมานพ และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2551. *การพัฒนาถังหมักแพคเบดเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอมไซม์โปรติเอสสำหรับการหมักแบบแห้ง*. ภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน.

เนริสา คุณประทุม. 2543. *การผลิตไซแลนเนสจาก Trichoderma reesei โดยวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร*. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ สิทธินันท์ ท่อแก้ว. 2551. *การผลิตเอนไซม์ไตรโคเดอร์มา รีสีอี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล*. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2560. *Cellulose/ เซลลูโลส* [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose. สืบค้นวันที่ 27 พฤษภาคม 2560.

ภูษิต สายแวว, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. *การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด*. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, ศูนย์ความเป็นเลิศด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมี และวัสดุขั้นสูง สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์.

มัณฑนา โคติบุญโล. 2545. การออกแบบระบบให้อากาศของถังหมักแบบหมุนสำหรับการหมักแบบแห้ง. ปริญญานวิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรา ศรีกัลยานุกูล, ฐูปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. *การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ*. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน.

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์. 2553. *การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อรา Bacillus subtilis และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม*. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่... ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมใจ ศิริโภค. 2537. *เทคโนโลยีการหมัก*. กรุงเทพมหานคร, ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สุภัตรา โอกระโทก. 2556. *ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักด้วยเชื้อรา Aspergillus oryzae เพื่อเป็นอาหารในไก่ไข่*. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อภิวิชญ์ ทองแก้วยวน และธนัญชนก ไชยรินทร. 2559 . การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา Metarhizium anisopliae PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ali, H. Kh. Q. and Zulkali, M. M. D. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation:A Review . School of Bioprocess Engineering, University Malaysia Perlis, Malaysia.

*Ben Chaabane, F. 2013. Modeling and optimization of cellulase production by Trichoderma reesei for lignocellulosic biorefineries.*Direction Chemical and Physical chemical apply.

Bhat, M.K. 2000. *Cellulase and related enzymes in biotechnology*. Food Materials Science Division, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich.

Chisti, Y. 1999. Fermentation (industrial). Department of Chemical Engineering, University of Almeria, Spain

Couto, R.S. and Sanroman, A.M. (2006). *Application of solid-state fermentation to food industry A review*. Journal of Food Engineering.

Klein, D.W., Lansing, M., Harlay, J. 2004. *Microbiology* . New York: McGraw-Hill

Narumon, S. 2008. *Effects of dried coconut meal in the diet on growth performance of broilers*. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University.

Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. Journal of Biochemical Engineering.

Tokuoka, M., Sawamura, N., Kobayashi, K. andMizuno, A., J. 2010. *Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of Aspergillus oryzae*. Journal of Bioscience and Bioengineering.

Yang, Z., Zhang, B., Chen, X., Bai, Z. and Zhang, H. 2008. *Studies on pyrolysis of wheat straw residues from ethanol production by solid-state fermentation.* Journal ofAnalytical and Applied Pyrolysis. Department of Chemical Engineering, university of Almeria, Spain.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

ก.1 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

ก.2 วารสารระดับนานาชาติ

ภาคผนวก ข สรุปการใช้จ่ายเงิน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.1 การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Participation and Presentation Certificate

for

2018 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2018)
Tokyo, Japan, January 18-20, 2018

Paper title: Uses of Copra Waste and Wheat Bran for Cellulase Production by Trichoderma Reesei in Solid State Fermentation

Presenter's name: Teerin Chysirichote (B0052)

Presenter's affiliation: King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

ICPS

Published by ACM

Session Chair

Organization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Uses of Copra Waste and Wheat Bran for Cellulase Production by *Trichoderma reesei* in Solid State Fermentation

Thammaratchai Kittanan
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520
Thailand
kittanan21@gmail.com

Lexpet Nareerat
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520
Thailand
nareerat0675@gmail.com

Kaisaard Sawwanit
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520
Thailand
ploy.sawwanit@gmail.com

Chysirichote Teerin
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Ladkrabang, Bangkok 10520
Thailand
+662-329-8356 Ext.12
teerin.ch@kmitl.ac.th

ABSTRACT

The potential use of copra waste from coconut pressing process for cellulase production by solid-state fermentation (SSF) was studied in this research. *Trichoderma reesei* TISTR3080 was cultivated at 30°C for 7 days on the copra waste (CW) with and without supplementary of wheat bran (WB) as a nitrogen source. The results showed that adding WB increased both the fungal growth and productions of cellulase including activities of total cellulase, CMCase and β-glucosidase. The fungal growth which was indirectly measured by glucosamine measurement increased from 0.33 d-1 in the CW without WB to 1.1 d-1 in the CW added WB at the ratio of 3:3. Moreover, adding WB to CW at the ratio of 3:3 accelerated the activity of β-glucosidase from 12.6 to 16.8 U/ g dry substrate at 1 d. However, supplementing CW with WB at the ratio of 3:2 enhanced the total cellulase activity and CMCase activity from 0.31 to 5.23 FPU/ g dry substrate at 2 d and 0.42 to 5.18 U/ g dry substrate at 6 d, respectively.

CCS Concepts

Information systems →Chemical and biochemical retrieval

Keywords

Cellulase production, solid state fermentation, Copra waste, *Trichoderma reesei*.

1. INTRODUCTION

Coconut is processed into many products such as coconut juice and coconut milk. One of by-product obtained from the coconut industry is copra waste which is from a pressing process of coconut milk up to 30% of its meat [1]. It is mostly used in animal feeds. Due to its limited essential amino acids [2], a few contents of it can be mixed in the feeds. This research aims to add value to this copra waste.

As the copra waste contains high cellulose [3] which is suitable for a cellulase production by fungi [4], it is interesting to investigate the potential use of this waste for a production of cellulose. The solid state fermentation (SSF) is selected for this research since its operation cost is cheaper than that of submerged fermentation due to a low energy requirement [5]. Moreover, cellulolytic enzymes have been currently used in many industries such as paper, detergent and energy industries [6, 7]. In food industry, cellulases are used with other enzymes such as pectinases in a clarification process of fruit juice [8, 9]. Although copra waste contains high cellulose which is a carbon source for fungi, a low content of protein may be the problem for the growth and the cellulase production of fungi because nitrogen is important to metabolisms of microorganism [6]. Roussos et al [10] reported that wheat bran was good sources of carbon and nitrogen for cellulase synthesis of fungi. This objective of this research is to study the potential use of copra waste for cellulase production and evaluate the effect of supplementation of wheat bran used as a nitrogen source into copra waste on the cellulase production and the fungal growth.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal Inoculum Preparation

Trichoderma reesei TISTR3080 was purchased from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research and treated according to the procedure provided by the TISTR. The spore suspension was prepared by cultivating the fungi on PDA at 30°C for 7 d and collecting the spores by scraping from the surface of PDA with sterilized water. After filtration, the obtained suspension using Whatman No.1 filter paper under aseptic condition, its spore concentration was adjusted to 10^6 spores/ ml by adding sterilized distilled water.

2.2 Solid Substrate Preparation

Copra waste (CW; cellulose 39.4%, hemicellulose 9.9%, lignin 16.3%, protein 6.5%) and wheat bran (WB; cellulose 18.5%, hemicellulose 51.8%, lignin 10.8%, protein 16.0%) obtained from

Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted without fee provided that copies are not made or distributed for profit or commercial advantage and that copies bear this notice and the full citation on the first page. Copyrights for components of this work owned by others than ACM must be honored. Abstracting with credit is permitted. To copy otherwise, or republish, to post on servers or to redistribute to lists, requires prior specific permission and/or a fee.
ICBBB 2018, January 18–20, 2018, Tokyo, Japan
© 2018 Association for Computing Machinery.
ACM ISBN 978-1-4503-5341-0/18/01…$15.00
https://doi.org/10.1145/3180382.3180392

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a local market was dried at 80oC for 6 h (4% moisture content). The substrate used in this study contained different ratios of CW and WB as 3:0, 3:1, 3:2 and 3:3. Before conducting the experiments, the moisture content of substrate was adjusted to 60% (w/w) by adding distilled water and autoclaved at 121°C for 30 min. The initial moisture content was calculated from the initial moisture content of dry copra waste, added spore suspension and distilled water. The substrate was used after cooling to room temperature in an aseptic area.

2.3 Solid State Fermentation

25 g substrate (dry solid 24 g) was filled in 250 ml Erlenmeyer flask and mixed with 2.4 ml spore suspension to obtain the concentration of spore in substrate 105 spores/ g dry substrate. 12 ml sterilized water was filled to adjust the final moisture content of substrate as 60% and gently mixed using a sterilized glass rod. Each flask was individually prepared to obtain the certain concentration of spore and the uniform mixing. Seven flasks containing substrate and spore of T. reesei were prepared for each experimental run. They were incubated at 30oC for 7 d. One flask was collected to analysis in 1 d interval. Each treatment was performed in triplicate.

2.4 Glucosamine Determination

10 mg of fermented copra waste was soaked in 60% sulfuric acid solution for 24 h and analyzed the glucosamine content by a colorimetric method [11]. The growth of T. reesei was presented as glucosamine content in dry fermented copra waste (mg/ g). The analyses were performed in triplicate

2.5 Enzyme Assay

The cellulase extraction procedure was modified from the method of Ang et al. [12]. ~ 4 g fermented immersed in 100 ml sodium acetate buffer (pH 6.5, 0.05 M) was stirred for 30 min. Then the clear solution was collected after filtrating through Whatman No.1 filter paper. Total cellulase activity was determined using the IUPAC standard procedure with Whatman no.1 filter paper [13] and expressed in FPU. The saccharification efficiency of cellulase was evaluated using CMC and presented in CMCase activity [13]. Also, β-glucosidase activity was measured using cellobiose as substrate [13]. The content of reducing sugar after enzymatic reaction was determined by DNS method

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Fungal Growth

The glucosamine contents in the fermented CW shown in Figure 1 represent the fungal growth of T. reesei during the SSF. The SSFs started with the initial glucosamine content as 56.0 ± 2.6 mg/g dry fermented which was from the initial spore suspension. In the SSF on the substrate containing CW without any WB addition, the measured glucosamine contents were 69.7 ± 4.3, 60.8 ± 4.1, 67.1 ± 8.1, 66.0 ± 7.5, 66.7 ± 6.7, 69.6 ± 5.3 and 69.8 ± 9.4 mg/ g dry fermented at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 d, respectively. The glucosamine content increased until 1 d and then maintained until the end of fermentation. The specific growth rate calculated from the growth phase (0 – 1 d) was 0.22 d^{-1}. The fungal growth increased in the SSF of substrate supplemented with WB; however, the highest values of measured glucosamine in all supplementing ratio were detected at the same time (1 d). The highest glucosamine contents in the SSF of CW:WB at the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3 were 86.2 ± 0.4, 133.7 ± 4.8 and 228.7±16.4 mg/g dry fermented, respectively. The specific growth rates of *T. reesei* increased from 0.22 d^{-1} in the SSF of sole CW to 0.33, 0.72 and 1.1 d-1 in the SSF of the CW supplemented with WB at the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3, respectively. The significant increasing rates of growth presented the importance of nitrogen source supplementation in CW for the fungal growth. It may be due to a low content of protein in CW (6.5% protein) which was not enough for the metabolism of T. reesei. Even if the specific growth rates calculated from all ratios of CW:WB were different, their patterns of growth curve were quite similar which exponential phases were detected at 1 d and became the stationary one until 7 d. The result indicated that the CW was not good to be a sole substrate for *T. reesei*. The fungi required more nitrogen source for their growth and metabolism.

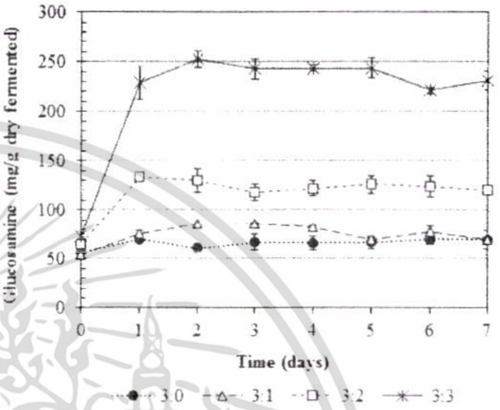


Figure 1. Glucosamine contents in the fermented copra waste supplemented with WB at different ratios during the SSF at 30°C for 7 d.

3.2 Production of Cellulase

The activities of total cellulase, CMCase and β-glucosidase are shown in Figure 2(A), 2(B) and 2(C), respectively. The lowest activities of total cellulase, CMCase and β-glucosidase were detected in the SSF of CW without WB. Its production rates of total cellulase, CMCase and β-glucosidase activities were 0.22 FPU/g dry substrate/d (0 – 4 d), 0.13 U/g dry substrate/d (0 – 1 d) and 12.6 U/g dry substrate/d (0 – 1 d), respectively. All results of cellulase activities in the SSF on the different ratio of CW and WB in substrate showed that supplementing WB in CW substrate enhanced all studied enzyme activities.

The rate of total cellulase activity increased from 0.22 FPU/g dry substrate/d in the SSF of a sole CW to 4.0, 3.9 and 3.7 FPU/g dry substrate/d in the SSF of the CW substrate supplemented with WB in the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3, respectively. Increasing the total cellulose activities in the SSF on all studied ratio of WB supplementary showed not significant; however, the difference was found in the changing characteristics of them after the highest production rates (0 - 1 d). The total cellulase activity in the SSF of CW:WB 3:3 rapidly decreased since 1 d to 4 d with the decreasing rate of 0.8 FPU/g dry substrate/d. In contrast, that of 3:1 ratio showed the slight increase after 1 d (0.4 FPU/g dry substrate/d) before decreasing with the same rate and that of 3:3 ratio (0.8 FPU/g dry substrate/d) until 7 d. The continuous increase of total cellulose activity after 1 d was found in the SSF of CW:WB ratio as 3:2 at the rate of 1.4 FPU/g dry substrate/d for 1 d, but after that it suddenly decreased with the decreasing rate of 3.8 FPU/g dry substrate/d on the 3 d and slowly continued decreasing until 7 d. It may be because the high concentration of nitrogen source created a stress depressing an enzyme synthesis [14]. The addition of WB in CW substrate induced the CMCase activity of cellulase. Supplementing CW with WB with the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

increased the rate of CMCase activities from 0.13 U/g dry substrate/d (no WB addition) to 1.18 U/g dry substrate/d (at 3 d), 0.86 U/g dry substrate/d (at 6 d) and 1.58 U/g dry substrate/d (at 2 d), respectively. The maximum CMCase activities obtained from the SSF of CW:WB as 3:1 and 3:3 were 3.63 ± 0.46 and 3.16 ± 0.66 U/g dry substrate which were not significantly different. Even if the maximum CMCase activity obtained from the SSF of 3:2 ratio (5.18 ± 0.12 U/g dry substrate) was higher than the others but it took longer time. This result was consistent with that of Idris et al. [15] indicating that adding WB into sorghu8m stover substrate induced both growth and CMCase in the SSF of *T. reesei*. In contrast to the total cellulose activity, they kept stable after reaching the maximum values.

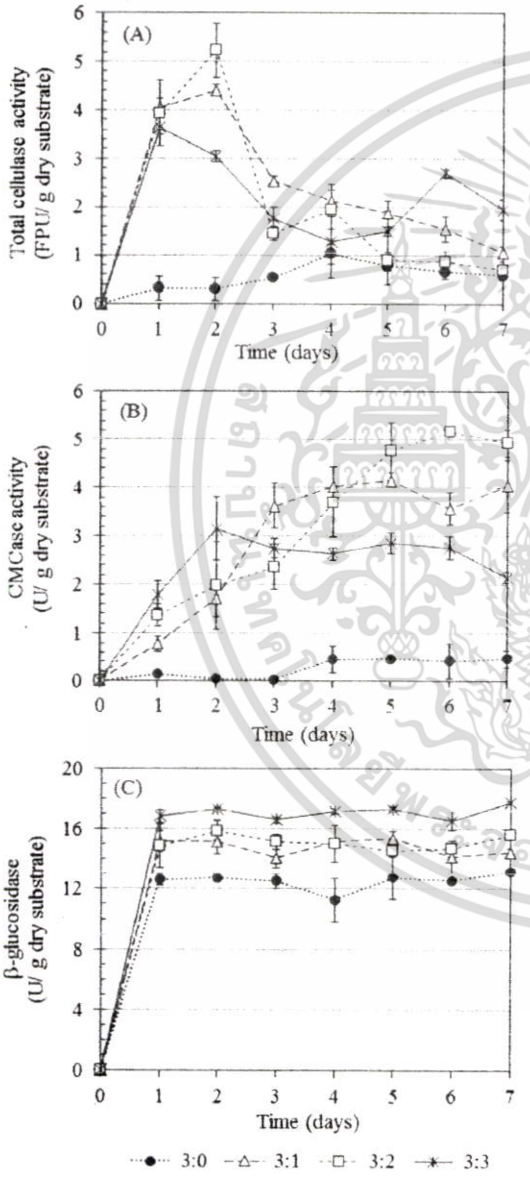


Figure 2. Cellulase activity analyzed from the fermented CW supplemented with WB at different ratios during the SSF at 30°C for 7 d. Exoglucanase activity (A); Endoglucanase activity (B); β-glucosidase activity (C).

Among analyzed cellulose activities, the most cellulose activity obtained from the SSF of the CW without WB was the β-glucosidase activities as 12.6 ± 0.4 U/ g dry substrate since 1 d. Supplementary of WB into CW substrate at the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3 increased the maximum β-glucosidase up to 15.2 ± 0.7, 15.9 ± 0.7 and 17.3 ± 0.2 U/ g dry substrate. The maximum values from different ratios of supplementary were obtained at the same time, 1 d. After 1 d or achieving the maximum values, they became stable until 7 d because β-glucosidases were themselves inhibited by their product glucose [16, 17].

Considering the fungal growth together with the production of cellulase, it seemed that the growth became stationary when the enzyme activities reduced. It might be because of the reduction of nutrients released from the substrate by enzymatic hydrolysis. Also, an accumulation of by-product from the SSF might act as inhibitors for enzymatic reaction. Supplementary of WB, a nitrogen source, increasing the fungal growth led to enhance the cellulase activities. It may be because the high content of fat in CW was reduced when adding WB resulting that the substrate was able to absorb moisture which was important to the fungal metabolism [18]. Moreover, WB contains high glutamic acid (2,874 mg/ 100 g) [19] which is essential for cellulase production [19] larger than that in CW (~1,574 mg/ 100 g) [19]. Increases of CMCase activity was slower than that of β-glucosidase which increased since 1 d because glucose produced from the activity of β-glucosidase inhibited endoglucanase expressed as CMCase [21] and β-glucosidase was less sensitive to high monosaccharide concentrations [22].

Since this research used the untreated CW, the activities of cellulase were lower than that from other researches. Xia et al. [23] obtained the cellulase activity up to 158 IFPU/g wet substrate from the SSF of *T. reesei* on the corncob waste from the xylose industry because the hemicellulose and its oligomers which inhibited cellulosic enzymes was partial removed, and some nutrients were added such as wheat bran, $(NH_4)_2SO_4$, urea, KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $CoCl_2$. Nevertheless, CW used in this research contained quite high content of lignin which was an inhibitor of cellulase as it adsorbed cellulase leading to reduce the accessibility of cellulase to substrate [24].

4. CONCLUSION

Copra waste has a potential use for cellulase production by *T. reesei* fermentation; however, a nitrogen source supplementary should be considered to enhance both biomass and cellulase productions. Adding wheat bran as a nitrogen source to copra waste at the ratio of 3:3 increased the activity of β-glucosidase and the fungal growth. While supplementing copra waste with wheat bran at the ratio of 3:2 enhanced the total cellulase and CMCase activities.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This research received funding from King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, which is sponsored by the National Research Council of Thailand (NRCT).

6. REFERENCES

[1] Raghavarao, K.S.M.S., Raghavendra, S.N., and Rastogi, N.K. 2008. *Potential of coconut dietary fiber. Indian coconut journal* [online]. pp.1-7, Available: http://www.coconutboard.in/docs/dietary Fibre.pdf.

[2] Atinyao, M.B., Roxas N.P. and Alcantara, P.F. 2001. Growth performance of pigs fed copra meal diets with or without

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

non-starch polysaccharide-degrading enzyme. *Philipp. J. Vet. Anim. Sci*. 27, 149-160.

[3] Ng, S.P., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K. and Mirhosseini, H. 2010. Extraction and characterization of dietary fiber from coconut residue. *J. Food Agric. Environ*. 8, 172-177.

[4] Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Awasthi, M.K. and Sarsaiya, S. 2010. Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *Int. J. Environ. Sci*. 1(4), 330-333.

[5] Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J*. 13, 81-84.

[6] Duan, X.Y., Liu, S.Y. and Zhang, W.C. 2004. Volumetric productivity improvement for endoglucanase of *Trichoderma pseudokoingii* S-38. *J. Appl. Microbiol*., 96(4), 772-776.

[7] Kuhad, R.C., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications (Review article). *Enzyme Res*., 1-8.

[8] Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv*, 18(5), 355-383.

[9] Shah, N. 2007. Optimization of an enzyme assisted process for juice extraction and clarification from litchis (*Litchi Chinensis Sonn.*). *Int. J. Food Eng*. 3(3), DOI= http://doi.acm.org/10.2202/1556-3758.1073.

[10] Roussos, S., Raimbault, M., Viniegra-Gonz, G., Saucedo-Castaneda, G. and Lonsane, B.K. 1991. Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micol. Neotrop. Aplicada*. 4, 83-98.

[11] Chysirichote, T., Takahashi, R., Asami, K. and Ohtaguchi, K. 2013. Effects of starch and protein on glucosamine content in the biomass of *Monascus ruber*. *J. Chem. Eng. Jpn*. 46(10), 695-698.

[12] Ang, S.K., Sha, E.M., Adibah, Y. and Suraini, A.A. 2013. Production of cellulase and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochem*. 48, 1293-1302.

[13] Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities." *Pure Appl. Chem*. 59, 257-268.

[14] Bradoo, S., Gupta, R. and Saxena, R.K. 1997. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochem*. 32, 135-139.

[15] Idris, A.S.O., Pansey, A., Rao, S.S. and Sukumaran, R.K. 2017. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresour. Technol*. 242, 265-271.

[16] Shewale, J.G. 1982. Beta-Glucosidase - its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int. J. Biochem*. 14, 435–443.

[17] Xiao, Z.Z., Zhang, X., Gregg, D.J. and Saddler, J.N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 113–116, 1115–1126.

[18] Pirota, R.D.P.B., Tonelotto, M., Delabona, P.S., Fonseca, R. F., Paixao, D.A.A., Baleeiro, F.C.F., Neto, V.B. and Farinas, C.S. 2016. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid state fermentation. *Braz. J. Chem. Eng*. 33(1), 21-31.

[19] USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28.

[20] Rodriquez-Gomez, D. and Hobley, T.J. 2013. Is an organic nitrogen source needed for cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut-C30?. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 29(11), 2157-2165.

[21] Chen, H., He, Q. and Liu, L. 2011. Cellulase production from the corn stover fraction based on the organ and tissue. *Biotech.Bioproc. E*. 16, 867-874.

[22] Hsieh, C.W.C., Cannella, D., Jorgensen, H., Felby, C. and Thygesen, L.G. 2014. Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem*. 62, 3800-3805.

[23] Xia, L. and Cen, P. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochem*. 34, 909-912.

[24] Qing, Q., Yang, B. and Wyman, C.E. 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour. Technol*. 101(24), 9624-9630.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.2 วารสารระดับนานาชาติ

2/15/2018 Paper Status » Chemical and Biochemical Engineering Quarterly

CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ENGINEERING QUARTERLY

Logout

Paper Status

- Home
- About
- Impressum
- Top Articles
- Past Issues
- News & Links
- Retracted
- Subscription
- Copyright Policy

Pohranjeno u digitalnom arhivu NSK

My articles

Title	Status	Options
Cellulase production by Aspergillus niger ACTT 16888 on copra waste from coconut milk process in layered-packed bed bioreactor	Returned to author	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cellulase production by *Aspergillus niger* ACTT 16888 on copra waste from coconut milk process in layered-packed bed bioreactor

Teerin Chysirichote*
Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Chalongkrung Rd., Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

* Corresponding author:
Teerin Chysirichote
Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1 Chalongkrung 1, Chalongkrung Rd., Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
Tel: +66-2329-8356 Ext.12, Fax: +66-2329-8356 Ext.13
E-mail address: teerin.ch@kmitl.ac.th

Abstract
Solid state fermentation has been used to produce value-added products from agricultural and food processing wastes but most SSF productions have been conducted in small scale due to a limitation of heat and mass transfer. This research aimed to reduce the temperature changes in packed bed bioreactor during the cellulase fermentation of *Aspergillus niger* ATCC16888 on copra waste from coconut milk process. Three configurations of bioreactor used in this study consisted of one- (control), two- and three-layered packed bed bioreactors. Total volumes of packed bed bioreactor and bed material were 127 and 57 L, respectively. The sterilized air 30°C was forced from the bottom of bioreactor at 0.20 vvm. The highest cellulase production (5.0 ± 0.4 U/gds) was obtained from the bottom zone of the three-layered bioreactor after fermenting 1 d. However, the greatest growth was found at the top one which was detected a large amount of aerial mycelium.

Keywords: cellulase, solid state fermentation, packed-bed bioreactor, *Aspergillus niger*

Introduction
Cellulase can be produced by solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF).[1] Although both bacteria and fungi can produce cellulase, the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* have been mostly used for commercial cellulase production[2]. Recently, many microorganisms have been studied for cellulase production from different agricultural materials such as soy residues[3], babassu cake[4], sugar cane bagasse [5] and Palmyra plam[6]. However, filamentous fungi are most suitable for SSF because they can grow and carry out their metabolisms in low moisture content condition[7].

Coconut, one of economic crops of Thailand has been used to produce many food products; for instance, coconut juice and coconut milk. Raghavarao et al.[8] reported that the copra waste was obtained from a pressing process of coconut milk up to 30% of its meat. To add value of this waste, a solid state fermentation (SSF) process is attractive due to low production cost. Since the copra waste containing high content of cellulose ~ 72%[9] which is a good substrate for a cellulose production by fungi[10], this research focused on using copra waste as a solid substrate for a fungal cellulase production by SSF because cellulolytic enzymes have been currently useful in many industries such as textile, paper, detergent and energy industries[11, 12]. However, most researches in SSF conducted experiments in laboratory scale such as flasks[2, 13 - 15], glass columns[16], plate bioreactor[17], bag bioreactor[18], etc. because of scale-up problems, especially an accumulation of heat generated by microbial respiration and other metabolisms[19] . One of bioreactor types which is easy and cheap to operate is a packed bed bioreactor. However, the main problem of using it is difficulties of parameter controls including temperature and moisture distribution within bioreactor[20] which is affected by porosity, bed height and fluid velocity [21], this work therefore aimed to increase the heat removal from packed bed bioreactor during the SSF of cellulase by *A. niger* by dividing the packed-bed into two and three layers and determine its effect on the fungal growth and the cellulase productions

Materials and Methods
Construction of bioreactors
The 127 L packed bed bioreactor (45 cm diameter and 80 cm height) was used to ferment the 57 L substrate in this research. To construct the bioreactors as in Fig. 1, the aluminium screen baskets that used as the substrate container were connected to the cylinder frame. The diameter of the baskets for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น โดยอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the control (CB), two-layered (2LB) and three-layered (3LB) bioreactors were the same as 45 cm but their heights were different as 36 cm (1 basket), 18 cm (2 baskets) and 12 cm (3 baskets), respectively. After filling the substrate in the baskets, they were fixed with the frame. The positions of the baskets were adjustable along the height of bioreactor but bolts. The 45.5 cm diameter aluminium tube with holes and plugs were made to cover the side of bioreactor and able to collect the fermented sample and measure the temperature during SSF. Then the aluminium lid punctured for air outlet was used to cover the bioreactor. The bioreactor was connected to the air pump. The SSF system was shown in Fig. 2

Fungal strain and inoculum preparation

The strain, *Aspergillus niger* ATCC 16888 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and treated according to the procedure provided by the ATCC. Its spore suspension was prepared by cultivating *A. niger* on PDA in 86-mm-diameter petri dish at 30°C for 7 d and collecting the spores using sterilized water. The suspension was filtrated using Whatman No.1 filter paper under aseptic condition. The concentration of spore in the suspension was adjusted to 10^6 spores/ ml by adding sterilized water.

Solid substrate preparation

Copra waste obtained from a local market was dried at 80°C for 6 h. It was packed in a closed container to prevent an oxidation from air and light, and then kept at lower 5 °C. 5 kg substrate containing 60% moisture was used for one batch of SSF. It was prepared by adding distilled water 2.8 kg into 2.0 kg dry copra waste and autoclaved at 121 °C for 30 min. and cooled to room temperature in an aseptic area. The sterilized substrate was mixed with 200 ml spore suspension (~ 0.2 kg, total spore number = 2 x 10^8) to achieve the 60% moisture content and 10^5 spore/ g dry substrate. The moisture content of substrate was measured using the moisture analyzer before the experiment.

Solid state fermentation

5 kg prepared substrate (total volume = 57 L) was filled in the studied packed bed bioreactors consisting of the CB, the 2LB, and the 3LB as shown in Fig. 1. Each bed in the 2LB contained the prepared substrate 2.5 kg or 28.5 L. Same total weight and volume of bed was applied in the 3LB which each bed was filled with the substrate 1.7 kg or 19 L. During 6 d fermentation, humidified air (30°C) sterilized by membrane filtration was forced from the bottom of bioreactor 0.2 vvm or 11.4 L/ min. ~ 10 g fermented sample (~ 2 g x 5 points) was random collected every 1 d for analyzing cellulase activity and fungal growth by a FPase assay and a glucosamine measurement, respectively. Each treatment was performed in triplicate. Temperatures of outlet air and beds in each layer were monitored during SSF using thermocouples connected to data logger. The positions to measure the temperature of each bed were shown in Fig. 1.

Enzyme extraction

Cellulase was extracted from the fermented sample according to the modified method of Ang et al.[22]. ~ 4 g fermented sample was soaked in 100 ml sodium acetate buffer (pH 6.5, 0.05 M) at room temperature (~25 °C) and stirred for 30 min. by magnetic stirrer. After filtrating through Whatman No.1 filter paper, the filtrate was used for FPase assay.

Analysis

Glucosamine determination for fungal growth

The amount of 10 mg of fermented copra waste was hydrolyzed by 60% sulfuric acid solution and analyzed the glucosamine content using a colorimetric method[23]. The standard solution was prepared using HCl-glucosamine solution with different concentrations. The growth of *A. niger* was reported as a glucosamine content in dry fermented copra waste (mg/g). The analyses were performed in triplicate. The values of glucosamine content was plotted against to the fermentation time and their values in the growth phase was used to calculated the specific growth rate using exponential equation as in Eq.1.

$$\frac{\partial X(t)}{\partial t} = \mu X(t) \quad (1)$$

when $X(t)$ is the glucosamine content (mg/g sample), t is the time (d) and μ is the specific growth rate (1/d) in the growth phase.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FPase assay

Cellulase activity (FPA) was analyzed according to Ghose[24]. 0.5 ml crude enzyme and 1.0 ml (0.05 M) citrate buffer pH 5.0 were added to test tubes containing 5 mg of Whatman No.1 filter paper (6 x 1 cm^2). The test tube was incubated in a water bath at 50 °C for 1 h. Then, 3 ml of 3,5- dinitrosalicylic acid was added into the tube and boiled for 15 min. to stop the reaction. After cooling to ambient temperature, its volume was fulfilled to 10 ml by adding distilled water and measured the absorbance of the filtered solution at 540 nm wavelength against a blank of sugar-free sample. Standard curve was conducted using a standard glucose solution with known concentration. One unit of enzyme activity was the amount of enzyme that released one micromole of glucose in one minute.

Results and Discussion

Temperature distribution in packed bed bioreactor

During the SSF, the temperatures of each bed in the studied bioreactors were measured as shown in Fig. 3. The bed temperature in the CB increased from 30.0 ± 0.5 °C at the beginning to the maximum one as 52.0 ± 3.0 °C at 1 d and slowly decreased to 38.2 ± 1.6 °C at 6 d. The temperature at the center of the CB was higher than the lower and upper positions all the time of SSF. To decrease the temperature on the bed, the bed of the CB was divided into two and three beds as in the 2LB and 3LB. The temperatures in both layers in the 2LB (2LB-bottom and 2LB-top) were slightly decreased from that in the CB. The highest temperature in the 2LB-bottom and 2LB-top were 48.7 ± 0.8 °C at 1d and 50.4 ± 1.9 °C at 2 d and reduced to 37.5 ± 0.8 °C and 37.8 ± 1.1 °C at 6 d, respectively. For the 3LB, it was found that all temperatures of three beds were quite similar. The bed temperature of each bed in the 3LB measured 1 d changed from 30.0 ± 0.5 °C (t = 0 d) to 51.5 ± 1.5, 51.5 ± 1.2 and 51.3 ± 1.0 °C for the 3LB-bottom, -middle and -top, respectively. From all studied packed bed bioreactors, the maximum temperatures were around 50 °C found at 1 d, except that in the 2LB-top which increased until 2 d. The most reduction rate of temperature (highest slope of decreasing temperature in Fig. 3(c)) was detected in the 3LB. It was found that more heat in the 3LB was removed by flowing air since the highest temperature of outlet air of it (43.5 ± 2.1 °C) was higher than that of the CB (37.0 ± 1.5 °C) and the 2LB (39.1 ± 1.9 °C at 2 d). It indicated that dividing packed bed increased a heat removal in a packed bed bioreactor due to a reduction of bed compaction.

Growth of *A. niger*

The fungal growth of *A. niger* shown in Fig. 4 was reported as a content of glucosamine in fermented substrate. The highest glucosamine content of the sample from the culture in the CB was found at 2 d as 76.9 ± 11.5 mg/ g. which could be calculated its specific growth rate from 0 - 1 d as 7.7 /d. The growth phase changed to the stationary one after 2 d. For SSF in the 2LB, the fungal growth separately measured in each layer showed the maximum glucosamine contents in the fermented samples were detected at 2 d as 73.9 ± 8.6 and 84.2 ± 5.9 mg/g; however, their growth phases from 0 - 1 d showed the specific growth rates as 7.1 and 8.3 /d for the 2LB-bottom and -top, respectively. The characteristics of growth curves obtained from the lower (2LB-bottom) and upper (2LB-top) beds of the two-layered bioreactor which were similar to that from the CB. The highest glucosamine content in the fermented samples from the control was not significantly different from both layers of the 2LB. The different fungal growth in different layers in the bioreactor was clearly presented in the 3LB as in Fig.4(c). The maximum glucosamine contents in the cultures in each bed of the 3LB 33.3 ± 3.7 mg/g at 1 d, 62.4 ± 6.8 mg/g at 2 d and 67.4 ± 5.4 mg/g at 1 d for the 3LB- bottom, 3LB-middle and 3LB- top, respectively. The highest specific growth rate found from the 3LB was 8.8 /d analyzed from the 3LB-top. Even if the maximum glucosamine contents in the fermented samples from the 3LB-bottom and –middle were different, their specific growth rates were similar as 8.1 /d.

Obviously, the higher amount of aerial mycelium which observed by white color of *A. niger* mycelium was found in the higher bed position of bioreactor including the top of the CB, the 2LB-top and the 3LB-top. Therefore, the large amount of glucosamine in the samples cultured on the higher position of the bioreactor might come from the growth of aerial mycelium of *A. niger*. As a role of aerial mycelium related to oxygen supply [25-27], it could be implied that low partial pressure of oxygen occurring at the top of bioreactor enhanced aerial mycelium generation in order to increase oxygen supply.

The results of the bed temperatures in Fig. 3 show the direct correlation between the bed temperature and the fungal growth. When the temperature reached around 50 °C, the growth stopped and then decreased (death phase) because the fungal hyphal branching decreased at the temperature higher than

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

45 °C[28]. After the growth stopped, the temperature of all beds decreased due to a decrease of heat generation from fungal respiration[29]. The decrease in glucosamine content indicated the self-degradation of fungi which the fungal cell was destroyed by many fungal self-produced enzymes including cellulase[30] and the glucosamine obtained from a degradation of chitin was used as carbon and nitrogen sources for the next generation of *A. niger*. Moreover, the new spores of *A. niger* were detected in the substrate on the 4 - 5 d causing the increasing content of glucosamine on the 6 d.

In addition, the fungal growth without the degradation of glucosamine was only found in the SSF at the 3LB-bottom because of the low moisture content of substrate which was not suitable for its growth and metabolisms. Selvakumar et al.[31] also reported that the optimum initial moisture content for the growth of *A. niger* on tea waste about 60% and found that the growth decreased when initial moisture content was lower than 45%. As shown in Fig. 5, the lower moisture content of substrate was found at the layer near the bottom because the aeration was forced at the bottom of bioreactor leading the moisture transfer from the bottom bed to the top bed of bioreactor.

Cellulase (FPase) activity

The cellulase production of *A. niger* in Fig. 6 shows that the maximum FPase activity obtained from the CB was only 0.36 ± 0.03 U/gds at 2 d, while that in the 2LB-bottom and -top were higher as 2.81 ± 0.22 and 2.55 ± 0.18 U/gds, respectively. Even if the FPase activity measured from the bed of the 2LB-bottom was significantly higher than that of the 2LB-top, the time reaching the maximum value delayed 1 d. According to the results of temperature in Fig.3, the FPase activity corresponded to the change of bed temperature. When the bed temperature increased to 50 °C which was the maximum value, the FPase activity in the fermented samples decreased. This phenomenon was also occurred in the 3LB. The highest FPase activity in the 3LB was detected in the 3LB-bottom as 5.01 ± 0.41 U/gds followed by that in the 3LB- middle and the 3LB-top as 4.13 ± 0.21 and 3.75 ± 0.34 U/gds. The results obtained from the 3LB clearly showed that the largest cellulase production was obtained in the bottom layer, larger than that in the middle and top ones. Since the aeration was forced from the bottom of bioreactor, the air in the bottom zone contained higher oxygen concentration that reduced along the height of bioreactor due to a fungal respiration which oxygen was utilized. It showed the importance of oxygen for cellulase production. Even if the highest biomass production was detected at the top of the bioreactor, the highest cellulase production was found at the bottom. It might be because the aerial mycelium did not support the cellulase production. The results accorded with the work of Rahardjo et al.[31] indicating that the secretion of the enzyme increased in the cultivation without aerial mycelium. Dividing substrate bed into many layers reduced a compactness of bed that was caused by the mass of upper bed, leading to an increase a possibility of fungi to contact oxygen in forced air.

Conclusion

Copra waste from coconut milk process was a good substrate for cellulase fermentation by *A. niger*. The most important factors were the controls of bed temperature, water migration and oxygen concentration. Using multi-layer packed bed bioreactor help increase the heat removal and consequently the cellulase production increased. A quality of air forced through the bed along a packed bed should be adjusted in order to get higher production yield of cellulase from all layers of a multi-packed bed bioreactor. The thickness of bed should be consider to related with the temperature and moisture uniformity and oxygen partial pressure of the forced air.

Acknowledgement

This work is supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang [2560A11802042].

References

1. *Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Pandey, A.*, Microbial cellulases - production, applications and challenges, J. Sci. Ind. Res. **64** (2005) 832.
2. *Yoon, L.W., Ang, T.N., Ngoh, G.C., Chua, A.S.M.*, Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production, Biomass Bioenerg. **67** (2014) 319.
3. *Heck, J.X., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z.*, Cellulase and xylanase production by isolated amazon *bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation, Braz. J. Microbiol. **33** (2002) 213.
4. *Castro, A.M., Castilho, L.R., Freire, D.M.G.*, Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*, Biochem. Eng. J. **93** (2015) 303.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. *Long, C., Ou, Y., Guo, P., Li, Y., Cui, J., Long, M., Hu, Z.*, Cellulase production by solid state fermentation using bagasse with *Penicillium decumbens* L-06, Ann. Microbiol. **59** (2009) 517.
6. *Roopa, R., Charulatha, M., Meignanalakshmi S.*, Production of cellulase from *Bacillus subtilis* under solid- state fermentation using fiber wastes of palmyra palm, Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. **6(6)** (2017) 2225.
7. *Bhargav, S., Sanjrani, M.A., Javed, S.*, Solid-state fermentation: an overview, Chem. Biochem. Eng. Q. **22** (2008) 49.
8. *Raghavarao, K.S.M.S., Raghavendra, S.N., Rastogi, N.K.*, Potential of coconut dietary fiber, Coconut Journal **51** (2008) 2.
9. *Ng, S.P., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., Mirhosseini, H.*, Extraction and characterization of dietary fiber from coconut residue, J. Food Agric. Environ. **8** (2010) 172.
10. *Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Jamaluddin, Awasthi, M.., Sarsaiya, S.*, Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation, Int. J. Environ. Sci. **1** (2010) 656.
11. *Duan, X.Y., Liu, S.Y., Zhang, W.C., Zhang, Q.X., Gao, P.J.*, Volumetric productivity improvement for endoglucanase of *Trichoderma pseudokoingii* S-38, J. Appl. Microbiol. **96** (2004) 772.
12. *Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A.*, Microbial cellulases and their industrial applications (Review article). Enzyme Res. (2011) 1.
13. *Krishna, C.*, Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes, Bioresource technol. **69** (1999) 231.
14. *Sun, H.Y., Li, J., Zhao, P., Peng, M.*, Banana peel: A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation, Afr. J. Biotechnol. **10** (2011) 17887.
15. *Zhao, S.H., Liang, X.H., Hua, D.L., Ma, T.S., Zhang, H.B.*, High-yield cellulose production in solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* SEMCC-3.217 using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), Afr. J. Biotechnol. **10** (2011) 10178.
16. *Deshpande, S.K., Bhotmange, M.G., Chakrabarti, T., Shastri, P.N.*, Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), Indian J. Chem. Techn. **15** (2008) 449.
17. Umsza-Guez, *M.A.*, Diaz, *A.B.*, de Ory, *I.*, Blandino, *A.*, *Gomes, E., Caro, I.*, Xylanase production by *Aspergillus awa*mori under solid state fermentation conditions on tomato pomace, Braz. J. Microbiol. **42** (2011) 1585.
18. *De la Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Hernandez-Castillo, D., Hernandez-Castillo, R., Itzel López-López, L., Castillo, F., Noé Aguilar, C.*, Solid-state fermentation in a bag bioreactor: effect of corn cob mixed with phytopathogen biomass on spore and cellulase production by *Trichoderma asperellum*, in Faustino Jozala, A. (Ed.), Fermentation processes, Intechopen Publ., 2017, doi: 10.5772/64643
19. *Ghildyal, N.P., Gowthaman, M.K., Rao, K.S., Karanth, N.G.*, Interaction between transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients, Enzyme Microb. Technol. **16** (1994) 253.
20. *Ashley, V.M., Mitchell, D.A., Howes, T.*, Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors, Biochem. Eng. J. **3** (1999) 141.
21. *Geankoplis, C.L.*, Transport processes and separation process principles (Includes unit operations), Prentice-Hall, New Jercy, 2003, pp 114-174.
22. *Ang, S.K., Shaza, E.M., Adibah, Y., Suraini, A.A., Madihah, M.S.*, Production of cellulase and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation, Process Biochem. **48** (2013) 1293.
23. *Chysirichote, T., Takahashi, R., Asami, K., Ohtaguchi, K.*, Quantification of the glucosamine content in the filamentous fungus *Monascus ruber* cultured on solid surfaces, J. Basic Microbiol. **54** (2004) 350.
24. *Ghose, T.K.*, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. **59** (1987) 257.
25. Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Le Comte, E.P., Tramper, J., Rinzema, A., Contribution of aerial hyphae of Aspergillus oryzae to respiration in a model solid-state fermentation system, Biotechnol. Bioeng. 8 (2002) 539.
26. Rahardjo, Y.S.P., Korona, D., Haemers, S., Weber, F.J., Tramper, J., Rinzema, A., Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system, Lett. Appl. Microbiol. 39 (2004) 504.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27. Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Haemers, S., Tramper, J., Rinzema, A., Aerial mycelia of Aspergillus oryzae accelerate α-amylase production in model solid-state fermentation system, Enzym. Microb. Tech. 36 (2005) 900.
28. Ordaz-Hernández, A., Ortega-Sánchez, E., Montesinos-Matías, R., Hernández-Martínez, R., Torres-Martínez, D., Loera, O., Morphological and enzymatic response of the thermotolerant fungus Fomes sp. EUM1 in solid state fermentation under thermal stress, FEMS Microbiol. Lett. 363 (2016), doi: 10.1093/femsle/fnw177.
29. Maier, R.M., Gentry, T.J., Physiological methods, in Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J. (Eds.), Environmental Microbiology (Third edition), Elsevier Inc., California, 2015, pp 213-244.
30. Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V., Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 (2012) 533.
31. *Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A.*, Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate, Bioresource Technol. **65** (1998) 83.

Figure captions

Figure 1 Configurations of packed-bed bioreactors used in this studied: (a) control packed bed bioreactor, CB; (b) two-layered packed bed bioreactor, 2LB; (c) three-layered packed bed bioreactor, 3LB

Figure 2 Symtem of solid state fermentation in this research

Figure 3 Temperatures of beds and outlet air during SSF of *A.niger*. (a) in the control packed bed bioreactor; (b) in the two-layered packed bed bioreactor; (c) in the three-layered packed bed bioreactor.

Figure 4 Glucosamine contents in fermented substrate. The glucosamine contents represented the fungal growth. (a) in the control packed bed bioreactor; (b) in the two-layered packed bed bioreactor; (c) in the three-layered packed bed bioreactor.

Figure 5 Moisture contents of fermented substrate. (a) in the control packed bed bioreactor; (b) in the two-layered packed bed bioreactor; (c) in the three-layered packed bed bioreactor.

Figure 6 Cellulase production of *A. niger* in the SSF. (a) in the control packed bed bioreactor; (b) in the two-layered packed bed bioreactor; (c) in the three-layered packed bed bioreactor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สรุปการใช้จ่ายเงิน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญญาเลขที่ A118-0260-042 ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 31 มีนาคม 2561

ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รายงานสรุปการเงิน

ชื่อโครงการ: การใช้กากมะพร้าวจากการคั้นกะทิในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยการหมัก แบบอาหารแข็ง
(Use of copra waste from coconut milk process for cellulose production by solid state fermentation)

ชื่อหัวหน้าโครงการ: นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

สรุปรายจ่ายในโครงการ

รายการ	รายการรับ - จ่าย		
	รับ	จ่าย	คงเหลือ
งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)	495,000.00		
จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 85%)	420,750.00		104399.78
จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 15%)	74,250.00		0.00
หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)		316,350.22	
ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)		178,649.78	
งบประมาณคงเหลือ	495,000.00	495,000.00	**0.00**

จำนวนเงินที่ได้รับ รายจ่าย และจำนวนเงินคงเหลือแต่ละงวด และสะสม

หมวด (ตามสัญญา)	รายจ่าย งวดที่ 1 (1)	รายจ่าย งวดที่ 2 (2)	รายจ่าย สะสม (3)	งบประมาณ ที่ตั้งไว้ (4)	งบประมาณ คงเหลือ/ เกิน (5) = (4) - (3)
1. ค่าใช้สอย	47,809.00	52,191.00	100,000.00	100,000.00	0.00
2. ค่าวัสดุ	268,541.22	126,458.78	395,000.00	395,000.00	0.00
รวม	316,350.22	178,649.78	495,000.00	495,000.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ นางสาวธีรินทร์ ฉายศิริโชติ
Miss Teerin Chysirichote
2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1018 01548 408
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
1 ถนนฉลองกรุง 1 แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กทม.10520
โทรศัพท์ที่ทำงาน: 02-329-8356 ต่อ
โทรสาร 02-329-8356 ต่อ 13
E-mail: kcteerin@kmitl.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	คุณวุฒิ และสถาบัน
2556	ปริญญาเอก (Doctor of Engineering, Chemical Engineering) Tokyo Institute of Technology, Tokyo
2553	Research student (6 months) Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan
2549	ปริญญาโท (วศ.ม. วิศวกรรมอาหาร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ
2546	ปริญญาตรี (วท.บ. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

6. ประสบการณ์การทำงานวิจัย

6.1 ชื่อโครงการ: "การพัฒนาศักยภาพของผู้ประกอบการขนาดเล็กและขนาดกลางในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง : ผู้ประกอบการน้ำพริกแกง แกงส้ม และแกงกะทิ (กลุ่มที่ 2), สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.), 2560.

6.2 ชื่อโครงการ: "โครงการ "รูปแบบการเติมอากาศในถังหมักประเภท packed bed ในการผลิตสารสีของเชื้อรา Monascusด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง", ทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล. ประจำปี 2558

6.3 ชื่อโครงการ: "การพัฒนากระบวนการผลิตข้าวพร้อมรับประทานในถุงรีทอร์ทเพาช์", ทุนคณะวิศวกรรมศาสตร์ สจล. ประจำปี 2557

7. ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

7.1 ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1) Wattanasiriwit, W. and Chysirichote, T. (2016). Effect of Curry Compositions on Process Time of Commercial Sterilization and Physical Properties of Curry in Retort Pouch. The 8th International Science, Social Science, Engineering and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Energy Conference 15 -17 March, 2017, The A-ONE Royal Cruise Hotel, Pattaya Beach, Thailand, 21-26.

2) Pattarabhorn, P. and Chysirichote, T. (2016). Preparation of Tri-phala waste for gallic acid production by solid state fermentation from Aspergillus niger ATCC 16888. The 9th TSAE International Conference, September 8-10, IMPACT Exhibition Center, Pak Kret, Thailand, 70-75.
3) Chysirichote, T. and Phongpipatpong, M. (2015). Effect of sterilizing temperature on physical properties of rice porridge mixed with legumes and job's tear in retortable pouch. Journal of Food Processing and Preservations, 39: 2356-2360.
4) Chysirichote, T. (2015). Effect of different amino acid for growth and pigmentation of Monascus on rice starch solid surface medium, Proceeding of the 4th International Conference on Life Science & Biological Engineering, 4 - 6 November, ANA Crowne Plaza hotel, Nagoya, Japan, 30-34.
5) Chysirichote, T. (2015). Effect of aeration mode on the red pigment production by Monascus ruber on rice during fermenting in the packed bed bioreactor, Proceeding of the 6th International on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 29 – 31 July, Centara hotel & convention center, Khon Kaen, Thailand, 22-28.
6) Chysirichote, T., Reiji, T., Asami, K. and Ohtaguchi, K. (2013). Eff¬ects of starch and protein on glucosamine content in the biomass of Monascus ruber, Journal of Chemical Engineering of Japan, 46(10), 695–698.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้