



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบด  
แบบชั้นเดียวและสองชั้น

Effect of Operating Parameters on Protease Production in One and Two Stage  
Packed-bed Fermentors

นามผู้วิจัย นางสาวธัญรัตน์ สหายา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์จรูญ ฉัตรมานพ, D.Eng. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ไพศาล คงกาญจนาย, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบด  
แบบชั้นเดียวและสองชั้น

Effect of Operating Parameters on Protease Production in One and Two Stage  
Packed - bed Fermentors

โดย

นางสาวธัญรัตน์ สหยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2551

ชัยรัตน์ สหยา 2551: ผลของพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมัก  
แพกเบดแบบชั้นเดียวและสองชั้น ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)  
สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
จรัญ นิตรमानพ, D.Eng. 124 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพกเบดขนาด 50 ลิตร โดยแบ่ง  
การศึกษาออกเป็นสามส่วนดังนี้ ส่วนแรก ทำการผลิตในถังหมักแพกเบดแบบชั้นเดียว ด้วยวัสดุหมักผสม  
ระหว่าง รำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าในอัตราส่วน 1:3 ความหนา 10 เซนติเมตร โดยรา *Aspergillus oryzae* 0.3  
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก แป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุ  
หมัก 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมให้อากาศในถังหมักด้วยความเร็ว 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที ตั้งแต่ใน  
ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ พบว่าการเติมอากาศเข้าถังหมัก  
แพกเบดทุกๆความเร็วลม รามีการเจริญดีกว่าและให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงกว่ากรณีไม่มีการเติมอากาศ ส่วน  
ความเร็วในการเติมอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที พบว่าให้ค่า  
กิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 713.50 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 96 ซึ่งมากกว่ากรณีไม่  
มีการเติมอากาศถึง 2.43 เท่า การใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เพื่อเพิ่มความชื้นของอากาศเข้าถังหมัก ด้วย  
ความเร็วอากาศภายในถังหมัก 0.1 เมตรต่อวินาที พบว่าช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในชั่วโมงการ  
หมักที่ 60 ได้ถึง 39 เปอร์เซ็นต์ และส่งผลให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงถึง 893.93 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ใน  
ชั่วโมงการหมักที่ 96

ส่วนที่สอง ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการใช้ถังหมักแพกเบดแบบสองชั้นโดยใช้  
สภาวะที่ดีที่สุดของการหมักแพกเบดแบบชั้นเดียว พบว่าการจัดวางเบดล่างคือเบดที่มีแผ่นโลหะทึบ และเบดบน  
คือเบดที่มีท่อกลวงตรงกลาง ด้วยความหนาของวัสดุหมัก 10 เซนติเมตรทั้งสองเบด มีค่ากิจกรรมโปรติเอสเบด  
ล่างและเบดบนเท่ากับ 680.83 และ 620.54 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 84 ส่วนผล  
การศึกษาความหนาของวัสดุหมักเบดล่าง 10 และเบดบนหนา 5 เซนติเมตร พบว่าความหนาเป็นตัวแปรที่มี  
ความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทำให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสเบดล่างและเบดบนสูงสุดเท่ากับ 664.96  
และ 990.84 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 84 ตามลำดับ

ส่วนที่สาม ทำการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากถังแพกเบดทั้งสองแบบ กับค่าที่ได้  
ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการหมักแบบแพกเบดสองชั้นให้ผลผลิตทางด้านปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสูง  
เทียบเท่ากับการหมักแบบชั้นเดียว ทั้งยังให้ผลผลิตทางด้านประหยัพื้นที่และต้นทุนการผลิตอีกด้วย

Thanyarath Sahaya 2008: Effect of Operating Parameters on Protease Production in One and Two Stage Packed-bed Fermentors. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Jarun Chutmanop, D.Eng. 124 pages.

This research studied the effect of operating parameters on the protease production in the 50 L packed bed fermentors. The experiment was separated into 3 parts. Firstly, the protease production was carried out in one-stage packed-bed fermentor. The substrate was the mixture of wheat and rice bran at the ratio of 1:3 using 10 cm of the substrate thickness, 0.3% *Aspergillus oryzae* inoculums by weight of substrate and 10% (by weight) wheat flour of substrate. The initial moisture content of the substrate was 50% and the air flow velocity in one-stage packed-bed fermentor was varied to 0.05, 0.10 and 0.15 m/s. The protease production in the one-stage packed bed with inlet air flow and non-aerated was compared. The results showed that fungi can grow better with the inlet air flow condition. Therefore, the obtained highest protease activity is 713.57 U/g dry substrate at the air flow of 0.10 m/s and at the 96 hours of fermentation. This maximum protease production is 2.43 times higher than non-aerated condition. The humidifiers which increasing air humidity was using to prevent drying of the substrate, at the air flow in the packed bed fermentor of 0.10 m/s. It was found that the moisture content of substrate increased 39 % at the 60 hour and the maximum protease activity of substrate was 893.93 U/ g dry substrate at the 96 hour of fermentation.

Secondary, the best condition of a one stage packed-bed was applied to a two-stage packed-bed. Due to different design of each tray stage, it was found that the best condition was found if the tray without perforation was located at the 2<sup>nd</sup> stage (lower tray). For the substrate packing at 10 cm bed of thickness, the protease activity were 680.83 and 620.54 U/g dry substrate at 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> stage after 84 hours of fermentation. However, if the thickness of the 1<sup>st</sup> stage (upper tray) was reduced to 5 cm while the thickness of the 2<sup>nd</sup> stage was remained at 10 cm, the maximum protease activity were 664.96 and 990.84 U/ g dry substrate at 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> stage after 84 hours of fermentation.

Finally, comparison of one-stage and two-stage packed bed fermentor were carried out for protease yield. To set the product of lab scale at 100 % of protease yield, the result indicated the two-stage packed bed fermentor gave high percentage yield as same as a one-stage packed bed fermentor. However, the two-stage packed bed have higher substrate loading and lower operating cost comparing to the one-stage packed bed fermentor.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรัญ นัฏรมานพ ประธานกรรมการ  
ที่ปรึกษา ผู้ประสทาวิชาความรู้ รวมทั้งแนะนำแนวทางการทำงาน ตลอดจนให้คำปรึกษา ตรวจสอบ  
ข้อบกพร่องของรายงานให้สำเร็จลงด้วยดี รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณและผู้ช่วย  
ศาสตราจารย์สินสุภา จัษฎะเจิม ที่ให้การแนะนำวางแผนงานวิจัยและคำปรึกษาชี้แนะ เพื่อความ  
สมบูรณ์ของรายงานฉบับนี้

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและ  
อุปกรณ์ต่างๆ ขอบคุณ คุณวรัญญู เสมรสุต และคุณธราธร พวงพลับ รุ่นพี่นิสิตปริญญาโท ภาควิชา  
วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาสละเวลาสาคิตการใช้ถึง  
หมักแพคเบค รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณ ครอบครัว เพื่อน และบุคคลรอบข้างที่คอยให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ และ  
สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย (สกว) สถาบันวิจัยพัฒนาแห่ง  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง  
ที่ให้การสนับสนุนในด้านทุนวิจัย

ธัญรัตน์ สหายา

กันยายน 2551

## สารบัญ

|                                                       | หน้า |
|-------------------------------------------------------|------|
| สารบัญ                                                | (1)  |
| สารบัญตาราง                                           | (2)  |
| สารบัญภาพ                                             | (7)  |
| คำนำ                                                  | 1    |
| วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย                         | 3    |
| การตรวจเอกสาร                                         | 4    |
| อุปกรณ์และวิธีการ                                     | 54   |
| อุปกรณ์                                               | 54   |
| วิธีการ                                               | 59   |
| ผลและวิจารณ์                                          | 67   |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                                     | 86   |
| สรุป                                                  | 86   |
| ข้อเสนอแนะ                                            | 87   |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                                  | 89   |
| ภาคผนวก                                               | 97   |
| ภาคผนวก ก วิธีการคำนวณความเร็วลมในถังหมักเพคเบค       | 98   |
| ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีนและกราฟมาตรฐาน | 101  |
| ภาคผนวก ค ตารางข้อมูลที่ได้จากการทดลอง                | 108  |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน                           | 124  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                               | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 การประยุกต์ใช้การหมักแบบแห้งในส่วนต่างๆ                                                                                              | 10   |
| 2 สถิติความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยของประเทศในช่วงฤดูกาลต่างๆ                                                                                | 30   |
| 3 องค์ประกอบหลักของรำข้าวเจ้า                                                                                                          | 33   |
| 4 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี                                                                                                              | 34   |
| 5 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์                                                                                                        | 42   |
| 6 การใช้รำในกระบวนการหมักแบบแห้ง                                                                                                       | 45   |
| 7 ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวและสองชั้น                                                 | 85   |
| <br>                                                                                                                                   |      |
| ตารางผนวกที่                                                                                                                           |      |
| ข1 การเตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้นต่างๆ                                                                                       | 106  |
| ข2 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส                                                                      | 106  |
| ค1 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ                                    | 109  |
| ค2 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ                                    | 109  |
| ค3 ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ                              | 110  |
| ค4 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที        | 110  |
| ค5 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที | 111  |

### สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่                                                                                                                                                               | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ค6 ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก<br>แพกเบดแบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที                                  | 111  |
| ค7 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพกเบด<br>แบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที                                         | 112  |
| ค8 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก<br>แพกเบดแบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที                                  | 112  |
| ค9 ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก<br>แพกเบดแบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที                                   | 113  |
| ค10 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพกเบด<br>แบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที                                       | 113  |
| ค11 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก<br>แพกเบดแบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที                                | 114  |
| ค12 ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก<br>แพกเบดแบบขึ้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที                                 | 114  |
| ค13 อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพกเบด<br>แบบขึ้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1<br>เมตรต่อวินาที     | 115  |
| ค14 เปอร์เซ็นต์ความชื้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพกเบด<br>แบบขึ้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1<br>เมตรต่อวินาที | 115  |
| ค15 ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพกเบด<br>แบบขึ้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1<br>เมตรต่อวินาที           | 116  |



## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่                                                                                                                                                                                                                                      | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ค16 อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน             | 116  |
| ค17 เปอร์เซนต์ความชื้นในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน   | 117  |
| ค18 ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน   | 117  |
| ค19 อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดล่าง           | 118  |
| ค20 เปอร์เซนต์ความชื้นในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดล่าง | 118  |
| ค21 ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดล่าง | 119  |



## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | หน้า                                                                                                                                                                                                         |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ค30          | ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสอง<br>ชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 5:3 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่ม<br>ความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที |
|              | 123                                                                                                                                                                                                          |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1      | ลักษณะของถังหมักชนิดต่างๆ ที่ใช้ในระบบการหมักแบบแห้ง                                                                                                                                                    | 20 |
| 2      | เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น                                                                                                                                                         | 36 |
| 3      | ลักษณะวงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์                                                                                                                                                                   | 45 |
| 4      | ทางสัณฐานวิทยาของรา <i>Aspergillus oryzae</i>                                                                                                                                                           | 48 |
| 5      | ชุดอุปกรณ์การหมัก                                                                                                                                                                                       | 54 |
| 6      | ถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว                                                                                                                                                                               | 55 |
| 7      | ถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น                                                                                                                                                                                 | 56 |
| 8      | รูปร่างและขนาดของถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์                                                                                                                                                               | 58 |
| 9      | ลักษณะการวางแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นแบ่งวัสดุหมักตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง                                                                                                                                  | 60 |
| 10     | ลักษณะการอัดด้วยสาลี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ด้านข้างถังหมักแพคเบด                                                                                                                                         | 61 |
| 11     | ระบบการหมักในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวพร้อมเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์                                                                                                                                 | 62 |
| 12     | ตำแหน่งการวางตะแกรงเบดในการทดลอง 2.1.1                                                                                                                                                                  | 64 |
| 13     | ตำแหน่งการวางตะแกรงเบดในการทดลอง 2.1.2                                                                                                                                                                  | 64 |
| 14     | ระบบการหมักในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นพร้อมเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์                                                                                                                                   | 65 |
| 15     | การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว กรณีไม่มีการเติมอากาศ                                                                           | 68 |
| 16     | การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว กรณีไม่มีการเติมอากาศ                                                                                       | 69 |
| 17     | วัสดุหมักที่ชั่วโมงที่ 0 24 60 และ 96                                                                                                                                                                   | 72 |
| 18     | การเจริญของรา <i>A.oryzae</i> ในวัสดุหมักที่ชั่วโมงที่ 96 ก) ลักษณะการเจริญของรา <i>A.oryzae</i> ที่บริเวณผิวด้านบนของวัสดุหมัก ข) ลักษณะการเจริญของรา <i>A.oryzae</i> ที่บริเวณผิวด้านล่างของวัสดุหมัก | 72 |
| 19     | การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ             | 73 |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่                                                                                                                                                                                                     | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 20 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว โดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ | 73   |
| 21 การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว โดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ  | 74   |
| 22 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักกรณีไม่ใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์กับกรณีใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที                                                          | 76   |
| 23 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักกรณีไม่ใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์กับกรณีใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที                                                           | 77   |
| 24 การเจริญของรา <i>A.oryzae</i> ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบสองชั้น ก) วัสดุหมักในเบดล่างที่มีความหนา 10 เซนติเมตร ข) วัสดุหมักในเบดบนที่มีความหนา 5 เซนติเมตร                                             | 81   |
| 25 การเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นที่มีความหนา 10 และ 5 เซนติเมตร                                                                      | 83   |
| 26 การเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นที่มีความหนา 10 และ 5 เซนติเมตร                                                            | 83   |
| <br><b>ภาพผนวกที่</b>                                                                                                                                                                                      |      |
| ก1 ถังหมักชีวภาพแบบแพค                                                                                                                                                                                     | 99   |
| ข1 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส                                                                                                                                          | 107  |

## ผลของพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบด แบบชั้นเดียวและสองชั้น

### Effect of Operating Parameters on Protease Production in One and Two Stage Packed-bed Fermentors

#### คำนำ

กระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) เป็นระบบการหมักที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นบนวัสดุหมักที่ไม่มีน้ำอิสระ (free water) อยู่ในระบบน้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับในวัสดุหมัก ดังนั้นการหมักชนิดนี้มักจะเหมาะกับการใช้จุลินทรีย์ประเภทราซึ่งสามารถเจริญได้ในปริมาณน้ำน้อย (Ogawa *et al.*, 1995) พบว่าการผลิตโดยใช้ถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed-bed bioreactor) จะให้ปริมาณผลผลิตที่สูงและสามารถควบคุมสถานะในการหมักได้ดี (Ellen and Yang, 1998) ทั้งยังไม่ทำลายเส้นใยของจุลินทรีย์เนื่องจากไม่มีการเคลื่อนที่ ทำให้ราเจริญบนวัสดุหมักได้ดี (Ghildyal *et al.*, 1994) พร้อมทั้งมีประโยชน์ทางด้านการใช้พื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือในการทำงานไม่มาก การประหยัดค่าใช้จ่าย และเกิดภาวะการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากมีความชื้นต่ำ แต่มีข้อเสียในระหว่างการหมัก คือจะมีการสะสมความร้อนเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ (Hamidi - Esfahani *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่พบในถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบดนี้ และหากไม่มีการถ่ายเทความร้อนที่ดีแล้วอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์ (Mudgett, 1986) ระบบการหมักแบบแห้งนับได้ว่าเป็นกรรมวิธีที่มีมานานและพบมากในแถบตะวันออกไกล ปัจจุบันใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโคจิ เหล้าสาเก เทมเป้ ซีอิ๊ว อองจอม เนยแข็ง เอนไซม์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Raimbaut, 1998)

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ถึงร้อยละ 60 ของปริมาณการใช้งานเอนไซม์ทั่วโลก (Shuler and Kargi, 2002) เอนไซม์โปรติเอสทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน (Chandran *et al.*, 2005) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้งานได้หลากหลายประเภท เช่น ใช้ในการฟอกหนัง ใช้เป็นส่วนผสมของผงซักฟอกเพื่อย่อยสลายคราบโปรตีนที่มีอยู่ในเนื้อผ้า นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวย่อยในอุตสาหกรรมยา ใช้ย่อยสลายโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางให้มีความสะอาด เป็นต้น

(Scheuer, 1990) ปัจจุบัน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ด้วยการหมักแบบแห้ง ซึ่งให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงกว่าการหมักแบบเปียกถึงประมาณ 3.5 เท่า (Sandhya *et al.*, 2005)

ด้วยข้อจำกัดด้านการระบายความร้อนที่เกิดในกระบวนการหมักแบบแห้ง ทำให้ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดเพื่อหาสภาวะที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก พร้อมทั้งปรับตัวแปรอื่นๆให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ให้ได้มากที่สุด

## วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบด อาทิเช่น อัตราการให้อากาศ ความชื้นของวัสดุหมัก อุณหภูมิของวัสดุหมัก และค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุที่ใช้หมัก เป็นต้น
2. ปรับปรุงถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้นสำหรับการหมักแบบแห้ง ให้มีประสิทธิภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โปรติเอส

### ขอบเขตงานวิจัย

ในการงานวิจัยนี้ใช้สปอร์ *Aspergillus oryzae* มีชื่อทางการค้า (commercial strain) ว่า Ozykat-1 มีความเข้มข้นของ สปอร์ต้นเชื้อเท่ากับ  $10^9$  สปอร์ต่อกรัม วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าอัตราส่วน 1 : 3 โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมักถึงแพคเบดที่ใช้ที่มีขนาดปริมาตร 50 ลิตร



## การตรวจเอกสาร

### ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการหมัก

กระบวนการหมักในอุตสาหกรรม หมายถึง กระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอินทรีย์สาร โดยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ เอนไซม์ทำให้อินทรีย์สารย่อยสลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์หรือมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ผลิตภัณฑ์ในนี้อาจเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่หรือได้จากการย่อยสลายทางชีวเคมีก็ได้ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศเต็มที่ให้อากาศเพียงเล็กน้อย หรือปราศจากอากาศก็ได้

#### 1. ขั้นตอนพื้นฐานของการหมัก

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1.1 การเตรียมต้นเชื้อ เป็นการเตรียมจุลินทรีย์ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก และจุลินทรีย์นั้นต้องแข็งแรงพอที่สามารถเจริญในการหมักได้ รวมทั้งต้องปราศจากจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการ

1.2 การเตรียมวัตถุดิบ เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบ (raw material) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า วัสดุหมัก (substrate) เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

1.3 การหมัก เป็นการนำวัสดุหมักและหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาถ่ายลงสู่ถังหมัก แล้วทำการปรับสภาวะถังหมักให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น การเติมอากาศการกวน การควบคุมอุณหภูมิ การปรับพีเอช เป็นต้น

1.4 การแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ เป็นกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์หลังจากหมักเสร็จแล้วออกจากวัสดุหมัก โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น การกรอง (filtration) การเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifugation) การตกตะกอน (coagulation and flocculation) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (extraction) การตกผลึก (crystallization) การระเหย (evaporation) การทำให้แห้ง (drying) เป็นต้น

เมื่อแยกผลิตภัณฑ์ได้แล้ว จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โครมาโตกราฟีแบบเจล เป็นต้น

## 2. ประเภทของการหมัก

ประเภทของการหมักแบ่งได้หลายประเภทตามแต่วัตถุประสงค์ของการใช้งาน แบ่งตามความต้องการใช้อากาศ ได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. การหมักที่ต้องใช้อากาศ (aerobic fermentation) หรือออกซิเจน เช่น การผลิตกรดอะซิติก กรดซิตริก
2. การหมักที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic fermentation) เป็นการหมักที่ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศหรือออกซิเจน เช่น การหมักก๊าซชีวภาพ

แบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ ได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักในสภาพเปิด (septic fermentation) เป็นการหมักในสภาวะเปิด ที่ไม่ได้มีการควบคุมจุลินทรีย์ภายนอกที่อาจปนเปื้อนวัสดุหมักในระหว่างการหมัก
2. การหมักในสภาพกึ่งเปิดที่ไม่ต้องการอากาศ (semi-septic fermentation) เป็นการหมักที่กึ่งควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ภายนอก
3. การหมักในสภาพปิด (aseptic fermentation) เป็นการหมักที่ต้องทำให้ไม่มีการเกิดปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการเพราะอาจทำความเสียหายให้แก่กระบวนการหมัก เช่น การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

แบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติม ได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักแบบแห้ง หรือเรียกอีกอย่างว่า การหมักบนอาหารแข็ง เป็นการหมักที่ต้องการปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อย เพื่อปรับให้วัสดุหมักที่แห้งมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์
2. การหมักในสภาพกึ่งเหลว เป็นการหมักที่มีอาหารหมักเป็นของเหลวแต่มีของแข็งแขวนลอยอยู่บางส่วน
3. การหมักในอาหารเหลว เป็นการหมักที่อาหารหมักเป็นของเหลว

แบ่งตามกระบวนการที่ใช้ ได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักแบบกะ (batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมัก สารอาหารและต้นเชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาในการหมัก คือ เติมนลงไปในตอนต้นของการหมักเท่านั้น
2. การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมักหรือสารอาหารลงไปมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้วัสดุหมักและสารอาหารได้เต็มที่ เพื่อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงขึ้น
3. การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมักหรือสารอาหารตลอดเวลา และในขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักตลอดเวลาด้วยเช่นกัน

### 3. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก

แบ่งได้เป็น 3 จำพวก คือ

- 3.1 สารโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาชีวเคมีในการย่อยสลายวัสดุหมักหรือสาร

อาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการสร้างพลังงานหรือสารบางอย่างที่เป็นส่วนประกอบในการสร้างเซลล์

3.2 สารโมเลกุลใหญ่ เช่น เอนไซม์ โปรตีน ฮอร์โมน เป็นต้น

3.3 สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยไม่มีความสัมพันธ์กับขบวนการเมตาบอลิซึมในการสร้างพลังงานและสารประกอบที่จำเป็นในการสร้างเซลล์ เช่น ยาปฏิชีวนะ สารพิษของแบคทีเรีย เป็นต้น

#### 4. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

4.1 อาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ทุกชนิดต้องการอาหาร โดยเฉพาะสารประกอบคาร์บอนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในโคโรเจนใช้สังเคราะห์โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินได้เอง บางชนิดใช้สารประกอบอนินทรีย์เป็นอาหาร ได้แก่ ยีสต์ รา แบคทีเรีย การให้อาหารแก่จุลินทรีย์มีความจำเป็นต้องให้พอเหมาะไม่มากเกินไปไม่น้อยเกินไป อาหารเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญและการทวีจำนวนของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทราบลักษณะและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2 ความชื้น ระดับความชื้นของวัสดุหมักต้องปรับให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ และต้องพยายามควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมตลอดเวลา ถ้าความชื้นมากเกินไปอาจทำให้การถ่ายเทอากาศในวัสดุหมักไม่ดี ผลการหมักก็จะลดต่ำลงด้วย

4.3 อุณหภูมิ จุลินทรีย์จะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่พอเหมาะ(optimal temperature) และสามารถจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้เป็น 3 ชนิด (อรุณี, 2530) คือ

1. psychrophiles ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิต่ำ เช่น 0-10

องศาเซลเซียส

2. mesophiles ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง เช่น 20-45

องศาเซลเซียส

### 3. thermophiles ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงเช่น สูงกว่า 45

องศาเซลเซียส

4.4 ออกซิเจน กระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ต้องใช้ใช้ออกซิเจน และกระบวนการนี้จะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเกิดขึ้นเฉพาะจุลินทรีย์จำพวกใช้อากาศ (aerobic) เท่านั้นที่ต้องใช้ ทำให้ได้พลังงานเพื่อการเจริญ ออกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก โดยเฉพาะพวกที่ต้องการออกซิเจน เช่น ราจะเจริญในที่ที่มีออกซิเจนเท่านั้น ส่วนยีสต์จะมีหรือไม่มีออกซิเจนก็เจริญได้แต่มีสภาพการเจริญที่แตกต่างกัน สำหรับแบคทีเรียมีทั้งชนิดที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมตาบอไลต์เพื่อใช้ในการเผาผลาญอาหาร โดยความต้องการออกซิเจนจะขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของอาหารบางอย่าง เช่น แป้ง หรือโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ จะทำให้เกิดความหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งส่งผลต่อการให้อากาศ ซึ่งทำให้อัตราการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ลดลง จึงใช้วิธีอัดอากาศเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.5 ค่าพีเอช จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ชอบอาหารที่มีพีเอชกลางๆประมาณ 6.6-7.5 แบคทีเรียไม่สามารถทนต่อพีเอชต่ำได้เท่ายีสต์หรือรา ถ้าอาหารที่มีพีเอชต่ำกว่า 3.5 แบคทีเรียส่วนใหญ่จะไม่เจริญ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมให้พีเอชของการหมักอยู่ในช่วงที่พอเหมาะ

### กระบวนการหมักแบบแห้ง

กระบวนการหมักแบบแห้ง หมายถึง กระบวนการแปรรูปทางชีวเคมี ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ ซึ่งเจริญบนอาหารแห้งในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ (free water) โดยที่น้ำในระบบจะอยู่ในรูปของความชื้น (moisture content) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัสดุหมักเท่านั้น ไม่มีน้ำส่วนเกินอยู่ภายนอกวัสดุหมักหรืออาจกล่าวได้ว่าไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ (Hesseltine, 1972) การหมักแบบแห้งส่วนใหญ่เหมาะกับการที่สร้างเส้นใย ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด โดยที่การเจริญของจุลินทรีย์จะหยุดชะงักลงถ้าปริมาณความชื้นของอาหารต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักที่ใช้หมักนี้ได้แก่ เมล็ดธัญพืช รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร (Mudgett, 1986)

อย่างไรก็ดี เรามักพบอีกลักษณะที่มีความหมายคล้ายคลึงกันคือ การหมักบนอาหารแข็ง (solid substrate fermentation) ซึ่ง Pandey *et al.* (1999) เสนอว่าทั้งสองวิธีนี้มีความหมายที่ต่างกัน โดยการหมักบนอาหารแข็งนั้น จะเน้นว่าวัสดุหมักต้องเป็นแหล่งให้พลังงานและเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ ส่วนการหมักแบบแห้งนั้น วัสดุหมักไม่จำเป็นต้องเป็นแหล่งให้ พลังงานหรือเป็นแหล่งให้คาร์บอนแก่จุลินทรีย์

ตัวอย่างของการหมักแบบแห้ง เช่น ในประเทศญี่ปุ่นทำการผลิตโคจิ โดยใช้ข้าวหมักด้วยราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ประเทศอินโดนีเซียผลิต tempeh หรือคนอินเดีย เรียกว่า ragi โดยใช้ถั่วบดเป็นวัตถุดิบใช้รา *Rhizopus oligosporus* และในประเทศฝรั่งเศสมีการผลิต blue cheese โดยใช้ fresh cheese เป็นวัตถุดิบมีรา *Penicillium roquefortii* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรม การผลิตพวทยาปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพวก secondaries metabolites และอาหารเสริมต่างๆ (Senez *et al.*, 1980) เป็นต้น ส่วนการประยุกต์ใช้การหมักแบบแห้งอื่นๆ เป็นดังตารางที่ 1

## 1. ลักษณะของการหมักแบบแห้ง (characteristic of solid-state fermentation)

ลักษณะของการหมักแบบแห้งทั่วไปพอจะแบ่งออกได้ตาม Hesseltine (1972) ดังนี้

1.1 วัสดุหมักที่นิยมใช้ในการหมักมักเป็นวัสดุหมักที่หาได้ง่าย ราคาถูก ซึ่งส่วนใหญ่มาจากผลผลิตและผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันสำปะหลัง รำชานอ้อย ชังข้าวโพด เป็นต้น หรือได้จากผลิตภัณฑ์จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น น้ำตาลกลูโคส วิตามิน กรดอะมิโน หรือได้จากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากน้ำตาล น้ำหางนม น้ำย่อยเยื่อกระดาษ เป็นต้น (Raimbault, 1998) บางครั้งวัสดุหมักอาจใช้ทดแทนกันได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์หนึ่งๆ ซึ่งขึ้นกับประสิทธิภาพการผลิต วัตถุดิบที่นิยมใช้ต้องควบคุมขนาดให้เหมาะสม เพื่อให้มีช่องว่างระหว่างอนุภาคของวัสดุหมักเพียงพอให้อากาศถ่ายเทหมุนเวียนได้เป็นอย่างดี

1.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ น้ำ นอกจากนี้ต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ เป็นต้น

1.3 การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการในระหว่างการหมักแบบแห้งลดน้อยลง เนื่องจากความชื้นในระบบค่อนข้างต่ำ จึงเหมาะสมกับการเจริญของรา แต่ไม่เหมาะต่อการเจริญ

ของแบคทีเรียในระหว่างการหมักแบบแห้ง มักเกิดปัญหาความร้อนสะสมอยู่มาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิในระบบไม่ให้สูงเกินไปจนเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้

**ตารางที่ 1** การประยุกต์ใช้การหมักแบบแห้งในส่วนต่างๆ

| Economical Sector       | Application                    | Examples                                                     |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Agro-Food Industry      | Traditional Food Fermentations | Koji, Tcznpch, Rae, Attickc, Fermented cheeses               |
|                         | Bioconversion By-products      | Sugar pulp Bagass Coffee pulp'SilageComposting, Detoxication |
| Agriculture             | Biocontrol , Bioinsecticide    | Beauveria Metarhizium, Trichoderma                           |
| Industrial Fermentation | Enzymes production             | Amylases, Cellulases Proteases, Pectinases, Xylanases        |
|                         | Organic acid Production        | Ciric acid, Fumaric acid<br>Gallic acic, Lactic acid         |
|                         | Ethanol Prodixtion             | Schwanniomyces sp. Sbrch<br>Malting and Brewing              |

ที่มา: Raimbault (1998)

## 2. ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการหมักแบบแห้ง

ปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการหมักแบบแห้ง (Mudgett, 1986) มีดังนี้

2.1 ดัชนีเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ควรต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของสปอร์ และต้องมีอัตราการงอก (germinate) ที่รวดเร็วและมีลักษณะเดียวกัน (uniform) ที่สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

2.2 การเตรียมวัสดุหมักต้องเตรียมให้สภาพของวัสดุหมักเหมาะสมและอยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ง่าย หรือนำไปใช้ได้ง่าย โดยวิธีการปรับสภาพทางกายภาพ เช่น ในอุตสาหกรรมการทำชีวส์และเต้าเจี้ยว ถั่วเหลืองจะถูกคัดเลือกและลอกเปลือกออก ก่อนนำมาแช่น้ำจนอืดัว ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาต้มเพื่อฆ่าเชื้อ เป็นต้น ส่วนการปรับสภาพทางเคมี เช่น อาจมีการเพิ่มอาหารเสริมต่างๆ เป็นต้น

2.3 ระดับความชื้นของวัสดุหมักต้องปรับให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ และต้องพยายามควบคุมให้อยู่ในระดับเหมาะสมตลอดเวลาทั้งระยะเริ่มต้นและระหว่างทำการหมัก ถ้าความชื้นของวัสดุหมักสูงเกินไปก็จะเกิดปัญหาการถ่ายเทอากาศภายในวัสดุหมักไม่ดีพอ ทำให้ผลผลิตจากการหมักลดลง (Lonsane *et al.*, 1985) และหากมีความชื้นน้อยจนเกินไปจะทำให้วัสดุหมักมีการบวมน้อย ทำให้จุลินทรีย์มีการขนส่งสารอาหารไม่สมดุลเนื่องจากไม่มีน้ำช่วยในระบบเมตาบอลิซึมของรา (Zandrazil and Brunert, 1981) ปริมาณความชื้นในการหมักแบบแห้งส่วนใหญ่จะถูกปรับให้อยู่ที่ประมาณ 30 ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Raimbault, 1998) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและชนิดของจุลินทรีย์ด้วย เช่น ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อเชื้อ *A.niger* ในเมล็ดข้าวคือ 40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่หากเชื้อ *A.niger* ใน coffee pulp พบว่าความชื้นอยู่ที่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากวัสดุหมักมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำที่ต่างกัน (Oriol *et al.*, 1988b)

2.4 รูปร่างของอนุภาค (particle shape) มีผลต่ออัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอนุภาค เช่นเดียวกับขนาดของอนุภาค นอกจากนั้นยังมีผลต่อการบรรจุอาหารลงในถังหมักและเป็นตัวบ่งชี้ช่องว่างสำหรับการแพร่ของออกซิเจนระหว่างอนุภาค (Ramachandran *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามความสำคัญของรูปร่างอนุภาคไม่ค่อยได้รับความสนใจมากนักแต่ยังมีหลักการของรูปร่างอนุภาค ดังนี้

2.4.1 รูปร่างแบบลูกบาศก์เมื่อบรรจุวัสดุหมักจะแน่นและมีช่องว่างน้อย

2.4.2 อาหารแห้งที่มีลักษณะเป็นแผ่นจะมีพื้นที่ผิวมาก

2.4.3 อนุภาคที่มีลักษณะทรงกลมตันเมื่อบรรจุแล้วจะมีช่องว่างเกิดขึ้นมาก



2.4.4 อนุภาคที่มีน้ำหนักมากเกินไป น้ำจะไปอุดรูช่องว่างของวัสดุหมักทำให้อากาศถ่ายเทได้ไม่สะดวก และน้ำจะทำให้เกิดการบิดเบี้ยวของวัสดุหมัก ซึ่งอาจทำให้ช่องว่างระหว่างอนุภาคนั้นหายไป

2.4.5 อนุภาคที่ประกอบด้วยอนุภาคหลายๆขนาด อนุภาคที่ละเอียดจะเข้าไปแทนที่ช่องว่างที่เกิดจากอนุภาคนขนาดใหญ่จะเป็นการลดช่องว่างระหว่างอนุภาค

2.4.6 อนุภาคเรียวยาวจะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นผิวต่อปริมาตรค่อนข้างมาก

2.5 อุณหภูมิ ในกระบวนการหมักแบบแห้งนั้น อุณหภูมิ นับว่าเป็นตัวแปรที่สำคัญ โดยที่การควบคุมอุณหภูมิในการหมักแบบแห้งนั้นทำได้ยาก เนื่องจากมีได้อยู่ในของเหลวจึงทำการวัดโดยตรงไม่ได้ เพราะของแข็งที่เป็นอาหารนั้นมีความชื้นในปริมาณที่ต่ำ มีผลรายงานว่าในการผลิตโคจิที่ผลิตกรดจะได้ค่าพลังงานความร้อนโดยรวมมากกว่า 600 กิโลแคลอรีต่อกิโลกรัม หากไม่สามารถระบายพลังงานความร้อนจำนวนนี้ออกจากเบดได้ อุณหภูมิเบดก็จะสูงขึ้นกระทั่งทำให้จุลินทรีย์ตาย (Pandey *et al.*, 1999)

2.6 ค่าพีเอช นับว่าเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสำคัญ พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญได้ดีที่สุดแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับพีเอชและรักษาระดับของพีเอชให้คงที่ตลอดการหมัก ซึ่งส่วนใหญ่แล้ววัสดุหมักที่ใช้เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมักจะมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีอยู่แล้ว

2.7 การเติมอากาศ มีความสำคัญต่อการหมักเนื่องจากออกซิเจนที่เพียงพอจะช่วยรักษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเป็นการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีมากเกินไปในกระบวนการ นอกจากนั้นยังมีความสำคัญในการถ่ายเทความร้อน ลดอุณหภูมิของวัสดุหมักแต่การเติมอากาศมักส่งผลกระทบต่อความชื้นของวัสดุที่ใช้หมัก

2.8 ถังหมักที่ใช้ต้องเลือกให้ถูกวัตถุประสงค์ของการหมัก และกำลังการผลิตที่ต้องการ ควรมีการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความเหมาะสมของระบบการหมักพร้อมทั้งประเมินความเป็นไปได้ทางการค้า

### 3. ข้อได้เปรียบและเสียเปรียบของกระบวนการหมักแบบแห้ง

3.1 ข้อได้เปรียบของระบบหมักแบบแห้ง แบ่งออกได้ดังนี้ (วรารุณี, 2529)

3.1.1 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เตรียมได้ง่าย

3.1.2 ใช้พื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยากและไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1.4 ต้นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้อยู่ในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับเตรียมต้นเชื้อ ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

3.1.5 สภาพการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นรา มีลักษณะคล้ายคลึงกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้มีระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของจุลินทรีย์สั้น

3.1.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรง โดยใช้วิธีที่ง่าย และสะดวก

3.1.7 สภาพการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ยากเนื่องจากมีความชื้นต่ำ ทำให้ไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย

3.2 ข้อเสียเปรียบของกระบวนการหมักแบบแห้ง แบ่งออกได้ดังนี้

3.2.1 มีความจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (โดยส่วนใหญ่เป็นรา นอกจากนั้นได้แก่แบคทีเรีย ยีสต์ และสเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์) ซึ่งจุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ

3.2.2 ปัญหาความร้อนที่สะสมในปริมาณสูงเมื่อหมักในปริมาณมาก เกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ มีผลทำให้อุณหภูมิในถังชีวปฏิกรณ์สูงขึ้น และไม่เหมาะสมต่อ

การเจริญของจุลินทรีย์รวมไปถึงการทำงานของเอนไซม์ และมีผลจากวัสดุหมักมีค่าการนำความร้อน (thermal conductivity) ค่อนข้างต่ำ ทำให้การถ่ายเทความร้อนออกจากวัสดุหมักเกิดขึ้นได้ยาก

3.2.3 การติดตามผลการหมัก เช่น พีเอช ความชื้นในวัสดุหมัก สามารถทำได้ยาก

3.2.4 ใช้ดินเชื้อในปริมาณสูง

3.2.5 วัสดุหมักที่ใช้หมักจำเป็นต้องผ่านการแปรสภาพ (pretreatment) ก่อน

3.2.6 การหาค่ามวลของเส้นใย (mycelial mass) สามารถทำได้ยาก

### ความรู้เกี่ยวกับถังหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบแห้ง

ถังหมัก (fermentor) เปรียบเสมือนหัวใจของกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพราะเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่ต้องการ ถังหมักในยุคแรกเป็นถังหมักแบบง่าย ไม่มีการกวน และไม่มีการให้อากาศ (โศพส, 2532) หลังจากนั้นจึงพัฒนาเป็นถังกวนที่มีการให้อากาศ ซึ่งลักษณะถังก็ยังเหมือนเดิมคือเป็นรูปทรงกระบอก มีการกวนด้วยใบกวน มีการให้อากาศ มีบัพเฟิล (baffle) เพื่อให้การกวนสมบูรณ์ และไม่เกิดวอร์เท็กซ์ (vortex) มีความสามารถในการถ่ายเทความร้อนเข้าหรือออกจากถังได้

### 1. ลักษณะของถังหมักที่ใช้ในอุตสาหกรรม

1.2 สามารถควบคุมสภาพการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และสภาพการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ดีสามารถใช้งานได้ง่าย (วราวุฒิและกรวิภา, 2539)

1.3 มีความแข็งแรงในการใช้งาน เช่น สามารถทนต่อความดันที่เกิดขึ้นเมื่อมีอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก เป็นปริมาณมาก

1.4 วัสดุที่ใช้ทำถังหมัก ต้องไม่ถูกกัดกร่อนด้วยวัสดุหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักรวม ทั้งไม่ทำให้เกิดประจุที่เป็นพิษ (toxic ions) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.5 สามารถควบคุม หรือป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ดี

1.6 ในสภาพการหมักแบบมีอากาศ ถังหมักจะต้องมีเครื่องมือที่ให้อากาศปลอดเชื้อเพื่อช่วยเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในอาหาร และช่วยถ่ายเทความร้อนในระบบ ในขณะเดียวกันก็นำคาร์บอนไดออกไซด์ที่เป็นผลมาจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ออกจากระบบด้วย ดังนั้นอาจจำเป็นจะต้องมีการหมุนกลับถังหมักเพื่อช่วยถ่ายเทอากาศ

1.7 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) และ เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) เพื่อปรับค่าอุณหภูมิ และ ค่าพีเอช ในช่วงระหว่างการหมัก

## 2. ระบบการทำงานของถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบแห้ง

ระบบการทำงานของถังหมักที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก แบ่งออกเป็น 2 ระบบ (วราวุฒิ และกรวิกา, 2539) คือ ถังหมักระบบปิด (closed fermentor system) และถังหมักระบบเปิด (open fermentor system) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

### 2.1 ถังหมักระบบปิด

ระบบนี้มีการเติมสารอาหารลงไปเพียงครั้งเดียวตอนเริ่มต้นของการหมักเท่านั้น และในระหว่างการหมักจะไม่มีการนำส่วนประกอบที่สำคัญในการหมักเข้า หรือ ออกจากระบบ ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนถึงจุดที่ต้องการจะแยกเซลล์ หรือแยกผลิตภัณฑ์ออก การหมักระบบปิดนี้อาจเรียกว่า ระบบการหมักแบบกะก็ได้ ระบบนี้ใช้มากในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในกระบวนการขนาดเล็ก เนื่องจากราคาถูก และประหยัด มีการควบคุมการทำงานที่ง่าย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบครั้งคราว ได้แก่ การหมักไวน์ เบียร์ สุรา แอลกอฮอล์ นัตโต้ เทมเป้ และ โคลจิ เป็นต้น ในระบบนี้นิยมใช้ถังหมักขนาดเล็กใช้หมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพงและมีปริมาณน้อย เช่น เอนไซม์ และ สารเคมีบางชนิด สำหรับถังหมักขนาดใหญ่จะใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ และ กรดอินทรีย์ อย่างไรก็ตามมีการดัดแปลงระบบการหมักแบบครั้งคราวโดยมีการเติมสารอาหารเพิ่มเข้าไปเป็นระยะในระหว่างการหมัก ตามแผนการที่กำหนดไว้ล่วงหน้าแล้ว หรือจนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์หรือผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นตามต้องการ (นพดล, 2532) ซึ่งเรียก

กระบวนการที่ตัดเปลี่ยนนี้ว่า ระบบการหมักแบบกึ่งกะ สามารถพบได้ในกระบวนการผลิตยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง

## 2.2 ถังหมักระบบเปิด

ระบบนี้ส่วนประกอบของระบบสามารถนำเข้าและออกจากถังหมักได้อย่างต่อเนื่อง กล่าวคือ มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เดียวกับมีสายผลิตภัณฑ์ หรือน้ำหมักที่ประกอบด้วยชีวมวล (biomass) ไหลออกจากถังหมักอย่างต่อเนื่องเช่นกันที่สภาวะคงที่ (steady state) ระบบนี้มีปริมาตรการทำงาน (working volume) คงที่ และค่าต่าง ๆ ของระบบคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงกับเวลา ทั้งนี้อัตราการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบเป็นมวลชีวภาพและผลิตภัณฑ์ต้องสมดุลกับอัตราในการนำออกระบบ ระบบการหมักแบบนี้ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ระบบการหมักอย่างต่อเนื่อง (continuous fermentation) ซึ่งยังไม่แพร่หลายนักในกระบวนการหมักทั่วไป และพบมากในระบบการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตาม นักเทคโนโลยีชีวภาพมีความพยายามที่จะใช้ระบบต่อเนื่องในการผลิตแอลกอฮอล์ แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จดังนั้นระบบการผลิตแอลกอฮอล์ในทางอุตสาหกรรมเกือบทั้งหมดยังคงเป็นแบบกะอยู่

## 3. ชนิดของถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบแห้ง

ถังหมักถือเป็นอุปกรณ์หนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากทำหน้าที่รักษาสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณอากาศ เป็นต้น ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดตลอดระยะเวลาการหมัก นอกจากนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น และป้องกันสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ อีกด้วย ปัจจุบัน ถังหมักที่นิยมใช้สำหรับการหมักแบบแห้งในระดับอุตสาหกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิดด้วยกัน คือ ถังหมักแบบถาด (tray fermentor) ถังหมักแบบแพคเบด (packed-bed fermentor) ถังหมักแบบตัวถังหมุน (rotating drum fermentor) ถังหมักแบบมีใบกวน (stirred fermentor) และ ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized bed fermentor) โดยรายละเอียดของถังหมักแต่ละชนิด มีดังต่อไปนี้ (ทรงศักดิ์, 2543)

### 3.1 ถังหมักแบบถาด (tray bioreactor)

การหมักแบบถาดเป็นเทคนิคที่ง่าย ไม่มีการให้อากาศและไม่มีการกวนวัสดุหมัก วัสดุหมักจะถูกเกลี่ยเป็นชั้นบางๆบนวัสดุที่ขึ้น ได้แก่ ถาดอะลูมิเนียม ไม่มีการเจาะรูให้อากาศบริเวณก้นถาด ดังนั้นปัญหาที่พบ คือ ปริมาณวัสดุหมักที่จะหมักมีปริมาณจำกัด สามารถหมักได้เป็นชั้นบาง ๆ และความหนาของวัสดุหมักควรหนาไม่เกิน 5 เซนติเมตร เพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนที่เพิ่มสูงเกินไป และเพื่อให้ชั้นสเตรทได้รับอากาศอย่างทั่วถึงในปัจจุบัน ถังหมักชนิดนี้ได้ถูกพัฒนาจากเดิมที่ใช้ถาดไม้เรียงซ้อนมาเป็นชั้นสแตนเลสซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมัก ทำให้สามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ได้ดียิ่งขึ้น ถังหมักแบบนี้ ยังมีใช้ในการผลิตโคจิเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเหล้าสาเกในประเทศญี่ปุ่น (Raimbault, 1998) และถูกใช้ในการผลิตกรดซิตริก เป็นต้น นอกจากนี้ Ghildyal *et al.* (1992) ได้ศึกษาการหมักในถังหมักแบบถาด โดยหมักส่วนผสมของรำข้าวสาลีและแป้งข้าวโพดด้วยรา *Aspergillus niger* CFTRI 1105 พบว่าประสิทธิภาพการหมักจะลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความสูงของวัสดุหมัก และระบบยากต่อการควบคุม นอกจากนี้เมื่อวัสดุหมักมีความหนา จะเกิดปัญหาในเรื่องการถ่ายเทความร้อน และการควบคุมตัวแปรต่างๆ เช่น ความชื้น พีเอช และอุณหภูมิทำได้ยากขึ้น

### 3.2 ถังหมักแบบหมุน (rotating drum bioreactor)

ถังหมักแบบหมุนถูกออกแบบเพื่อปรับปรุงระบบการให้อากาศให้เพียงพอ และการผสมของวัสดุหมักให้เข้ากันได้ดี แต่มีข้อจำกัด คือ การทำลายจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากแรงเฉือน (shear force) และความร้อนที่สูงขึ้น การผสมและการให้อากาศแก่ชั้นวัสดุหมักทำได้ 2 วิธี ได้แก่ วิธีแรกโดยการหมุนของตัวถัง และวิธีที่สองโดยการติดตั้งใบกวนหรือแผ่นกั้น (baffle) ติดกับผนังด้านในของถัง

ถังหมักแบบหมุนประกอบด้วยลูกกลิ้งซึ่งทำหน้าที่ยึดและหมุนตัวถัง นอกจากนี้ยังมีถังหมักแบบหมุนที่ใช้หลักการเฟืองขับ โดยหมุนด้วยความเร็วรอบต่างๆ การผสมกันภายในถังหมักแบบหมุนจะเกิดขึ้นโดยการกลิ้งหรือการหมุนของตัวถังหมักอย่างช้าๆ เป็นการผสมโดยวิธีทางกล เช่น ใบกวน อาจมีผลทำลายจุลินทรีย์ หรือทำลายโครงสร้างของอาหาร อย่างไรก็ตามปัญหานี้จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการจับตัวเป็นก้อนของอาหาร หรืออาจเกิดการสีกันระหว่างอนุภาคทำให้จุลินทรีย์ตายได้ ถังหมักแบบหมุนประกอบด้วยช่องทางเข้าและออกของอากาศ โดยอากาศอาจเข้าสู่ถังหมักโดยผ่านทางด้านล่างถังหรือตามแนวความยาวถังโดยหัวฉีดแบบพ่นฝอย การระบายอากาศ

นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของถังหมักโดยการติดตั้งแผ่นกั้นเพิ่มเติมที่เพลาหมุนตัวถังหรืออาจแบ่งถังหมักเป็น 3 ส่วน ใน 4 ส่วน โดยทุกส่วนของถังหมักต้องสามารถถอดประกอบเพื่อล้างทำความสะอาด และฆ่าเชื้อได้

### 3.3 ถังแพคเบด (packed-bed reactor)

ถังแพคเบดเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชนิดหนึ่งที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเคมี เครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นถังทรงกระบอกสูง นิยมทำจากแก้วหรือพลาสติก ขนาดของถังขึ้นอยู่กับความต้องการให้มีความเหมาะสมกับการใช้งาน โดยคำนึงถึงสัดส่วนของความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถัง นอกจากนี้มีจุดเด่นเฉพาะตัวของถังแพคเบด คือ ภายในถังจะบรรจุของแข็งที่มีการจัดเรียงตัวอย่างมีรูปแบบพื้นผิวที่มีรูพรุน ซึ่งเป็นช่องทางการอัดอากาศผ่านไปยังชั้นวัสดุหมัก ถังหมักแบบแพคเบดมักวางอยู่ในห้องที่มีอุณหภูมิคงที่หรือมีระบบน้ำหล่อเย็น เพื่อควบคุมอุณหภูมิการให้อากาศมีความสำคัญมากในระบบนี้ โดยปกติอากาศจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ทางด้านล่างด้วยอากาศขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้วัสดุหมักแห้งเกินไป อากาศนอกจากเป็นแหล่งออกซิเจนของจุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนแล้วยังช่วยระบายความร้อนในแพคเบดด้วย โดยความร้อนสามารถถ่ายเทไปยังอากาศได้โดยการพาความร้อน จากเหตุผลดังกล่าว ความชื้น อัตราการไหลของอากาศมักถูกควบคุมให้คงที่เพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่ โดยให้มีการสูญเสียน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยที่สุด การหมักในถังแพคเบดเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นระบบปิดจึงลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ได้มากกว่าแบบถาด และไม่ทำให้เกิดปัญหาการทำลายเส้นใยจากการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับถังหมักแบบหมุน (Ghildyal *et al.*, 1994)

สามารถนำถังแพคเบดไปใช้งานสามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย โดยมีจุดประสงค์การใช้งานที่แตกต่างกัน เช่น เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่ไหลผ่านเบด ใช้เป็นที่บรรจุตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ใช้ตรึงเอนไซม์ในกระบวนการเชิงวิศวกรรมชีวเคมี เป็นต้น

ข้อดีและข้อเสียของถังหมักแบบแพคเบด แบ่งได้ดังนี้ (มณีรัตน์, 2542)

ถังหมักแบบแพคเบดมีข้อดี คือ สามารถควบคุมตัวแปรของระบบได้ดีกว่าถังแบบถาด และถังหมักแบบนี้ไม่ทำลายจุลินทรีย์ เช่น ทำลายเส้นใยของรา เนื่องจากการเคลื่อนที่ นอกจากนั้นยังประหยัดพลังงานเมื่อเทียบกับถังหมักแบบหมุน เนื่องจากการหมุนและไม่มีกากวน สุดท้ายถังหมักแบบแพคเบดยังประหยัดเนื้อที่มากกว่าการหมักแบบถาด

ถังหมักแบบแพคเบดมีข้อเสียคือ จะมีปัญหาการถ่ายเทความร้อน ทำให้เกิดความร้อนสะสมในระบบ และทำการแยกหรือนำผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมักได้ยากกว่าการหมักแบบถาด และหมักได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่สม่ำเสมอ

### 3.4 ถังหมักแบบมีใบกวน (stirred bioreactor)

ถังหมักแบบมีใบกวนมีอยู่แบบ 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามลักษณะการวางถังว่าเป็นแนวนอนหรือ แนวตั้ง ถ้าวางตามแนวนอนจะคล้ายกับถังหมักแบบตัวถังหมุน แต่ต่างกันตรงที่ ถังแบบมีใบกวนจะมีเครื่องขูด (scraper) หรือ ใบพัด (paddles) ติดอยู่ในถังหมัก ตามแนวแกน เพื่อช่วยผสมวัสดุหมักโดยที่ตัวถังไม่ต้องหมุน ลักษณะของถังหมักเมื่อวางตามแนวตั้ง จะคล้ายกับถังหมักแบบแพคเบดแต่จะต่างกันตรงที่มีการกวนผสมวัสดุหมักอย่างต่อเนื่อง หรือเป็นระยะ

### 3.5 ถังชีวปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไคซ์เบด (air-solid fluidized bed bioreactor)

ลักษณะทั่วไปของถังหมักแบบนี้คือ มีคอลัมน์สูง มีการให้อากาศ หรือ ก๊าซทางด้านล่าง ด้วยความเร็วมากพอให้อนุภาควัสดุหมักลอยตัวและสัมผัสกับอากาศ หลักการทำงานของถังหมักแบบ ถังชีวปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไคซ์เบด คือ มีการให้อากาศที่ความเร็วสูงพวยพุ่งไปยังเบดของอนุภาคของแข็ง และทำให้อนุภาคของแข็งค่อย ๆ เคลื่อนที่จนในที่สุดจะแขวนลอยอยู่ในอากาศ ซึ่งเบดในลักษณะนี้เรียกว่า ฟลูอิดไคซ์เบด (fluidized bed) โดยค่าความเร็วอากาศเข้าจะต้องสูงกว่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิดไคซ์เบด (minimum fluidizing velocity) เบดจะมีลักษณะเหมือนน้ำเดือด ที่อนุภาควัสดุหมักเปรียบเสมือน ฟองอากาศที่เคลื่อนที่กระจายทั่วไปในน้ำ แต่ในที่นี้เป็นการเคลื่อนที่ของอนุภาควัสดุหมักในอากาศ ข้อดีของการใช้ ASFB คือทำให้กระบวนการอัดอากาศได้ผลดีขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับการหมักแบบอื่น



ถังหมักชนิดนี้ใช้ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งในระหว่างการหมักจะมีการกระเพื่อมเพื่อป้องกันการเกาะของของแข็งที่ผนังของถังหมัก

ลักษณะของถังหมักแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 1 และจากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าถังชีวปฏิกรณ์แบบแพคเบดเหมาะต่อระบบการหมักแบบแห้งและมีศักยภาพสูงในการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรม



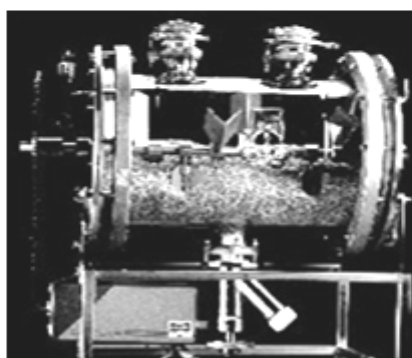
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพที่ 1 ลักษณะของถังหมักชนิดต่างๆ ที่ใช้ในระบบการหมักแบบแห้ง

(ก) ถังหมักแบบถาด

(ข) ถังหมักแบบตัวถังหมุน

(ค) ถังหมักแบบแพคเบด

(ง) ถังหมักแบบมีใบกวน

(จ) ถังชีวปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไคซ์เบด

ที่มา: สุภาภรณ์ (2546)

#### 4. ปัจจัยที่จำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยถังหมัก

##### 4.1 การถ่ายมวล (mass transfer)

การถ่ายเทมวลมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ โดยมีอิทธิพลต่อระบบการหมักแบบแห้งดังนี้

4.1.1 ส่งผลต่อการแพร่สารอาหารไปยังจุลินทรีย์ และปล่อยเอนไซม์สารเร่งปฏิกิริยาไปยังผิวหน้าวัสดุหมัก มีผลต่อการดูดซับและปล่อยสารเร่งปฏิกิริยาบนผิวหน้าวัสดุหมัก

4.1.2 ส่งผลต่อการแพร่ของก๊าซจากวัฏภาคก๊าซไปยังผิวหน้าวัสดุหมัก และก๊าซจากผิวหน้าวัสดุหมักมา ยังอากาศเหนือถังหมัก

4.1.3 ส่งผลต่อสารผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาจากผิววัสดุหมัก การถ่ายเทมวลแบ่งเป็น 2 ระดับ คือการถ่ายเทมวลภายในอนุภาค (intraparticle transfer) และการถ่ายเทมวลระหว่างอนุภาค (interparticle transfer) ซึ่งขั้นตอนการถ่ายเทมวลที่ช้าที่สุดจะเป็นขั้นตอนที่จำกัดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์

การถ่ายเทมวลภายในอนุภาค อัตราการแพร่ของสารอาหาร หรือ สารผลิตภัณฑ์ในวัสดุหมัก ขึ้นกับคุณลักษณะโครงสร้างวัสดุหมัก ความพรุน รูปร่าง ขนาด และพื้นที่ผิวภายใน ซึ่งค่าที่ใช้ในการทดสอบการถ่ายเทมวลในวัสดุหมักคือ ค่าความสามารถในการแพร่ (effective diffusivity) คิดจาก อัตราส่วนระหว่าง อัตราการเกิดปฏิกิริยาในอนุภาควัสดุหมักแห้ง และ อัตราการเกิดปฏิกิริยาบนผิวอนุภาควัสดุหมัก ในช่วงการเกิดปฏิกิริยา เมื่อวัสดุหมักส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ เป็นผลให้โครงสร้างเปลี่ยน และทำให้ค่าความสามารถในการแพร่เปลี่ยนไปด้วย

ในกรณีการส่งถ่ายมวลภายในอนุภาค เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายสารอาหารและเอนไซม์ในมวลของวัตถุดิบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ

1. การแพร่กระจายของสารอาหารเข้าสู่มวลของจุลินทรีย์ เช่น การแพร่กระจายของก๊าซออกซิเจนเข้าสู่มวลของรา เป็นต้น ในกระบวนการเตรียมโคจีนนั้นเชื้อราหมักเจริญอยู่ที่ผิว หรือ ไซเข้า

ไปในเนื้อของวัตถุดิบ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเมื่อเส้นใยไซไฟเข้าไปในเนื้อจำเป็นต้องมีการกระจายของออกซิเจนเข้าไปอย่างดี จึงจะสามารถเจริญได้เต็มที่ (Rahardjo *et al.*, 2005)

2. การย่อยสลายวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ โดยทั่วไปวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักนั้นอยู่ในสภาพอาหารแข็งมักอยู่ในสภาพที่ไม่ละลาย แต่จุลินทรีย์กลับต้องการวัตถุดิบในสภาพที่ละลายเพื่อ จะดูดซึมเข้าไปในเซลล์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงจำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ประเภทที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นแล้ว ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ขึ้นอยู่กับการแพร่กระจายของเอนไซม์เข้าไปในวัตถุดิบ แต่ทั้งนี้ก็ต้องขึ้นอยู่กับว่าวัตถุดิบนั้นมีรูหรือช่องว่างที่เพียงพอให้เอนไซม์แพร่กระจายเข้าไปได้มากหรือน้อย ซึ่งตามปกติถ้าช่องว่างระหว่างอนุภาคมีขนาดใหญ่ จะเกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ดี

การถ่ายเทมวลระหว่างอนุภาค มีความสำคัญมากสำหรับการส่งถ่ายออกซิเจนซึ่งส่วนใหญ่เป็นการแลกเปลี่ยนออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ระหว่างวัฏภาคก๊าซ หรือ ระหว่างช่องว่างอนุภาค หรือ วัฏภาคของเหลวไปยังวัฏภาคของแข็ง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับระดับความชื้น ขนาดอนุภาค วัสดุหมัก และ อัตราการให้อากาศ ซึ่งในกรณีนี้อาศัยปัจจัยหลัก 2 ประการ

1. ช่องว่าง (void fraction) หมายถึง ปริมาตรของช่องว่างระหว่างมวลของวัตถุดิบ ซึ่งมีอากาศที่จำเป็นต่อการนำไปใช้ของจุลินทรีย์บรรจุอยู่แต่ทั้งนี้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ประการคือ ปริมาณความชื้น และสภาพธรรมชาติของวัตถุดิบ เช่นวัตถุดิบประเภทกระดาษ ย่อมมีช่องว่างใหญ่กว่าพวกเศษผักและผลไม้ เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วในการหมักในสภาพอาหารแข็ง ควรมีช่องว่างในระหว่างมวลของวัตถุดิบอย่างน้อยประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทั้งหมด ในการส่งถ่ายออกซิเจนในระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบ

2. การผสมและการให้อากาศ ทั้งการผสมและการให้อากาศขึ้นอยู่กับช่องว่างระหว่างอนุภาคด้วย เพราะถ้าช่องว่างกว้างเพียงพอก็ไม่จำเป็นต้องมีการผสม และการให้อากาศ ทั้งนี้เพราะอากาศในช่องว่างมีเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่แล้ว แต่ตามปกติการผสมและการให้อากาศจำเป็นต่อการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากกระบวนการหายใจของจุลินทรีย์ และยังมีความสำคัญในการถ่ายเทความร้อน และความชื้นระหว่างอาหารที่หมัก (Mudgett, 1986) ขณะเดียวกันก็ช่วยให้อากาศที่อยู่ในช่องว่างระหว่างมวลของวัตถุดิบเป็นอากาศใหม่ เช่น การศึกษา

การเติมอากาศ และการหมุนในถังหมักแบบหมุน โดยต้นเชื้อ *A. awamori* NRRL 4869 มีราข้าวสาลีเป็นวัสดุหมัก เมื่อเพิ่มอัตราการเติมอากาศ เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้มากขึ้น ขณะที่การเพิ่มอัตราเร็วการหมุนจะทำให้อัตราการสร้างสปอร์ลดลง และการสร้างสปอร์เกิดได้ช้า และผลการเพิ่มอัตราการไหลอากาศยังทำให้การผลิตเอนไซม์  $\alpha$ -galactosidase เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Silman, 1980)

#### 4.2 การถ่ายความร้อน (heat transfer)

ในระหว่างการหมักแห้งจะเกิดการสะสมความร้อนซึ่งถูกผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะช่วง ระยะเติบโตทวีคูณ (log phase) ความร้อนที่เกิดขึ้นสูงถึง 3200 kcal/kg dry matter (Lonsane *et al.*, 1985)

การนำความร้อนที่ต่ำของวัสดุหมักกับผนังถังหมัก ทำให้เกิดปัญหาการสะสมความร้อนเป็นปัญหาต่อการหมัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องลดอุณหภูมิระหว่างการหมัก โดยทั่วไปจะทำการลดอุณหภูมิโดยการให้อากาศ การเพิ่มการให้อากาศ (aeration) สามารถกำจัดความร้อนที่เกิดขึ้นในถังหมักได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Saucedo-Castaneda *et al.*, 1992) และยังสามารถลดอุณหภูมิได้อย่างมากที่ระดับความสูงเบดเพิ่มขึ้นเป็นผลให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น แต่การให้อากาศในปริมาณมากเกินไป ถ้าความชื้นในอากาศต่ำจะทำให้ความชื้นในระบบสูญเสียไป จนทำให้ไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงจะต้องควบคุมการให้อากาศเพื่อลดอุณหภูมิคู่กับการควบคุมปริมาณความชื้นหรือความชื้นสัมพัทธ์ด้วย

#### 4.3 ระบบผสมและการพลิกกลับวัสดุหมัก (agitation)

ในกระบวนการหมักแบบแห้ง สามารถแบ่งกลุ่มถังหมักตามลักษณะการกลับวัสดุหมัก ได้ 3 กลุ่ม คือ ถังหมักแบบหยุดนิ่ง (static) แบบมีการกลับเป็นช่วง (periodically agitated) และ แบบมีการผสมอย่างต่อเนื่อง (continuously agitated) การผสมในถังหมักทำให้เกิดสภาวะที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous conditions) ในถังหมัก โดยเฉพาะอุณหภูมิ และ ปริมาณก๊าซต่างๆ นอกจากนี้ การผสมจะช่วยให้อาหาร น้ำ บัฟเฟอร์ กรด หรือ เบส ที่เติมลงไปในช่วงการหมักเข้ากับวัสดุหมักเดิมได้ดี และ ช่วยป้องกันไม่ให้วัสดุหมักแห้งเกาะกันเป็นก้อน ถ้าระบบการหมักแบบหยุดนิ่งไม่มีการผสม หรือ การพลิกกลับวัสดุหมัก อาจทำให้เกิดความต่างของอุณหภูมิถึง

3 องศาเซลเซียส ทุก ๆ ความสูงเบดที่เพิ่มขึ้น 1 เซนติเมตร และทำให้ออกซิเจนในช่องว่างระหว่างวัสดุหมักน้อยลง รวมถึงปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้นถึงจุดที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพได้ ในขณะที่การหมักที่มีการพลิกกลับวัสดุหมักเป็นช่วง ๆ จะช่วยเติมอากาศบริสุทธิ์ให้กับช่องว่างระหว่างวัสดุหมักแห้ง สำหรับความถี่ในการกลับวัสดุหมักเพื่อให้อากาศ ขึ้นกับความพรุน และ ปริมาณความชื้นของวัสดุหมักแห้ง ถ้าวัสดุหมักแห้งมีความพรุนมาก หมายถึงช่องว่างของอากาศมีมาก ต้องการออกซิเจนมาก (Cannel and Moo Young, 1980) จึงจำเป็นต้องมีการกลับวัสดุหมักบ่อยๆ นอกจากนี้ยังขึ้นกับความต้องการที่จะทำให้วัสดุหมักมีอุณหภูมิเย็นลง ซึ่งเกี่ยวเนื่องไปยังอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นอัตราการกลับวัสดุหมักจึงไม่ควรที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ขึ้นกับความเหมาะสม อย่างไรก็ตาม การกลับวัสดุหมักอาจจะไปทำลายเส้นใยที่เกาะบนวัสดุหมัก และมีผลการสร้างสปอร์ของเส้นใยที่ทำหน้าที่ดึงอากาศ หรือ ทำลายตัววัสดุหมักเอง แต่บางครั้งก็เกิดเป็นผลดีต่อระบบการหมัก เนื่องจากเส้นใยที่ถูกทำลาย ก็กระจายไปยังอนุภาควัสดุหมักทำให้วัสดุหมักมีเชื้อเกิดขึ้นได้ทั่วถึงมากขึ้น ปัจจุบันระบบการกลับวัสดุหมักในถังหมักสำหรับการหมักแบบแห้ง สามารถออกแบบเพื่อให้เกิดการทำลายเส้นใยน้อยที่สุด

#### 4.4 ระบบการให้อากาศ (aeration)

การหมักแบบแห้งส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศหายใจ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศเข้าสู่ระบบการหมักเพื่อช่วยในการถ่ายเทออกซิเจนไปยังเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวหน้าวัสดุหมัก นอกจากนี้การให้อากาศยังช่วยลดความร้อน และสารระเหยบางชนิด ที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic heat) ของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก การให้อากาศเหมาะสมกับกรณีที่ไม่ต้องการให้เส้นใยของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย ทั้งนี้ความเร็วของอากาศที่เข้าสู่ระบบขึ้นอยู่กับระยะทางจากตำแหน่งที่อากาศที่เข้าสู่ระบบ ไปยังช่องว่างอากาศระหว่างอนุภาค ถ้าระยะทางมาก อาจต้องให้อากาศที่ความเร็วสูง แต่การให้อากาศที่ความเร็วสูงๆ อาจจะทำให้ความชื้นในอากาศถ่ายเทไปยังวัสดุหมักแห้งได้น้อย ทำให้วัสดุหมักแห้ง เชื้อจุลินทรีย์ขาดน้ำ รวมทั้งสิ้นเปลืองพลังงานมาก ระบบการให้อากาศทั่วไปจะให้อากาศผ่านแผ่นเพลตที่มีรูขนาดเล็กจำนวนมาก เพื่อกระจายลมให้ทั่วทุกจุดของถังหมัก อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด ได้แก่ ความต้องการตามธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ ออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโต การสร้างสารอาหารและผลิตภัณฑ์ การนำเอาสารเมตาบอไลต์ออก ระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือสารระเหยที่มีผลต่อระบบ ความหนาวัสดุหมัก ความหนาแน่นวัสดุหมัก

และความชื้นในวัสดุหมัก เป็นต้น (Losane *et al.*, 1985) สำหรับการหมักแบบแห้งที่ไม่มีระบบถ่ายเทอากาศ ก็ควรมีการเติมอากาศบริเวณเหนือผิวหน้าวัสดุหมัก

#### 4.5 ระบบการวัดและควบคุมค่าพารามิเตอร์

พารามิเตอร์ที่สำคัญในการออกแบบถังหมักในการหมักแบบแห้ง ได้แก่ ความชื้น ซึ่ง เป็นพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญ เพราะเป็นผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การให้ความชื้น กระจายสม่ำเสมอในถังหมักจึงขึ้นกับการกวน การผสม หรือ การกลับวัสดุหมัก โดยกลไกของถัง หมักที่ได้ออกแบบไว้ ถ้าน้ำไปซัง ณ บริเวณใดในถังหมักและมีการผสมถี่เกินไป ก็จะทำให้วัสดุ หมักเกาะกันแน่นเป็นก้อน แต่วัสดุหมักส่วนที่น้ำกระจายไปไม่ถึงก็ทำให้วัสดุแห้งและแตกละเอียด เกินไป ดังนั้น ในถังหมักจึงต้องมีการออกแบบการวัดค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญได้ พร้อมกับสามารถ ควบคุมพารามิเตอร์เพื่อคงสถานะแวดล้อมที่ดีในการหมักไว้ตลอดระยะเวลาการหมัก พารามิเตอร์ แวดล้อมตัวอื่น ที่ต้องมีการวัด และ ควบคุมคือ การให้อากาศ โดยอาจจะออกแบบให้มีการปรับ ความชื้นในอากาศก่อนเข้าสู่ระบบ หรือมีระบบสเปรย์น้ำ ค่าพีเอชเป็นพารามิเตอร์อีกตัวที่วัดยากใน การหมักแบบแห้ง เพราะวัสดุหมักในถังหมักอยู่ในสถานะของแข็ง และ ถ้าต้องมีการเติม กรด - เบส เข้าไปผสมเพื่อปรับสถานะ ก็ยากที่จะทำให้วัสดุหมักมีความเป็น กรด - เบส ที่สม่ำเสมอ กัน ดังนั้น เครื่องมือวัดพีเอช อุปกรณ์การปล่อยกรด-เบส และ อุปกรณ์ในการผสมวัสดุหมัก ต้องมี การออกแบบมาเฉพาะ เครื่องมือ อุปกรณ์ทุกชนิดที่วัด และควบคุมพารามิเตอร์สิ่งแวดล้อมควรอ่าน ค่าได้ตลอดเวลา เช่น ดิจิตัล เทอร์โมคอบเบิล หรือ หัววัดค่าพีเอช

#### 4.6 ระบบการฆ่าเชื้อและป้องกันการปนเปื้อน

แม้การหมักแห้งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการหมักแบบไม่ปลอดเชื้อ (non-aseptically) ยกเว้นในบางกรณีที่ต้องมีการฆ่าเชื้อวัสดุหมักแห้ง ถังหมัก หรือ อากาศที่ให้กับระบบ จำเป็นต้องมีการป้องกันการปนเปื้อน หรือมีให้น้อยที่สุด การให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อวัสดุหมักยัง ช่วยเปลี่ยนโครงสร้างทางกายภาพ จุลินทรีย์สามารถใช้ประโยชน์จากวัสดุหมักได้มากขึ้น ได้ พยายามฆ่าเชื้อวัสดุหมักโดยใช้ไอน้ำภายในถังหมัก แต่ทำได้ยากในการหมักปริมาณมาก ดังนั้นจึง นิยมทำวัสดุหมักให้สุกก่อนบรรจุลงถังหมัก นิยมใช้แอลกอฮอล์ในการฆ่าเชื้อถังหมัก และอุปกรณ์ และใช้สารฟอกฟอร์มาดีไฮด์ในการฆ่าเชื้อห้องเก็บวัตถุดิบ และห้องเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ น้ำที่ใช้ เพิ่มความชื้นในอากาศ และ อากาศ จะต้องถูกฆ่าเชื้อก่อน เช่น ผ่านตัวกรอง หรือ หลอด UV ในช่วง

ระหว่างการหมัก การออกแบบถังหมักให้เป็นระบบปิดสามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ แต่ในกรณี ที่ถังหมักเป็นแบบเปิด เช่น ถังหมักแบบถาดจะต้องใช้เชื้อที่แข็งแรง มีปริมาณมากพอ และอาศัย การปรับสภาวะให้เหมาะกับเชื้อที่ต้องการให้เจริญ เช่น ปรับพีเอชปรับความชื้น โดยใช้ผ้า หรือ กระดาษที่บางและสะอาดมาคลุมผิวหน้าวัสดุหมัก เพื่อป้องกันน้ำที่เกิดการควบแน่นตกลงบนวัสดุ หมัก และห้องบ่มเชื้อจะต้องทาสีกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผนังห้อง

#### 4.7 อุณหภูมิของวัสดุหมัก

อุณหภูมิของวัสดุหมักค่อนข้างเป็นจุดวิกฤตในการหมักแบบแห้ง โดยมีความสำคัญ ต่อ การเกิดใหม่ของสปอร์ การเจริญของจุลินทรีย์ การสร้างสปอร์ และการสร้างผลิตภัณฑ์ ความ ร้อนถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการทางชีวเคมีที่ระดับกิจกรรมจุลินทรีย์ในวัสดุหมักแห้ง และนำไปสู่ ความต่างของอุณหภูมิ ซึ่งขึ้นกับความสามารถในการถ่ายเทความร้อนของวัสดุหมัก (Mudgett, 1986) ความร้อนที่เกิดขึ้นสามารถสร้างความเสียหายให้กับทั้งมวลชีวภาพ และผลิตภัณฑ์ โดยอัตรา การนำความร้อนในอนุภาคของแข็งสามารถทำนายได้เมื่ออนุภาคมีลักษณะสมมาตรกัน มี โครงสร้างเป็นเนื้อเดียวกัน

การถ่ายเทความร้อนโดยรวม ถูกจำกัดด้วยอัตราการถ่ายเทความร้อนภายในอนุภาค และระหว่างอนุภาค การถ่ายเทความร้อนจากผิวหน้าอนุภาคไปยังวัฏภาคก๊าซ และ ถูกจำกัดด้วย อัตราการถ่ายเทความร้อนจากวัฏภาคก๊าซออกสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังขึ้นกับลักษณะของวัสดุ อินทรีย์ซึ่งมีความชื้นต่ำเป็นสภาวะที่ยากต่อการถ่ายเทความร้อน การให้อากาศจะช่วยให้การถ่ายเท ความร้อนจากวัฏภาคของแข็งไปยังวัฏภาคก๊าซ ในกรณีที่ไม่มี การพาความร้อนด้วยการให้อากาศ ความร้อนจะถูกถ่ายเทจากวัฏภาคของแข็งไปวัฏภาคก๊าซด้วยการนำความร้อน แล้วแพร่จากวัฏภาค ก๊าซไปยังอากาศภายนอก และการให้อากาศยังช่วยเรื่องการระเหย (evaporative cooling) ซึ่งเป็น แหล่งระบายความร้อนที่ใหญ่และมีประสิทธิภาพ อัตราการระเหย (cooling rate) สามารถควบคุม โดยการให้อากาศแห้ง หรืออากาศที่ปรับความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ให้ไหลผ่านเบด อากาศแห้งสามารถเอาปริมาณความร้อนออกจากอนุภาคของแข็งมากกว่า อากาศที่อิ่มตัวด้วย ความชื้น

#### 4.8 ความชื้นและปริมาณน้ำอิสระ

ในกระบวนการหมักแบบแห้ง จุลินทรีย์เจริญบนอนุภาควัสดุหมัก ที่ปราศจากการมีน้ำอิสระ น้ำที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก จะอยู่ในรูปแบบที่ซับซ้อนภายในวัสดุหมัก หรือเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนผิวหน้าวัสดุหมัก หรือ ยึดกับส่วนที่เป็นของแข็งในวัสดุหมักด้วยพันธะแบบหลวม ๆ ความชื้นในการหมักแห้งทั่วไปจะอยู่ในช่วง 30-85 เปอร์เซ็นต์ น้ำอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อตัววัสดุเกิดการอิมตัวแล้ว เช่น น้ำอิสระในมันสำปะหลัง และ ข้าว จะเกิดที่ความชื้น 50-55 เปอร์เซ็นต์ (Moo-Young *et al.*, 1983) วัสดุหมักส่วนใหญ่ น้ำอิสระจะปรากฏก่อนถึงระดับความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญอย่างมากต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงต้องปรับให้เหมาะสมและควบคุมให้คงที่ เพราะถ้ามีความชื้นมากเกินไป จะทำให้อนุภาควัสดุหมักติดกัน และ ติดกับผนังด้านข้างถังหมัก น้ำจะแทรกตัวอยู่ในระหว่างช่องว่างอนุภาค ทำให้เป็นปัญหาในการแลกเปลี่ยนก๊าซ และ ยากต่อการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ถ้าวัสดุหมักมีน้ำน้อย จะมีผลต่อการบวมของวัสดุหมัก การแพร่ของสารอาหารจะน้อยลง และ มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์กิจกรรมเอนไซม์จะถูกจำกัดลง เมื่อความชื้นลดต่ำกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไป ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ต้องการจะอยู่ในรูปของปริมาณน้ำอิสระ (water activity :  $A_w$ ) และ สามารถหาค่า  $A_w$  ได้จาก

$$A_w = \frac{\text{ความดันไอของน้ำในวัสดุหมัก}}{\text{ความดันไอน้ำบริสุทธิ์}}$$

หรือ

$$A_w = \frac{RH}{100}$$

เมื่อ  $RH$  คือ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ นักวิทยาศาสตร์การอาหารได้ทำการวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำอิสระ และ ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก ซึ่งอยู่ในช่วง  $A_w$  เท่ากับ 0.9 ความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสภาวะปกติที่ใช้ในการหมักแห้ง และ พบว่าค่า  $A_w$  เปลี่ยนไปน้อยเมื่อเทียบกับค่าความชื้นที่เปลี่ยนไป การลดลงของ  $A_w$  มีมากในช่วงการปรับตัวของเชื้อจุลินทรีย์ ช่วงอัตราการเจริญลดลง และช่วงสิ้นสุดการเจริญที่มีการผลิตมวลชีวภาพน้อย ส่วนใหญ่ในการหมักแบบแห้งที่ใช้ราเป็นต้นเชื้อมีค่า  $A_w$  อยู่ในช่วง 0.8-0.9 (Raimbault, 1998)

ในช่วงการสร้างผลิตภัณฑ์ค่า  $A_w$  ขั้นต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถสร้างผลิตภัณฑ์จะต่างจากค่า  $A_w$  ขั้นต่ำที่ทำให้ให้เกิดการเจริญ ความชื้นที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง



ตั้งแต่ 22.4-75 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับธรรมชาติชนิดวัสดุหมัก และเชื้อจุลินทรีย์ ที่ใช้สารละลายที่นำมาใช้ปรับค่า  $A_w$  ในการหมักแบบแห้งทั่วไป ได้แก่ สารละลายเกลืออิ่มตัว โดยปรับ  $A_w$  ช่วงแรกให้เหมาะกับการเจริญ และ ปรับ  $A_w$  ช่วงหลังให้เหมาะกับการสร้างผลิตภัณฑ์

### ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำอิสระ และ ความชื้น

ปกติค่า  $A_w$  และ ความชื้น มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับสภาวะของระบบการหมักแบบแห้ง ความร้อนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม มีผลทำให้ความชื้นลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากการกลายเป็นไอ ดังนั้นจึงต้องมีการให้น้ำที่อิ่มตัวเพื่อเพิ่มความชื้น ระหว่างการให้อากาศ การเปลี่ยนแปลงความชื้นในวัสดุหมัก มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และยังขึ้นกับ ความสามารถในการดูดซับ (sorption) ความสามารถในการปลดปล่อย (desorption) ของวัสดุหมัก และสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม เช่นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่ถูกปล่อยออกมาจากการผลิตโคจิ โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. บนข้าวหนึ่งทำให้ ค่า  $A_w$  ลดลง

### การวัด และ การควบคุม ปริมาณน้ำอิสระ และความชื้น

การหาปริมาณน้ำอิสระในวัสดุหมักทำได้โดยการวัดค่าความชื้นสัมพัทธ์ ในวัฏภาคก๊าซเหนือถึงหมัก โดยมีสมมุติฐานที่ว่า วัฏภาคก๊าซอยู่ในสภาวะสมดุล (equilibrium) กับวัฏภาคของเหลว ในวัสดุหมักแห้ง แต่ความชื้นของวัสดุหมักแห้งในถึงหมักไม่สามารถบอกได้จากวัฏภาคก๊าซที่อยู่เหนือถึงหมัก

ความชื้นสัมพัทธ์ คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณความชื้นที่มีอยู่จริงในอากาศกับปริมาณความชื้นที่อากาศขณะนั้นจะมีได้ ณ อุณหภูมิเดียวกัน ค่าความชื้นสัมพัทธ์แสดงในรูปของร้อยละ หรือเป็นอัตราส่วนของจำนวนไอน้ำที่มีอยู่ในอากาศต่อจำนวนไอน้ำที่อาจมีได้จนอิ่มตัวเต็มที่ในอากาศเดียวกันนั้น ความชื้นสัมพัทธ์จึงกำหนดเป็นร้อยละ โดยให้จำนวนความชื้นที่อิ่มตัวเต็มที่ เป็น 100 ส่วน (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2545)

ดังนั้น 100% RH หมายถึง ไอน้ำอิ่มตัว (saturation gas)

0% RH หมายถึง อากาศแห้ง (vapor-free gas)

$$\text{ความชื้นสัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำที่มีอยู่จริงในอากาศ}}{\text{ปริมาณน้ำที่อากาศนั้นจะมีได้ ณ อุณหภูมิเดียวกัน}} \times 100$$

โดยเครื่องมือที่ใช้วัดความชื้นสัมพัทธ์ เรียกว่า ไฮโกรมิเตอร์ (hygrometer) ซึ่งมีอยู่หลายหลากชนิด มีทั้งทำด้วยกระเปาะเทอร์มอมิเตอร์ และเป็นอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ ไฮโกรมิเตอร์ซึ่งสามารถทำได้เองและมีความน่าเชื่อถือเรียกว่า สลิงไซโครมิเตอร์ (sling psychrometer) ประกอบด้วยเทอร์มอมิเตอร์จำนวน 2 อันอยู่คู่กัน โดยมิเตอร์อันหนึ่งมีผ้าชุบน้ำหุ้มกระเปาะไว้ เรียกว่า กระเปาะเปียก (wet bulb) ส่วนกระเปาะเทอร์มอมิเตอร์อีกอันหนึ่งไม่ได้หุ้มอะไรไว้ เรียกว่า กระเปาะแห้ง (dry bulb) เมื่อหมุนสลิงไซโครมิเตอร์จับเวลา 3 นาที อ่านค่าแตกต่างของอุณหภูมิกระเปาะทั้งสองบนตารางเปรียบเทียบ ก็จะได้ค่าความชื้นสัมพัทธ์มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (วรัญญู, 2549)

ประเทศไทยมีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยตลอดปี 72-74 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือ 62 ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ในช่วงฤดูร้อน ความชื้นที่ภาคต่างๆของประเทศไทย ดังตารางที่ 2

ในการควบคุมความชื้นของวัสดุหมักนั้นนิยมทำโดยใช้ เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์แบบไอน้ำและ ต้องคำนึงถึงการกระจายตัวของไอน้ำในอากาศ การเพิ่มความชื้นในอากาศโดยใช้ไอน้ำทำได้โดยการพ่นไอน้ำไปในอากาศหลังจากนั้นไอน้ำจะผสมกับอากาศ สามารถอธิบายด้วยการถ่ายเทความร้อน เมื่อไอน้ำถูกปล่อยจากหัวพ่นไอน้ำสู่อากาศ จะเกิดการระเหยของไอน้ำทำให้ไอน้ำในอากาศเพิ่มขึ้นส่งผลให้อากาศมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น บริเวณใกล้หัวพ่นละอองน้ำสามารถมองเห็นไอน้ำและจะหายไปเมื่อการระเหยของน้ำเกิดขึ้นหรือเกิดการถ่ายเทมวลไอน้ำไปสู่อากาศอย่างสมบูรณ์ (Armstrong Humidification Group, 2005a)

ตารางที่ 2 สถิติความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยของประเทศในช่วงฤดูกาลต่างๆ

| ภาค                | ความชื้นสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) |             |           |                  |
|--------------------|--------------------------------|-------------|-----------|------------------|
|                    | ฤดูหนาว (%)                    | ฤดูร้อน (%) | ฤดูฝน (%) | เฉลี่ยตลอดปี (%) |
| เหนือ              | 73                             | 62          | 81        | 74               |
| ตะวันออกเฉียงเหนือ | 69                             | 65          | 80        | 72               |
| กลาง               | 71                             | 69          | 79        | 73               |
| ตะวันออก           | 71                             | 74          | 81        | 76               |
| ใต้ฝั่งตะวันออก    | 81                             | 77          | 78        | 79               |
| ใต้ฝั่งตะวันตก     | 77                             | 76          | 84        | 80               |

ที่มา: กรมอุตุนิยมวิทยา (2545)

#### 4.9 ค่าความเป็นกรด – เบส (ค่าพีเอช)

ในการหมักแบบแห้ง ส่วนใหญ่การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เกิดเนื่องจากระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ แล้วปลดปล่อยสารจำพวก กรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น กรดอะซิติก (acetic) แลคติก (lactic) และซิตริก (citric) ส่งผลให้ค่าพีเอชลดลง หรือสารที่เกิดขึ้นมาพร้อมกับกรดอินทรีย์ อาจจะทำให้พีเอชสูงขึ้น หรืออาจเกิดจาก เมื่อจุลินทรีย์ใช้ประโยชน์จากแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate) เมื่อจุลินทรีย์ใช้แอมโมเนียม หรือ ยูเรีย จะเกิดสถานะที่เป็นกรดขึ้นทำให้พีเอชต่ำลง แต่เมื่อจุลินทรีย์ใช้ในเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชจะสูงขึ้น Raimbault (1998) พบว่า ระหว่างการเจริญของ *A. oryzae* บนข้าว ค่าพีเอช เริ่มแรกลดลง 6.6-5.2 แต่ต่อมาก่าพีเอชเพิ่มขึ้น เชื่อว่าเกิดจากการใช้โปรตีนในข้าว Raimbault and Alazard (1980) พบว่า ขั้นแรกของการหมักแบบแห้งค่าพีเอช เพิ่มขึ้นเพราะเกิดการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ยูเรียระหว่างการเจริญอย่างรวดเร็ว การเกิดแอมโมเนียมเกิดมากกว่าอัตราการสลาย ยูเรีย ทำให้ค่าพีเอช ลดลง และค่าพีเอชจะเพิ่มอีกครั้งในช่วงระยะคงที่ อย่างไรก็ตามค่าพีเอชในช่วงระยะเวลาการหมักจะอยู่ในช่วง 5.0-6.2

ในการหมักแบบแห้งควบคุมค่าพีเอชยาก ดังนั้นจะต้องเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ได้กับ ค่าพีเอช ช่วงกว้าง ในสถานะที่เป็นกรดทำให้การสลายโพลีแซคคาไรด์ทำได้ง่าย การควบคุม

ค่าพีเอช โดยการสเปรย์กรด หรือ เบส เข้าระบบ เป็นวิธีปกติที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวแต่ไม่เหมาะกับการหมักแบบแห้ง การควบคุม ค่าพีเอช มีความสำคัญต่อการป้องกันการปนเปื้อน โดยคุมค่าพีเอช ในวัสดุหมักแห้งให้อยู่ในช่วง 3.5-4.5 จะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการได้ โดยอาจจะเติม 0.1N-0.3N HCl ร่วมกับการควบคุมความชื้น และ การใช้เชื้อเริ่มต้นที่ปริมาณสปอร์มากพอ

#### 4.10 ความเข้มข้นวัสดุหมัก

ความเข้มข้นของวัสดุหมักในกระบวนการหมัก พิจารณาในเทอมของพื้นที่ว่างทั้งหมดในถังที่สามารถมีวัสดุหมัก เฟสของแข็ง ของเหลว และก๊าซทั้งหมด สำหรับจุลินทรีย์ การบรรจุวัสดุมากเกินไปส่งผลให้พื้นที่ผิวอนุภาคสัมผัสกับอากาศลดลง ทำให้สารผลิตภัณฑ์ลดลง

### ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับวัสดุหมัก

#### 1. รำข้าวเจ้า (Rice bran)

รำข้าวเจ้าเป็นผลพลอยได้จากการขัดสีข้าว มีทั้งรำหยาบ (hull) และรำละเอียด (bran) ซึ่งได้จากการขัดสีข้าวกล้องให้ได้ข้าวขาว (จุฬารัตน์, 2547) รำข้าวเจ้าประกอบด้วยเปลือกหุ้มผล เปลือกหุ้มเมล็ด ชั้นเยื่อโปร่งใส ชั้นแอลิวโรนหรือเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด (aleurone layer) คัพภะ (gem) และส่วนของชั้นถัดจากชั้นแอลิวโรน (subaleurone layer) ของเนื้อเมล็ด และอาจมีส่วนของเกล็ดและปลายข้าวปะปนมา ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบ เหล่านี้ขึ้นอยู่กับวิธีการและระดับการขัดสีข้าว รำข้าวเจ้าโดยทั่วไปมีความชื้นประมาณ 7-14 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับความชื้นก่อนการขัดสี (Amissah *et al.*, 2003) โดยมีองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวดังตารางที่ 3 รำข้าวเป็นส่วนเหลือทิ้งทั้งหมดมีประมาณ 5-9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณข้าวเปลือกที่ผ่านการขัดสี รำข้าวสามารถนำมาทำเป็นน้ำมันรำข้าวมีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวถึง 77 เปอร์เซ็นต์ โดยพวกนี้เป็นกรดไขมันจำเป็นถึง 31.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินอี วิตามินบี สารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นน้ำมันรำข้าวจึงเป็นน้ำมันคุณภาพดีและเป็นน้ำมันเพื่อสุขภาพ องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวเจ้า มีการรายงานอย่างกว้างขวางจากกระบวนการขัดสีที่แตกต่างกัน มีดังต่อไปนี้

1.1 โปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน โปรตีนที่พบในรำข้าวมีถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวทั้งหมด โดยปริมาณไลซีนในโปรตีนจากรำข้าวสูงกว่าข้าวขาวที่ผ่านการขัดสีแล้ว และพบกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงกว่าข้าวขาว นอกจากนี้มีปริมาณอัลบูมินจากโปรตีนสูงกว่าองค์ประกอบอื่นๆ จึงนิยมใช้รำข้าวเป็นส่วนประกอบสำคัญในการเพิ่มโปรตีนในอาหารของคนและสัตว์

1.2 คาร์โบไฮเดรตและลิกนิน คาร์โบไฮเดรตที่พบมักเป็นพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส หรือเพนโตซาน มีปริมาณผสมอยู่เล็กน้อยอันเนื่องมาจากการกระบวนการขัดสีข้าว เซลลูโลสและเพนโตซานที่พบในรำข้าวมีปริมาณใกล้เคียงกัน เพนโตซานประกอบไปด้วยน้ำตาลอะราบินอสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบกาแลคโตสในปริมาณไม่มาก นอกจากนี้ยังพบลิกนินซึ่งเป็นเซลลูโลสตรงผนังเซลล์ของข้าว

1.3 ไขมัน พบชนิดและปริมาณไขมันในรำข้าวมากกว่าเมล็ดข้าว ไขมันที่พบในรำข้าว คือ กลีเซอรอล สเตอรอล และสฟิงกอล คิดเป็น 18-22 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดในรำข้าว ดังนั้นในอนาคตสามารถนำรำข้าวมาใช้ทำเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันเพื่อการบริโภคได้

1.4 วิตามิน วิตามินที่พบในปริมาณมาก คือ วิตามินบีและอี สำหรับวิตามินเอ วิตามินซี หรือวิตามินดี พบในปริมาณน้อย วิตามินช่วยให้ร่างกายเผาผลาญอาหารได้ดี ช่วยสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อ ช่วยในขบวนการเผาผลาญไขมันและคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้พลังงานแก่ร่างกายเพราะร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินได้เอง ต้องรับประทานเข้าไปเท่านั้น

1.5 เกลือแร่ แร่ธาตุที่พบในรำข้าวพบฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบมากที่สุด รองมาคือ โพแทสเซียม แมกนีเซียม และซิลิกา ตามลำดับ ส่วนโซเดียม แคลเซียม และเหล็ก พบในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังพบซัลเฟอร์ แบเรียม โบรอน ตะกั่ว และสังกะสี (ทรงศักดิ์, 2543)

1.6 องค์ประกอบอื่นๆ องค์ประกอบอื่นๆ ที่พบ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบในปริมาณน้อย เป็นสารประกอบจำพวกวิตามิน แร่ธาตุ เฟวานอย หรือเอนไซม์ที่ช่วยปกป้องร่างกายจากอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระทำให้ร่างกายชะลอความแก่อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และยังสามารถกำจัดพวกไวรัสและแบคทีเรียได้ด้วย ซึ่งในรำข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 100 ตัว นอกจากนี้ยังพบสารให้กลิ่นซึ่งมีองค์ประกอบเป็นแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เมทานอล

เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล เพนทานอล และเฮกซานอล และมีสารพวกคาร์บอนิล เช่น อะซีตัลดีไฮด์ อะซิโตน โพรพานาล บิวทานาล เพนทานาล และเฮกซานาล ซึ่งสารพวกคาร์บอนิล สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้เกิดการสะสมของแอลกอฮอล์ในลำไส้เมื่อเก็บไว้นาน

### การใช้ประโยชน์จากรำข้าวเจ้า

รำข้าวเจ้าส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์ในการสกัดน้ำมันเนื่องจากมีน้ำมันเป็นองค์ประกอบมาก นอกจากนั้นยังใช้ในการผลิตอาหารสัตว์เนื่องจากมีโปรตีน น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรตสูง จึงเป็นแหล่งอาหารสัตว์ที่ดี การใช้ประโยชน์จากรำข้าวในการผลิตอาหารของคนยังมีอยู่อย่างจำกัด แม้ว่ายังมีคุณค่าทางอาหารสูง เนื่องจากการเสื่อมเสียของน้ำมันในรำข้าวอย่างรวดเร็วและการปนเปื้อนของแกลบ โดยในการขัดสีข้าวกล้องให้เป็นข้าวขาวนั้น ทำให้เอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายน้ำมันในรำข้าวเข้าไปเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระได้อย่างรวดเร็ว จึงนิยมนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์แทน นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาคุณภาพของรำข้าวและน้ำมันที่สกัดได้โดยการทำให้คงตัว (stabilization) ซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่น การใช้ความร้อนหรือสารเคมีในการยับยั้งเอนไซม์ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

### ตารางที่ 3 องค์ประกอบหลักของรำข้าวเจ้า

| องค์ประกอบ   | เปอร์เซ็นต์ |
|--------------|-------------|
| โปรตีน       | 13.35-14.93 |
| ไขมัน        | 19.70-20.85 |
| เถ้า         | 6.60-8.64   |
| คาร์โบไฮเดรต | 34-53.40    |
| เส้นใย       | 21.00-23.45 |

ที่มา: Gerhardt and Gallo (1998)

## 2. รำข้าวสาลี (Wheat bran)

รำข้าวสาลีเป็นส่วนประกอบของเปลือกเมล็ดข้าวสาลี เกิดจากกระบวนการบดเมล็ดข้าวสาลีให้เป็นแป้งและจัดเป็นผลพลอยได้ของการผลิตแป้งสาลี ซึ่งจะได้รำข้าวสาลีเป็นองค์ประกอบประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ในการผลิตแป้งสาลี รำข้าวสาลีประกอบด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดข้าว (pericarp) ทั้งชั้นนอกและชั้นใน ชั้นรงควัตถุ (pigment) เยื่อโปร่งใส (hyaline layer) และเนื้อเมล็ด (endosperm) ของข้าวสาลี

มีผู้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของรำข้าวสาลี ดังตารางที่ 4 ซึ่งแสดงปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโน โดยมีโปรตีนจำนวน 15.55 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดนี้มีกรดอะมิโนพวกกรดกลูตามิกเป็นองค์ประกอบมากที่สุดประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ มีอาร์จินีน แอสพาร์ติก ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นก็มีกรดที่มีปริมาณน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แต่มากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ ฮิสทีดิน ไอโซโอรีน เมทไธโอนีน และไทโรซีน (อรอนงค์, 2540)

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์รงควัตถุของรำข้าวสาลี ซึ่งเป็นพวกแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ฟลาโวน (flavones) และสารที่สลายตัวมาจากคลอโรฟิลล์ ส่วนพวกเอนไซม์ที่พบมักเป็นพวกย่อยโปรตีน เช่น โปรติเอส ไดเพปทิเดส และเอนไซม์ที่ย่อยไขมัน คือ ไลเปส

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี

| องค์ประกอบ   | เปอร์เซ็นต์ |
|--------------|-------------|
| โปรตีน       | 15.55       |
| ไขมัน        | 4.25        |
| เถ้า         | 9.5         |
| คาร์โบไฮเดรต | 64.51       |
| เส้นใย       | 42.80       |

ที่มา: อรอนงค์ (2540)

## การใช้ประโยชน์จากรำข้าวสาลี

สำหรับรำข้าวสาลีที่ได้จากกระบวนการโม่แป้งสาลีหรือได้จากการแยกสกัดจากเมล็ดนั้น ส่วนใหญ่ขายเป็นอาหารสัตว์ โดยผู้ผลิตอาหารสัตว์จะนำรำข้าวสาลีไปผสมกับวัสดุหมักอย่างอื่น อีกหลายชนิดตามสูตรเพื่อให้เหมาะสมต่อสัตว์แต่ละชนิด เช่น อาหารไก่ อาหารสุกร เป็นต้น ในปัจจุบันพบว่าประชาชนชาวยุโรปและอเมริกามีความตื่นตัวและสนใจในการเสริมคุณค่าอาหารที่บริโภคเป็นอาหารหลักและการเพิ่มเส้นใยในอาหาร จึงเห็นว่าผลพลอยได้จากการโม่แป้งนี้ถ้านำกลับไปเสริมในอาหารของคน ก็จะให้คุณค่าเพิ่มมากกว่าการบริโภคแต่เฉพาะส่วนแบ่งขาว เท่านั้น กล่าวคือ รำข้าวจะช่วยเพิ่มเส้นใยแต่ก่อนที่จะนำรำข้าวไปใช้เสริมคุณค่าทางอาหารได้นั้น ควรให้ความร้อนด้วยการอบในเตาหรืออบด้วยไอน้ำก่อนนำไปเสริมให้อาหาร เช่น ขนมอบเสริมเส้นใยอาหารสำเร็จรูปเสริมรำข้าว คุณก็เสริมรำข้าว เป็นต้น สำหรับรำข้าวที่ได้จาก กระบวนการสกัดแยกส่วนสตาร์ชและกลูเตนออกจากเมล็ดด้วยการใช้สารละลายเบสนั้น ทำให้มีลักษณะที่ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นอาหารของคน จึงนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ทั้งหมด

## ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์

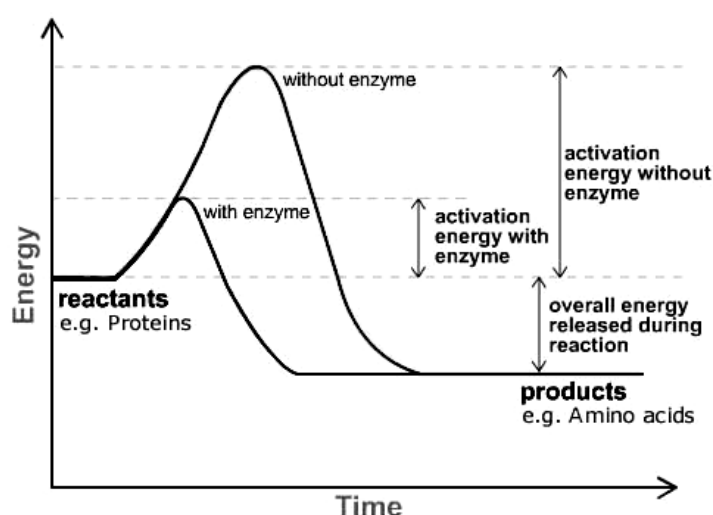
เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ หรือตัวเร่งอินทรีย์เพราะสังเคราะห์ขึ้นมาภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเอนไซม์เกิดจากสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ด้วยวิธีทางเคมี เอนไซม์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในขบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เพราะปฏิกิริยาในระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นเองได้ยากถ้าขาดเอนไซม์ เพราะสิ่งมีชีวิตต้องสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ให้ทันต่อความต้องการของร่างกายไม่เช่นนั้นก็ไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ ดังนั้นเอนไซม์จึงต้องมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่สูงมาก (Shuler and Kargi, 2002 )

เอนไซม์ปริมาณเพียงเล็กน้อยสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เป็นล้านเท่าหรือมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสด้วยเอนไซม์ invertase ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมากและไม่ต้องใช้ความร้อน แต่ถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี คือ กรดไฮโดรคลอริก ปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่ามากและต้องให้ความร้อนด้วยจึงเกิดผลิตภัณฑ์ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนระดับสมดุลของปฏิกิริยาได้ (chemical equilibrium) คือ ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นก็จริง แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จะคงที่ไม่ว่าปฏิกิริยานั้นจะมี



เอนไซม์หรือไม่มีก็ตาม นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ invertase ที่ได้กล่าวถึงไปแล้วมีความจำเพาะต่อน้ำตาลซูโครสเท่านั้น ถ้ามีไดแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น มอลโตส หรือแลคโตสพามา เอนไซม์จะไม่ไฮโดรไลซ์น้ำตาลสองตัวนี้ แต่กรดไฮโดรคลอริกจะสลายพันธะไกลโคซิดิกทุกพันธะ และความจำเพาะของปฏิกิริยาจะมีต่อตัวซับสเตรทหรือสารตั้งต้นด้วย เช่น เอนไซม์อาจทำปฏิกิริยากับซับสเตรทเพียงชนิดเดียวหรือสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงสัมพันธ์กันได้

เอนไซม์ทุกชนิดมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลล์ และเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อน (globular protein) ดังนั้นเอนไซม์จึงสามารถโดนทำลายได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆคล้ายโปรตีน ในเซลล์ปกติจะมีเอนไซม์ชนิดต่างๆประมาณ 3,000 ชนิด การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นทำได้โดยลดพลังงานกระตุ้น (activated energy) ของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งการที่สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ได้ต้องมีการผ่านสภาวะทรานสิชัน (transition state) ที่จุดนี้พลังงานจะสูงกว่าสารตั้งต้น ดังนั้นปฏิกิริยาต้องได้รับพลังงานที่มากกว่าความแตกต่างของพลังงานระหว่างสภาวะทรานสิชันและสารตั้งต้นหรือที่เรียกว่า พลังงานกระตุ้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อเอนไซม์ทำให้พลังงานกระตุ้นลดลง สารตั้งต้นจึงสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ง่ายขึ้น ปฏิกิริยาจึงเกิดเร็วขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น

ที่มา: Barron (2006)

ในอุตสาหกรรมต่างๆหลายประเภทมีการใช้เอนไซม์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือปฏิกิริยาอื่นที่ไม่สามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้ เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีกว่าของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยามากกว่าและไม่เป็นอันตรายเพราะเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันที่สูง การทำงานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้องอาศัยความละเอียดอย่างมากเพราะตัวแปรที่เกี่ยวข้องมักเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเอนไซม์และโครงสร้างของเอนไซม์เองซึ่งมีโปรตีนเป็นสารองค์ประกอบเอนไซม์มีมากมายหลายพันชนิด เอนไซม์ชนิดเดียวกันอาจผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ประเภทแล้วแต่กรรมวิธีในการผลิต

## 1. การแบ่งประเภทของเอนไซม์

คณะกรรมการเอนไซม์นานาชาติ (The International Enzyme Commission, EC) ได้แบ่งเอนไซม์เป็น 6 ประเภท ดังนี้ (เรื่องลักษณะ, 2545)

1.1 เอนไซม์ที่โมเลกุลสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ สภาพที่เป็นตัวออกซิไดซ์หรือตัวรีดิวส์ (oxidoreductases) ซึ่งใช้ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันระหว่างซับสเตรท 2 ชนิด ในกระบวนการต่างๆ อาทิ การหายใจ การหมัก เป็นต้น ตัวซับสเตรทที่อยู่ในสภาพรีดิวส์จะถูกเอนไซม์ออกซิไดซ์ให้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น แล้วตัวเอนไซม์ก็จะกลายสภาพเป็นตัวรีดิวส์ โดยการกลับเข้าสู่สภาพเป็นตัวออกซิไดซ์ได้อีกนั้น ต้องมีตัวรับอิเล็กตรอนมารับอิเล็กตรอนไป

1.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายหมู่ต่างๆ (transferases) จากตำแหน่งหนึ่งไปยังอีกตำแหน่งหนึ่ง

1.3 เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลาย (hydrolases) ใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ (hydrolysis reaction) โดยดูว่าพันธะที่ถูกสลายนั้นเป็นพันธะชนิดใด เช่น ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ เรียกเอนไซม์นั้นว่า เอสเทอเรส (esterase) ถ้าย่อยสลายพันธะเปปไทด์ เรียกว่า เอนไซม์เปปติเดส หรือถ้าย่อยสลายพันธะฟอสเฟต เรียกว่า เอนไซม์ฟอสฟาเทส เป็นต้น

1.4 เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเติมหมู่สาร (lyases) ทำหน้าที่เติมหมู่สารเข้าไปที่พันธะคู่ของซัสเตรทหรือใช้ในปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาข้างต้นนั้น เป็นการเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเข้า (addition) และปฏิกิริยาการขจัดออก (reduction)

1.5 เอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ของสาร (isomerases)

1.6 เอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมโมเลกุลบางชนิดเข้าด้วยกัน (ligases) เช่น โมเลกุลของกรดอะมิโนหรือกรดนิวคลีอิก เป็นต้น โดยการเชื่อมนี้ต้องมีพลังงานจากภายนอกมาช่วยด้วยหรือเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอน คาร์บอน-ซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งได้มาจากการตัดหมู่ฟอสเฟตหรือไพโรฟอสเฟตออกจาก ATP

## 2. ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ ความสามารถในการเลือกเกิดปฏิกิริยาและเลือกทำการเร่งปฏิกิริยากับซัสเตรทต่างๆ โดยความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับ (สุนันทา, 2547)

2.1 โครงสร้างของโมเลกุลซัสเตรท (สารตั้งต้น) โดยโครงสร้างของซัสเตรทประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

2.1.1 ส่วนที่จะไปจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ (binding group)

2.1.2 พันธะที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (susceptible bond) จากการกระทำของเอนไซม์

2.2 โครงสร้างของเอนไซม์ (conformation) เอนไซม์แต่ละชนิดมีโครงสร้างเฉพาะตัว และเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเหมือนกันทุกครั้งก่อนเข้าไปทำการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซัสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ต้องไม่ใช่สายโพรตีนที่ยาวเหยียดเป็นเส้นตรงแต่ต้องมีการคองที่จำเพาะ (specific folding) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมในการรวมตัวกับซัสเตรท ซึ่งทุกครั้งที่มีการเร่งปฏิกิริยาต้องเกิดการคองให้มีโครงสร้างแบบเดิมนี้ทุกครั้ง จึงสามารถทำการเร่งปฏิกิริยาได้

2.3 ลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) เป็นตำแหน่งบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นช่องเล็กๆ ให้โมเลกุลซับสเตรทเข้าไปจับ ซึ่งจะเกิดแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อนระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไฮโดรเจน เป็นต้น บริเวณเร่งเป็นบริเวณที่มีการรวมกันของหมู่ R ของกรดอะมิโนซึ่งอยู่ในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ ทำให้หมู่ R มาอยู่ใกล้กัน เอนไซม์จึงมีการคงอย่างจำเพาะเพื่อมีโครงสร้างพร้อมเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งซับสเตรทจะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่บริเวณนี้

### 3. การหากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme assay)

การหากิจกรรมของเอนไซม์เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ เพราะเอนไซม์ปริมาณหนึ่งๆ ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้และไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ การหากิจกรรมของเอนไซม์มักทำการหาหลังขั้นตอนการแยกและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ การหาค่ากิจกรรมนั้นใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทและโคแฟกเตอร์ค่อนข้างสูง เพื่อให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว โดยวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพราะมีความถูกต้องแม่นยำกว่าการติดตามซับสเตรทที่หายไป และจะวัดสะดวกยิ่งขึ้นถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารมีสีหรือสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นยูวีได้ โดยใช้เครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ควรบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสารตลอดจนสถานะที่ใช้ในการทดลองไว้ให้ชัดเจน คือ บอกความเข้มข้นของซับสเตรท เอนไซม์ โคแฟกเตอร์ อุณหภูมิ ค่าพีเอช หรือค่าต่างๆ ที่จำเป็นให้ละเอียด และมีค่าที่ต้องรู้ नियาม ดังนี้

เอนไซม์ 1 ยูนิต (one international unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด (สุนันทา, 2544)

specific activity มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน หรือ ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โดยค่า specific activity ที่สูงขึ้นหมายความว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

yield (percent) เป็นการคิดเทียบความบริสุทธิ์ของขั้นตอนหนึ่งๆกับขั้นตอนแรก คิดจาก

$$\frac{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนนั้น}}{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนแรก}} \times 100$$

เอนไซม์ยังมีความบริสุทธิ์มากเท่าใด นั่นคือ yield ที่ไดยังลดน้อยลง เพราะต้องผ่านกระบวนการอื่นๆในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

purification factor เป็นตัวเลขที่บอกว่า เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการหนึ่งๆมีความบริสุทธิ์เป็นกี่เท่าของเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนแรก โดยคิดจาก

$$\frac{\text{specific activity ของขั้นตอนนั้น}}{\text{specific activity ของขั้นตอนแรก}} \times 100$$

โดยถือว่า purification factor ของขั้นตอนแรกเท่ากับ 1 เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนมากกว่าจะมีค่า purification factor มากตามด้วย คือ มีความบริสุทธิ์มากกว่า

#### 4. การใช้งานเอนไซม์ในอุตสาหกรรม

ในอุตสาหกรรมหลายประเภทมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง โปรตีน ฯลฯ ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กลง โดยคุณสมบัติที่ดีของเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่เลือกทำปฏิกิริยาเฉพาะ เช่น การย่อยสลายเฉพาะที่ไม่เหมือนกับการย่อยสลายด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น กรดหรือด่างซึ่งจะย่อยสลายทุกอย่างหมด นอกจากนี้การหยุดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็ทำได้ง่ายโดยการเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพด้วยความร้อน และเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่ก่อพิษหรืออันตรายต่อผู้ผลิตหรือผู้ใช้ นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้ด้วย เช่น สามารถด้านการเกิดมะเร็ง ส่งเสริมระบบไหลเวียนของโลหิต กำจัดโลหะหนักที่ร่างกายได้รับและลดพิษของมัน ควบคุมการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการทำลายเซลล์เชื้อโรค ใช้ตรวจวัดปริมาณสาร ใช้วินิจฉัยโรค ใช้เป็นตัวบ่งบอกทางพันธุกรรม เป็นต้น (ประสงค์, 2526)

## เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ของสารจำพวกโปรตีน จึงมักถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยย่อยให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ หน่ยย่อยของโปรตีนที่เรียกว่ากรดอะมิโน เอนไซม์หลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสและสามารถแบ่งออกเป็นประเภทย่อยๆได้อีก โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งใช้ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในชั้นสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนต่างๆ เอนไซม์ต่างชนิดกันจะย่อยพันธะ เปปไทด์ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน

เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เอนไซม์ที่ผลิตจากพืชเช่น papain, chymopapain, bromelain หรือสามารถสกัดโปรติเอสได้จากสัตว์จำพวกเลี้ยงลูกด้วยนมเช่น รกสัตว์ (animal pancreas) เอนไซม์ที่ผลิตได้จากสัตว์ส่วนมากในตอนแรกจะอยู่ในรูปที่ไม่เร่งปฏิกิริยา (proenzyme) จนกว่าอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์จะเริ่มทำงาน เช่น ได้รับความเป็นกรดจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร คือ ความเป็นกรดต่ำ จะเริ่มต่ำลง ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูป active ซึ่งสามารถทำงานได้ดีใน ความเป็นกรดต่ำๆ เช่น papain chymopapain trypsin เป็นต้น ส่วนเอนไซม์โปรติเอสซึ่งได้จากจุลินทรีย์นั้น มีการค้นพบที่หลากหลายและนับเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทั่วโลกประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ที่มีการซื้อขายกันในตลาดโลก (Rao *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตามเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้พวกจุลินทรีย์ต่างๆ จะมีแค่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้เพราะให้ผลได้ (yield) จากการผลิตที่สูงและเอนไซม์ที่ผลิตได้จะออกมาอยู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) ทำให้สามารถสกัดแยกได้ง่ายกว่าเอนไซม์ที่ผลิตแล้วอยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme) ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตได้เช่น แบคทีเรีย (*B. lichenniformis*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. proteolyticus*) รา (*A. candidus*, *A. flavor*, *A. oryzae*, *A. niger*) หรือพวกยีสต์บางสายพันธุ์ เป็นต้น มีรายงานว่าเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆหรือเรียกว่า GRAS (generally regarded as safe) มีหลายสายพันธุ์ อาทิเช่น *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. (Sandhya *et al.*, 2005)

ส่วนการเลือกใช้จุลินทรีย์นั้นจะขึ้นอยู่กับ วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมัก ความชื้นของวัตถุดิบ และวิธีการผลิต เช่น จากการศึกษาของ Matsumoto *et al.* (2004) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase ด้วยรา *Verticillium lecanii* โดยวิธีการหมักแบบแห้งเปรียบเทียบกับ การหมักแบบเปียกพบว่า การหมักแบบแห้งให้ผลผลิตมากกว่าการหมักแบบเปียกถึง 3.5 เท่า

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดยรา *A. oryzae* สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ชอบความเป็นกรด เป็นกลาง และ เป็นด่าง (acid protease, neutral protease และ alkaline protease) (Sandhya *et al.*, 2005) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำงานได้ในค่าพีเอชที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์

| Protease           | Proenzyme           | pH Range |
|--------------------|---------------------|----------|
| Pepsin             | Pepsinogen          | 1.5-4.0  |
| Chymosin (gastric) | Prochymosin         | 5-6      |
| Trypsin            | Trypsinogen         | 6.5-9    |
| Chymotrypsin       | Chymotrypsinogen    | 7-8.5    |
| Carboxypeptidases  | Procarboxypeptidase | 6-8.5    |
| Aminopeptidases    | -                   | 7.5-9.0  |

ที่มา: สุนทร (2549)

การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส (Anwar and Saleemuddin, 1998)

#### 1. การผลิตเนยแข็ง (cheese production)

ใช้เอนไซม์ rennet ใสลงไปในน้ำนมเพื่อทำให้ casein ตกตะกอนจับตัวเป็นก้อน ความจริงเอนไซม์ rennet เป็นเอนไซม์ที่ได้จากกระเพาะที่สี่ของลูกวัว แต่มักมีไม่เพียงพอในการผลิตเนย

แข็ง จึงมีการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากราที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ rennet จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ คือ *Mucor persillus*

## 2. อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ (leather industry)

เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรม ฟอกหนังสัตว์สมัยก่อนใช้เอนไซม์ pancreatin แต่ในปัจจุบันใช้เอนไซม์ alkaline protease ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

## 3. ใช้ในกระบวนการหมักอาหาร

ในการเตรียมโคจิสำหรับการทำ สาเก มิโซะ และชีอิ้ว มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจากราเพื่อช่วยในกระบวนการหมัก นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสใช้ในการทำขนมปังเพื่อช่วยให้มีคุณภาพดีขึ้น ถ้าใส่ลงใน wheat gluten จะทำให้ขนมหวาน หรือทำให้ขนมปังกรอบเก็บมีรสชาติดีขึ้น ส่วนในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์มักใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อป้องกันการขุ่นของเบียร์

## 4. ใช้ในการทำให้เนื้อนุ่ม

ใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อให้เนื้อมีความอ่อนนุ่ม เช่น เอนไซม์ bromelain และเอนไซม์ papain จากราและแบคทีเรีย

## 5. ใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ (food industry)

ใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรมปลาป่นเพื่อผสมเลี้ยงสัตว์และผลิต fish soluble เพื่อช่วยในการย่อยและการดูดซึมอาหารของสัตว์ดีขึ้น ส่วนธัญพืชที่สัตว์กินนั้นจะผสมด้วยเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูโลส

## 6. ใช้ในกระบวนการอื่นๆ

เอนไซม์ alkaline protease จากแบคทีเรียใช้ผสมในผงซักฟอก ใช้ในกิจการล้างฟิล์ม มีเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดใช้เดิมเป็นตัวย่อยอาหาร



## ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรา

รา (fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงชั้นสูงที่มีการเติบโตแบบเส้นใย ที่เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เป็นจุลินทรีย์ที่สังเกตได้ง่ายมีสีแตกต่างกัน ราวางชนิดทำให้อาหารเสีย และบางชนิดมีประโยชน์ในการแปรรูปอาหาร เช่น ใช้การผลิตเนยแข็ง กรดอะซิติก และ เอนไซม์อะไมเลส จาก ลักษณะไฮฟาทำให้แบ่งราออกเป็น 2 จำพวกคือ เซพเทต (septate) หมายถึง ราชนิดที่มีผนังกันเซลล์ มีลักษณะเป็นเซลล์ต่อกันในสายไฮฟา และ อะเซพเทต (aseptate) หมายถึง ราชนิดที่ไม่มีผนังกันเซลล์สายไฮฟามีลักษณะกระจัดกระจาย

### 1. การขยายพันธุ์ของรา

1.1 สปอร์รา (asexual) มีลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น คอนนเดีย (conidia) เป็นกลุ่มของสปอร์ที่อยู่ปลายไฮฟา ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม และแองจิสปอร์ (angispore) เป็นสปอร์ที่อยู่ภายในกระเปาะ (sporangium)

1.2 สปอร์เพศ (sexual spores) โดยทั่วไปต้องการความชื้นน้อยกว่าแบคทีเรียและยีสต์ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ราส่วนใหญ่ทนอุณหภูมิสูงไม่ได้ นอกจากนั้นยังต้องการออกซิเจน และต้องการพีเอชต่ำ ใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน

### 2. การดำรงชีวิตของรา

การดำรงชีพของราจะอาศัยอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หรือซากพืช สัตว์ ราต่างชนิดกันมีความต้องการสารอาหารที่ไม่เหมือนกัน (พิไลพรณ, 2525) ราวางชนิดสามารถใช้สารอาหารได้หลายประเภท แต่ราวางชนิดมีความจำเพาะต่อสารอาหาร คือ สามารถเจริญในสารอาหารไม่กี่ชนิด ถ้าเปลี่ยนสารอาหารอาจทำให้ไม่เจริญได้ สารอาหารที่ราต้องการในการเจริญมีหลายประเภท ส่วนมากราเจริญได้ดีในแหล่งอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง หรือมีแหล่งคาร์บอนมาก (พิบูลย์, 2541) ส่วนแหล่งอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน ซึ่งราสามารถนำแหล่งไนโตรเจนมาใช้ในการสร้างโปรตีน นอกจากนี้รายังต้องการแหล่งวิตามินมาใช้ในการเจริญ และสืบพันธุ์ การใช้สารอาหารของ

เราทำได้โดยเราจะปล่อยน้ำย่อยหรือพวกเอนไซม์ออกมาย่อยสารอาหารแล้วทำการดูดซึมมาใช้ ซึ่งสารอาหารจะสะสมอยู่ในรูปไกลโคเจน หรือไขมัน

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของราต้องมีความเหมาะสม ราจะเจริญในที่ที่มีความชื้นพอสมควร น้ำที่อยู่ในรูปความชื้นมีหน้าที่ในการรักษาความชื้นภายในเซลล์ให้คงที่ ช่วยรักษาอัตราการแตกกิ่งและการเพิ่มเส้นใยให้คงที่ของรา (Gervais and Molin, 2003) ราส่วนใหญ่นิยมใช้ในระบบการหมักแบบแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 6 เนื่องจากมี physiological enzymological และ biochemical properties ที่เหมาะสมโดยที่ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีน้ำน้อย (low water activity) และมีโครงสร้างเส้นใยที่สามารถแทรกเข้าไปดูดสารอาหารในวัสดุหมักได้ (Raimbault, 1998)

ปกติราสามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0 ถึง 70 องศาเซลเซียส ราจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้การเจริญของราลดลง และที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ราเกือบทุกชนิดตายหมด แต่สปอร์ของรายังอยู่ ถ้าต้องการกำจัดสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีพีเอชประมาณ 5-6 ราส่วนใหญ่ใช้ออกซิเจนในการเจริญของรา

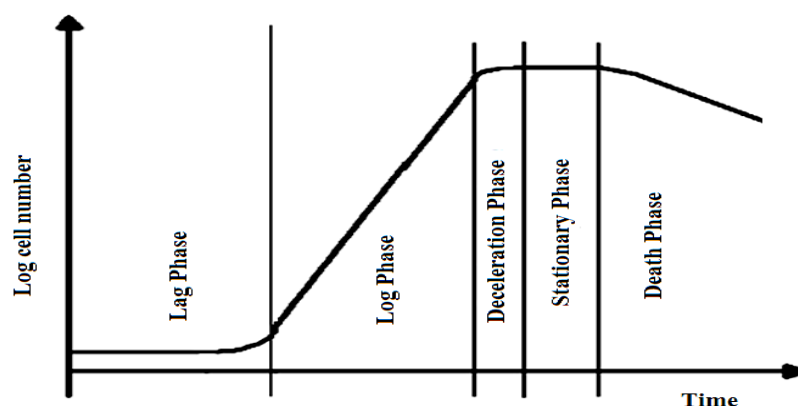
ตารางที่ 6 การใช้ราในระบบการหมักแบบแห้ง

| Fungi                                    | Solid-State Fermentation Process              |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>Aspergillus</i> sp.                   | Composting, Industrial, Food                  |
| <i>Mucor</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp.    | Composting, Food, enzymes, organic acids      |
| <i>Trichoderma</i> sp.                   | Composting Biological control, Bioinsecticide |
| <i>Amylomyces rouxii</i>                 | Tape cassava, rice                            |
| <i>Aspergillus oryzae</i>                | Koji, Food, citric acid                       |
| <i>Rhizopus oligosporus</i>              | Tempeh, soybean, amylase, lipase              |
| <i>Aspergillus niger</i>                 | Feed, Proteins, Amylase, citric acid          |
| <i>Penicillium, notatum, roquefortii</i> | Penicillin, Cheese                            |

ที่มา : Raimbault (1998)

### 3. วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเจริญของจุลินทรีย์ หมายถึง ปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์กับสิ่งแวดล้อมอัน ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช และความเข้มข้นของสารอาหาร เป็นต้น ในอีกแง่หนึ่งการเจริญของจุลินทรีย์อาจหมายถึง การเติบโตหรือการให้สารอาหารแก่จุลินทรีย์แต่ละเซลล์ อันเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อน และได้มาจากผลรวมของเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยทั่วไปเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญจะมีการเปลี่ยนแปลงของแต่ละเซลล์โดยเซลล์จะเพิ่มขนาดขึ้นก่อน จากนั้นก็จะแบ่งตัวออกเป็นสองเซลล์ (binary division) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์โดยปกติจะเป็นรูป sigmoid curve เช่นเดียวกับจุลินทรีย์อื่นๆ อัตราการเจริญสูงสุดของจุลินทรีย์จะอยู่ที่จุดเมื่อเซลล์มีขนาดประมาณสามในสี่ของเซลล์ที่โตเต็มที่ (ในช่วงที่มีการแบ่งเซลล์) และอัตราการเจริญต่ำสุดจะอยู่ที่จุดก่อนและหลังการแบ่งเซลล์เล็กน้อย การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์มักแบ่งวงจรการเจริญออกเป็นระยะต่างๆ โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญ (growth rate) โดยปกติแล้วแบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ lag phase log phase หรือ exponential phase stationary phase deceleration phase และ death phase (Shuler and Kargi, 2002) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ที่มา: Shuler and Kargi (2002)

3.1 ระยะปรับตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลาที่เซลล์ของจุลินทรีย์ต้องการปรับตัวให้เข้ากับสถานะแวดล้อม เมื่อมีการถ่ายจุลินทรีย์ไปยังแหล่งอาหารใหม่ ในช่วงนี้อัตราการขยายขนาด สูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นขนาดของเซลล์ในช่วงนี้จึงมีขนาดใหญ่กว่าของเซลล์ในช่วงอื่นๆ ในการหมักโดยทั่วไปมักต้องการระยะปรับตัวที่สั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ความ

สมบูรณ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของกล้าเชื้อ เป็นต้น ในช่วงท้ายของระยะปรับตัวเซลล์จะมีการแบ่งตัวประมาณ 4-5 ครั้ง ก่อนเข้าสู่ช่วงระยะการเติบโตต่อไป เรียกระยะนี้ว่าระยะเร่งตัว (acceleration phase)

3.2 ระยะเติบโตทวีคูณ (logarithmic or exponential phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ในสภาพสมดุล (balance growth) เรียกระยะนี้ว่าระยะคงที่ (steady state period) แต่ความเป็นจริงสภาวะนี้เป็นเพียงทฤษฎีเท่านั้นเพราะในทางปฏิบัติสภาวะเช่นนี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากส่วนประกอบและขนาดของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในระหว่างการหมัก สภาวะเช่นนี้จึงเป็นสมมติฐานที่เกิดขึ้นและสามารถรักษาให้คงที่ได้ในระยะเติบโตทวีคูณเท่านั้น

3.3 ระยะถดถอย (deceleration or retardation phase) ระยะนี้สารอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆหมดลงหรือสภาวะแวดล้อมรอบจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม มีการสะสมสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมมากขึ้น เกิดความไม่สมดุลของการเจริญเติบโต (unbalance growth) ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงต่ำลง การเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรือเกิดขึ้นอย่างช้าๆก็ได้ ซึ่งช่วงนี้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะเริ่มลดลงโดยที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

3.4 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงที่ต่อจากระยะถดถอย จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ เพราะเป็นระยะที่อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับอัตราการตายของเซลล์ ซึ่งระยะนี้มีความสำคัญมากเนื่องจาก จุลินทรีย์จะสร้างสารที่เรียกว่า secondary metabolites อาทิเช่น ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ฮอร์โมนบางชนิด (hormones) เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ

3.5 ระยะตาย (death or declining phase) ในระยะนี้เซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จะต่ำกว่าอัตราการตายรวมทั้งมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้นด้วย

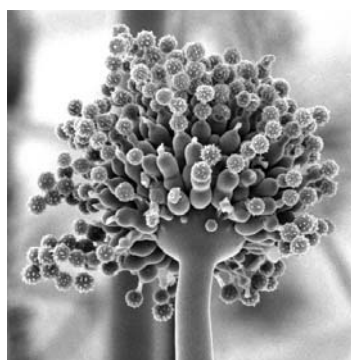
#### 4. รา *Aspergillus oryzae*

ราสายพันธุ์พวก *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักพบอยู่บนพวกผัก ผลไม้ และแหล่งอาหารอื่นๆ ซึ่งราพวกนี้เป็นตัวการที่ทำให้อาหารหลายชนิดเสีย มีประโยชน์ในทาง

อุตสาหกรรมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากรา *A. oryzae* ใช้ในอุตสาหกรรมหมักต่างๆ เช่น การผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว มิโซะ เป็นต้น รูปร่างสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae* มีไมซีเลียมสามารถแตกแขนงได้และมีผนังกัน เซลล์จะจมอยู่ในอาหาร มีโคนิดิโอเฟอร์ (conidiophore) หรือไฮฟาเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (fertile hypha) จะเกิดขึ้นจากเซลล์เท้า (foot cell) โคนิดิโอเฟอร์อาจมีหรือไม่มีผนังกันแบ่ง ที่ยอดของโคนิดิโอเฟอร์จะพองกลมขึ้นเป็นวิสิเคิล (visicle) รูปกระบอง (clavate) ซึ่งมีขนาดต่างกันออกไป และมีก้านเล็กๆ โผล่ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เรียกว่า สตรีกมาต้า (sterigmata) โคโคนิเดียจะเกิดขึ้นจากสตรีกมาต้าและอยู่ติดต่อกันเป็นลูกโซ่ มีลักษณะเป็นรูปกลมถึงรูปไข่ บางครั้งเป็นรูปรี มีผิวเรียบถึงขรุขระเล็กน้อย (Carlsen *et al.*, 1996) ดังแสดงใน ภาพที่ 4 รา *A. oryzae* มีเส้นใยมีสีขาวถึงสีครีม อัดแน่น โคนิเดียสีเหลืองเทาถึงสีน้ำตาล (วิลาวณย์, 2536)

รา *A. oryzae* ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางเพราะเป็นราที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำ โคจิ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลสได้สูง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไลเปส เปปติเดส และอินเวอร์เทส

อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของรา *A. oryzae* คือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Francis *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการการศึกษาของ Ramachandran *et al.* (2003) โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของรา *A. oryzae* ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้เนื้อมะพร้าวเป็นวัสดุหมัก เท่ากับ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าหากอุณหภูมิของวัสดุหมักเพิ่มเป็น 45 องศาเซลเซียส จะมีผลให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลงถึง 3 เท่า เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะไปทำอันตรายต่อเส้นใยและระบบเมตาบอลิซึมของรา ทำให้ราตายได้



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae*

ที่มา: Read (1991)

### ผลงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

มณีนรัตน์ (2542) ได้ทำการศึกษาทดลองหมักถั่วเหลืองแบบอาหารแข็งด้วยรา *A.oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด 2 ขนาด คือ ขนาดเล็ก 6.4 ลิตรและขนาดใหญ่ 42 ลิตร เพื่อผลิตโคจิโดยมีการระบายความร้อนที่เกิดขึ้นในถังแพคเบดด้วยอากาศขึ้นเพื่อควบคุมให้อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ถังหมักขนาดเล็กมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเป็น 110.21 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีความมากกว่าการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ซึ่งมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเป็น 96.63 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 36 เนื่องจากการหมักในถังขนาดใหญ่มีปัญหาเรื่องการระบายความร้อนที่ไม่ดีพอ อุณหภูมิจึงสูงซึ่งมีผลต่อการเจริญของรา

สุภาภรณ์ (2546) ได้สร้างแบบจำลองปฏิกิริยาของเอนไซม์เพื่อทำนายการเกิดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสในระหว่างกระบวนการหมักโคจิด้วยถั่วเหลืองและเชื้อรา *A.oryzae* ในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบด โดยทำการประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยวิธีผลต่างกำลังสองน้อยที่สุดและเทคนิคเชิงพันธุกรรม ผลจากการจำลองพบว่าค่ากิจกรรมอะไมเลสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเบดสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมโปรติเอสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเบดสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส สามารถสรุปพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักคือ ความเร็วของอากาศขึ้นที่เข้าถังหมักควรอยู่ในช่วง 0.1-0.3 เมตรต่อวินาที และอุณหภูมิของอากาศที่เข้าถังควรต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ดีที่สุด สามารถทำได้โดยปรับค่าความเร็วของอากาศขึ้นที่ผ่านเข้าถังเป็นสองช่วงคือ ที่ระยะเวลาหมัก 10 ชั่วโมงแรก ใช้ความเร็วลม 0.08 เมตรต่อวินาที จากนั้นเพิ่มอัตราเร็วเป็น 0.10 เมตรต่อวินาที จนครบระยะเวลาหมัก

พงษ์ประวัติ (2546) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติในการหมักโคจิในถังหมักแบบแพคเบดขนาดปริมาตร 40 ลิตรด้วยรา *A.oryzae* พบว่าการหมักในถังแพคเบดที่ใช้การควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเพิ่มจาก 3.054 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้งที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ เป็น 6.853 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ซึ่งค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงบ่งบอกถึงคุณภาพโคจิที่ดีขึ้น

นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดอาจใช้แบคทีเรียได้ โดยเพ็ญจิตร (2548) ได้พัฒนาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการหมักแบบแห้งด้วยแบคทีเรีย *B.subtilis* ในถังหมักแบบแพคเบดขนาด 40 ลิตร ความสูงเบดเป็น 10 เซนติเมตรพร้อมมีแผ่นพลาสติกกั้นในเบด ใช้

กากถั่วเหลืองผสมกับรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 1:1 ผสมกับอาหารเสริมเป็นวัสดุหมัก มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด 253 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 30

จรัญ (2548) ศึกษาการหมักกากหมักสำปะหลังโดยใช้ถังหมักแพคเบดแนวใหม่ โดยศึกษาผลกระทบของตัวแปรต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ที่มีผลต่อการเจริญของรา *R. oligosporus* บนกากมันสำปะหลังในถังหมักแบบแพคเบดสองชั้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร (ไม่รวมฝา) อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางต่อความสูงเท่ากับ 4:5 ปริมาตรถังเท่ากับ 50 ลิตร พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนบนกากมันสำปะหลังและปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้คือ ที่ความหนาวัสดุหมัก 10 เซนติเมตร ความเร็วอากาศเท่ากับ 0.08 เมตรต่อวินาที โดยมีการกั้นวัสดุหมักแบบขนานเพื่อกระจายอากาศให้ผ่านทั่วกันตลอดเบด จำนวน 8 ช่อง และใช้ถังเพิ่มความชื้น แบบให้อากาศไหลเข้าทางตอนล่างของถัง ผ่านละอองน้ำที่พ่นมาจากหัวกระจายน้ำ พบว่าทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับไม่ใช้ถังเพิ่มความชื้นจาก 9.74 และ 9.78 เปอร์เซ็นต์ เป็น 12.68 และ 13.23 เปอร์เซ็นต์ในเบดบนและล่างตามลำดับ อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในถังหมักชีวภาพแบบแพคเบด ซึ่งได้แก่ปัญหาการถ่ายเทความร้อน ซึ่งเกิดความร้อนสะสมในระบบอยู่

สุนทร (2549) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งโดยใช้เชื้อรา *A. oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด โดยการหมักด้วยโดยนำรำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาทำการหมักด้วยต้นเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 936.00 ยูนิตต่อกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 96 จึงเลือกวัสดุหมักสัดส่วนนี้มาทำการขยายการผลิตในถังหมักแบบแพคเบดต่อไป โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์และเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมักด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาทีจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมโปรติเอสกับการทดลองเมื่อเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์และเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมัก มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งใน

ชั่วโมงการหมักที่ 60 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบ แพลกเบด

ธีรวัช และ ภาสนันท์ (2549) การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักแบบแห้งในการหมักแบบถาดด้วยรา *A.oryzae* 5 เปอร์เซ็นต์วัสดูหมักแห้ง บนวัสดูหมักผสมระหว่างรำข้าวเจ้าต่อรำข้าวสาลีอัตราส่วนเป็น 3:1 ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิควบคุม 30 องศาเซลเซียส ระดับความสูงในถาดเท่ากับ 3 เซนติเมตร โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1153.98 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดูหมักแห้ง

วรัญญู (2549) ได้ทำการพัฒนาเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์สำหรับการหมักแบบแห้งพบว่าการใช้ถังเพิ่มความชื้นที่ภายในมีการเพิ่มหัวพ่นละอองน้ำ 7 หัว ปรับความชื้นของอากาศขาเข้าถังหมักเป็น 0.15 เมตรต่อวินาทีพบว่าสามารถช่วยให้รา *R.oligosporus* เจริญได้ดีมากกว่าที่ความเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาที มีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในเบดบนและเบดล่างเท่ากับ 49.15 และ 48.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังช่วยให้รา *A.oryzae* เจริญได้ดี มีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเท่ากับ 41.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

พิชญฐ์ (2550) ทำการศึกษารูปแบบของไหลโดยการการคำนวณด้านพลศาสตร์ของอากาศภายในถังหมักชีวภาพสองชั้นแบบแพลกเบดด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Fluent 6.2® และสร้างแบบจำลองการไหลของอากาศภายในถังหมักชีวภาพสองชั้นแบบแพลกเบดโดยกำหนดให้อากาศไหลเข้าจากทางด้านล่างของถังหมักชีวภาพด้วยอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 0.23 ลูกบาศก์เมตรต่อวินาที พบว่าอากาศส่วนใหญ่ไหลผ่านท่อกลางตรงกลางเบดชั้นล่างขึ้นไปปะทะกับแผ่นโลหะที่บีบได้เบดชั้นบนและกระจายตัวออกทางด้านข้างของถังหมักชีวภาพออกสู่ด้านบนของถัง พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับผลการทดลองของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของวัสดูหมักและอากาศภายในถังหมักชีวภาพ พบว่าเมื่อกำหนดอุณหภูมิอากาศขาเข้าคงที่เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของวัสดูหมักที่ได้จากแบบจำลองมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงกับผลการทดลอง คือมีค่าแตกต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส

Villegas et al., (1993) ทำการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก การหมักแบบแห้งด้วย *A.oryzae* โดยมีรำข้าวสาลี เป็นวัสดูหมัก ซึ่งตัวแปรที่เปลี่ยนแปลง คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความดันลด และอัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ของจุลินทรีย์ พบว่าการ



เปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ส่วนอุณหภูมิ ความดันลด และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์แปรผันตามกัน เช่น เมื่อตรวจพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมากแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสมากขึ้นตามด้วย เพราะคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการปล่อยของจุลินทรีย์เมื่อเจริญเติบโต ถ้าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมากแสดงว่าจุลินทรีย์ สามารถเจริญเติบโตได้ดี และสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้มากขึ้นด้วย หรือกล่าวได้ว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสามารถตรวจวัดได้จากคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น

Sangsurasak and Mitchell (1995) ศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อทำนายรูปแบบของอุณหภูมิของกระบวนการหมักแบบแห้งในถังหมักแบบแพคเบดในลักษณะ 2 มิติ โดยตั้งสมมุติฐานวัสดุหมักมีเนื้อเดียวกัน อากาศไม่มีความเร็วในแนวนอนและมีและแนวเส้นสัมผัสวงกลม รูปทรงมีค่าคงที่และเท่ากันทั้งหมด ที่ผนังของถังไม่มีแรงต้าน ใช้รา *R. oligosporus* ในการหมัก พบว่าการเจริญและการตายของรา *R. oligosporus* เป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิ การตายของจุลินทรีย์จะเกิดที่ส่วนบนของเบดซึ่งอุณหภูมิสูงสุด และได้เสนอทางแก้ปัญหาที่เกี่ยวกับความร้อนสะสมในแพคเบด ด้วยการเพิ่มความเร็วอากาศหรือลดอุณหภูมิขาเข้าของลม ระบบนี้จะมีประสิทธิภาพเมื่ออัตราส่วนความสูงของเบดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1:1 หรือน้อยกว่า

Aikat and Bhattacharyya (2001) ได้ศึกษาถึงแบบของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักแบบแห้งด้วย *R. oryzae* โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นวัสดุหมักและใช้สารละลาย czapek dox เป็นตัวชะล้างสกัดเอนไซม์โปรติเอสออกจากวัสดุหมักด้วยการฉีดสเปรย์พ่นให้สารละลาย czapek dox ชะล้างเอนไซม์โปรติเอสออกจากวัสดุหมักเป็นระยะๆทางด้านบนของถังปฏิกรณ์ และนำสารละลายที่ชะล้างเอนไซม์โปรติเอสที่ไหลลงรวมกันอยู่ทางด้านล่างของถังมาฉีดสเปรย์พ่นอีกเป็นรอบๆ เรียกว่าการ recycling ซึ่งเมื่อนำสารละลายนี้ไปสกัดก็จะได้เอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบที่ต้องการ นอกจากนี้การ recycling อาจมีการเติมสารละลาย czapek dox ลงไปเพิ่มอีกเพื่อควบคุมให้มีปริมาณสารละลายต่อวัสดุหมักในอัตราส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีการพ่นอากาศทางด้านล่างของถังปฏิกรณ์ผ่านสารละลายที่ชะล้างลงมา เพื่อให้อากาศทำหน้าที่ระบายความร้อน ถังปฏิกรณ์ที่ใช้มี 2 แบบด้วยกัน คือ แบบ stacked plate reactor (SPR) และแบบ packed bed reactor (PBR) โดยถังปฏิกรณ์แบบ SPR มีจานรองรับ วัสดุหมักให้อยู่กันเป็นชั้นๆ ส่วนแบบ PBR วัสดุหมักจะนำมาอยู่รวมกันเป็นชั้นเดียว จากการทดลองพบว่า แบบ PBR สามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสได้มากกว่าแบบ SPR ถึง 4.13 เท่า เพราะการที่วัสดุหมักอยู่กันเป็นชั้นๆ ทำให้สารละลายชะ

ล้างเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ทางด้านบนไปมาก ส่วนทางด้านล่างไม่ค่อยโดนชะล้าง ส่วนแบบ PBR จะเกิดปัญหาเรื่อง product wash out ในตอนท้ายของกระบวนการหมักเพราะสารละลายมีเวลาชะล้างเอนไซม์นานทำให้เราเกิดการเปื่อยจึงไม่ค่อยเจริญเติบโต ทำให้เอนไซม์ โปรติเอสที่ผลิตได้ในช่วงหลังมีค่าลดลง

Wenqing and Yubo (2003) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและความชื้นในการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus sulphureus* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ไซลานเนส 200 กิโลกรัมต่อวันด้วยถาดไม้ อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียสและความชื้น 40-50 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างการทดลองในช่วงเวลาที่ 24-48 จะเกิดการสะสมความร้อนของวัตถุดิบจำนวนมากทำให้อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส การพ่นละอองน้ำเย็นเพื่อช่วยระบายความร้อน ในช่วงเวลาที่ 24 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้ผลการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1000 หน่วยต่อกรัม วัสดุหมักแห้ง เมื่อการผลิตตามธรรมชาติได้ค่าเท่ากับ 650 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

Sandhya *et al.* (2005) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเปรียบเทียบระหว่างรา *A. oryzae* 3 ชนิด คือ NRRL 1808, 6270, 1989 รา *Penicillium funiculosum* 2 ชนิด คือ NRRL 1768, 1132 รา *P. pinophilum* NRRL 106 และรา *P. aculeatum* NRRL 2129 บนจานเลี้ยงเชื้อ พบว่ารา *A. oryzae* NRRL1808 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด จากนั้นนำรา *A. oryzae* มาทำการหมักแบบเหลวและแบบแห้ง พบว่าการหมักแบบแห้งรา *A.oryzae* NRRL 1808 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าการหมักแบบอาหารเหลว โดยการหมักแบบแห้งมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเป็น 31.2 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก และการหมักแบบอาหารเหลวมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเป็น 8.7 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมัก

Chutmanop *et al.* (2008) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *A.oryzae* ในการหมักแบบแห้งโดยใช้วัสดุทางการเกษตรในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า การใช้รำข้าวเจ้าเป็นวัสดุหมักอย่างเดียวให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงแต่ก็จะเกิดปัญหาหลังปรับความชื้น คือมีลักษณะเป็นก้อน เหนียว ช่องว่างน้อย จึงมีการผสมด้วยรำข้าวสาลีเพื่อเพิ่มช่องว่างของวัสดุหมัก การใช้วัสดุหมักผสมรำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลีอัตราส่วน 0.33 ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมัก ค่าพีเอช 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดประมาณ 1200 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

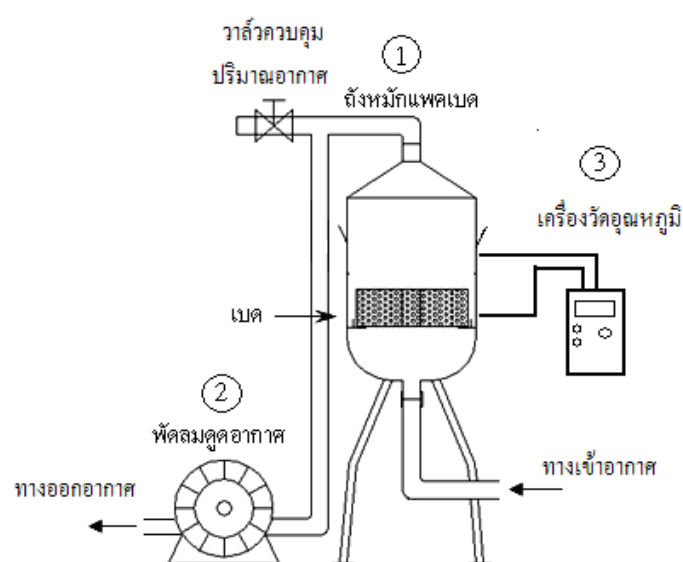
จุลินทรีย์ คือ รา *Aspergillus oryzae* มีชื่อทางการค้าว่า Ozykat-1 มีความเข้มข้นของ สปอร์ ต้นเชื้อเท่ากับ  $10^9$  สปอร์ต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

#### 2. วัสดุหมัก

วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 1:3 (สุนทร,2549)

#### 3. ชุดอุปกรณ์การหมักแพคเบด

ชุดอุปกรณ์การหมักแพคเบด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 5 คือ

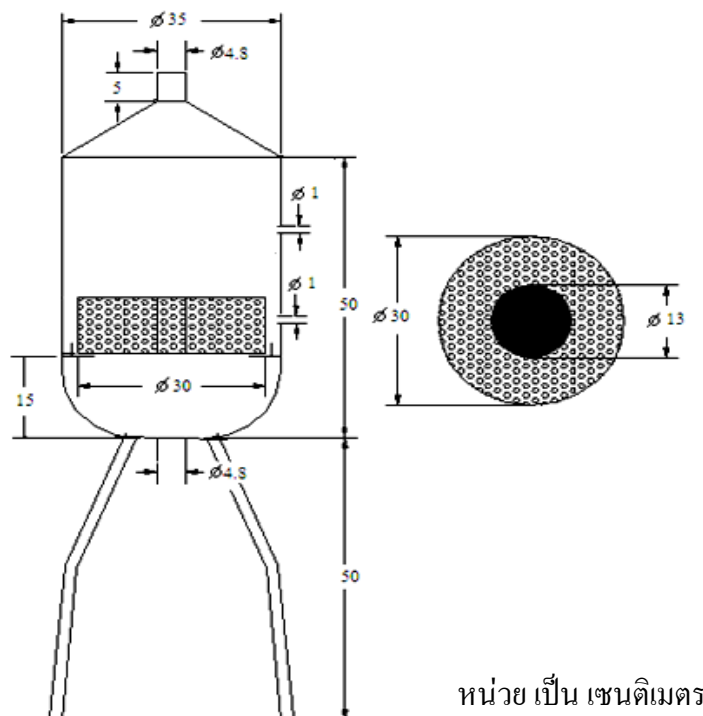


ภาพที่ 5 ชุดอุปกรณ์การหมัก

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก วรรณูญ (2549)

## 1. ถังหมักแพคเบด (packed-bed fermentor)

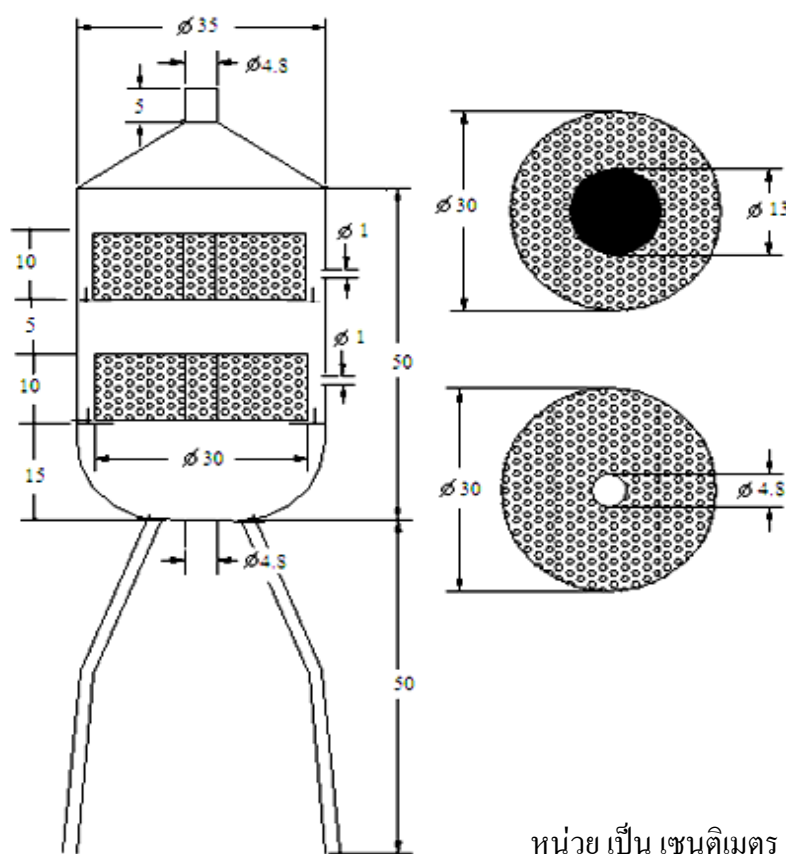
1.1 ถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร มีปริมาตรถังโดยรวมประมาณ 50 ลิตร ตัวถังประกอบด้วยฝาปิด ทางด้านบนมีช่องให้อากาศไหลออกและทางด้านล่างมีช่องให้อากาศไหลเข้า เพื่อใช้ในการระบายความร้อนที่เกิดระหว่างจากการหมัก ซึ่งทั้งสองช่องมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร ด้านข้างถังหมักมีช่องเพื่อเสียบหัวเซนเซอร์วัดอุณหภูมิจำนวน 2 ช่อง มีเส้นผ่านศูนย์กลางช่องละ 1 เซนติเมตร ภายในถังหมักมีตะขอสำหรับวางตะแกรงเบด โดยตะแกรงเบดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ตะแกรงเบดมีรูพรุนโดยรอบ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2 มิลลิเมตร โดยที่ก้นตะแกรงมีแผ่นเหล็กกล้าทึบเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร เพื่อช่วยในการกระจายลมที่เข้ามาจากด้านล่างของถังหมักแก่ชั้นของวัสดุหมัก ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก วรรณ (2549)

1.2 ถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ที่ใช้ในงานวิจัยมีขนาดเท่ากับถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว แต่ภายในถังหมักสามารถวางตะแกรงได้ 2 ระดับ ที่ความสูง 15 และ 30 เซนติเมตร ที่ตะแกรงเบดล่างมีการเจาะรูตรงกลางมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร เพื่อช่วยให้อากาศไหลผ่านสู่เบดชั้นบนได้สะดวก ส่วนที่กั้นตะแกรงชั้นบนมีแผ่นเหล็กกล้าไร้สนิมที่ปิดที่ตรงกลางเพื่อช่วยในการกระจายอากาศให้กับตะแกรงชั้นบน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ดังภาพที่ 7 ซึ่งตะแกรงเบดทั้งสองมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากันจึงสามารถสลับเปลี่ยนตำแหน่งวางได้



ภาพที่ 7 ถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก วรรณูญ (2549)

## 2. พัดลมดูดอากาศ (air suction blower)

พัดลมดูดอากาศของบริษัท Greenco รุ่น XBD-750 มีกำลัง 1 แรงม้า ถูกติดตั้งและเชื่อมต่อกับช่องทางออกด้านบนของฝาปิดถังหมัก เพื่อดูดอากาศ ที่ผ่านถังหมักแล้วระบายออกทางด้านบนของถังหมักแพคเบด ส่วนทางด้านบนของถังหมักแพคเบดมีวาล์วสำหรับควบคุมปริมาณอากาศภายในถังหมักแพคเบด

## 3. เครื่องมือวัดที่ติดตั้งเพื่อวัดตัวแปรต่างๆ มีดังนี้

3.1 เครื่องวัดอัตราเร็วอากาศ (air flow meter) รุ่น hot wire sensor (407112) ของบริษัท Extech Instruments

3.2 เครื่องวัดอุณหภูมิแบบเก็บข้อมูล (multilog datalogger ของ Fourier system รุ่น DB-526, Isarael) พร้อมหัวเซนเซอร์ (thermocouple) สามารถวัดอุณหภูมิได้ในช่วง -25 ถึง 110 องศาเซลเซียส ทำการวัดอุณหภูมิในชั้นวัสดุหมักและอุณหภูมิอากาศ

3.3 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ใช้ในการทดลองมี 2 แบบ ดังนี้

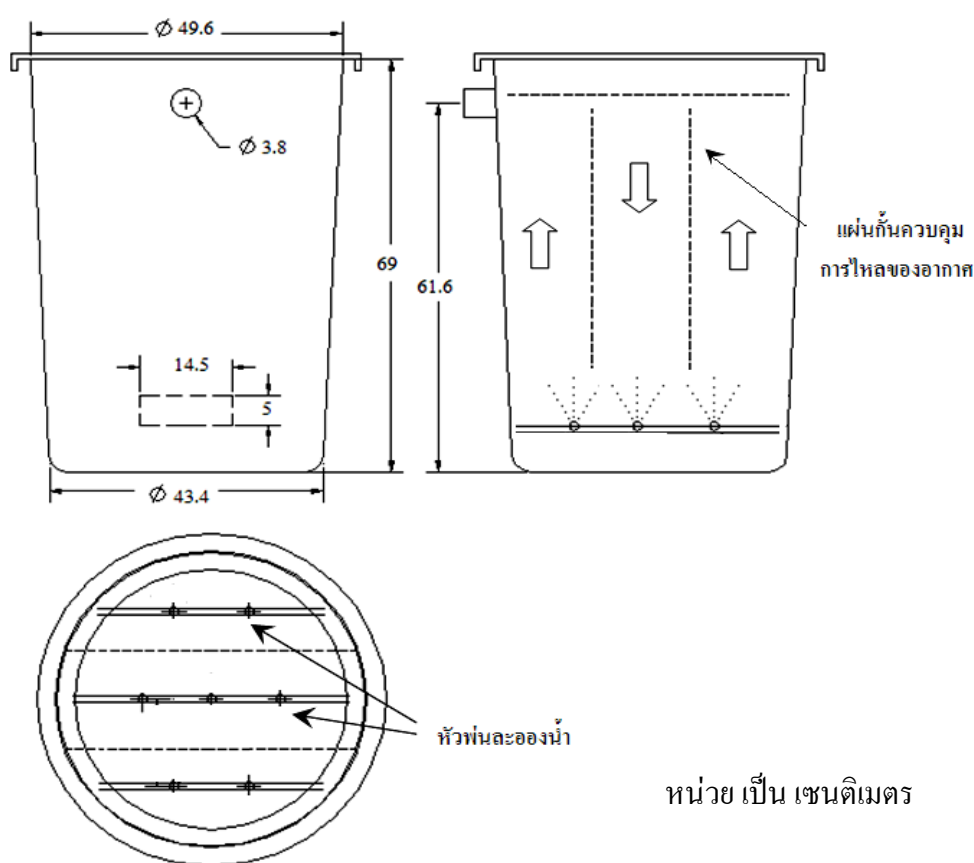
แบบที่ 1 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (Barigo hydrometer รุ่น 420

แบบที่ 2 เครื่องวัดความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศของบริษัท ETT สามารถวัดความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (เปอร์เซ็นต์) ได้ตั้งแต่ช่วง 0 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และช่วงอุณหภูมิอากาศ 0 ถึง 100 องศาเซลเซียส

## 4. อุปกรณ์เพิ่มเติมสำหรับการเพิ่มความชื้นแก่วัสดุหมัก

4.1 เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ (humidifier) มีลักษณะเป็นถังทรงกระบอก มีเส้นผ่านศูนย์กลางด้านล่าง 49.6 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางด้านล่าง 43.5 เซนติเมตร สูง 69 เซนติเมตร มีปริมาตรโดยรวม 98 ลิตร ถึงเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ผลิตจากพลาสติก มีช่องให้อากาศไหลเข้าทางด้านล่างกว้าง 14.5 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร ปิดด้วยแผ่นกรองอากาศ และมีช่องให้

อากาศไหลออกทางด้านบนมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 เซนติเมตร ภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ มีหัวพ่นละอองน้ำเป็น 7 หัว แบ่งออกเป็น 3 ชุด หัวพ่นละอองน้ำแต่ละชุดมีจำนวนหัวพ่นละอองน้ำ 2 3 และ 2 หัว ตามลำดับ โดยที่ทุกหัวพ่นละอองน้ำ (water spray) มีทิศทางการพ่นละอองน้ำจากด้านล่างขึ้นสู่ด้านบนทั้งหมด แต่ภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ด้วยแผ่นกั้นควบคุมทิศทางการไหลของอากาศ เพื่อเพิ่มระยะเวลาที่อากาศอยู่ภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้นานขึ้น การไหลของอากาศภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มีการไหลสลับขึ้นและลง ดังแสดงในภาพที่ 8 ทางด้านล่างเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มีท่อระบายน้ำ ระบายน้ำที่เหลือจากการเพิ่มความชื้นในอากาศให้ไหลกลับลงสู่เครื่องสูบน้ำ อากาศไหลเข้าเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ทางด้านล่างและไหลออกทางด้านบนของเครื่อง



ภาพที่ 8 รูปร่างและขนาดของถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก วรรณัญ (2549)

4.2 ปั๊มน้ำ (water pump) รุ่น CBAI ของบริษัท Scientific Promotion ใช้สูบน้ำให้กับหัวพ่น ละอองน้ำภายในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

## 5. อุปกรณ์ช่วยวิเคราะห์

### 5.1 ตู้ปลอดเชื้อ

5.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น LM6100 ของบริษัท mettler toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

5.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HL-340 ของบริษัท Huxley

5.4 เครื่องวิเคราะห์ความชื้นในวัสดุหมัก (moisture analyzer) รุ่น AMB 50 ของบริษัท adam equipment ประเทศอังกฤษ

5.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น anthe kie advanced ของบริษัท secomam ประเทศฝรั่งเศส

## วิธีการ

### 1. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบเบดแบบชั้นเดียว

1.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสกรณีไม่มีการเติมอากาศถังหมักแบบเบดแบบชั้นเดียว

ซึ่งวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าอัตราส่วน 1:3 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ดีที่สุดที่ได้จากงานวิจัยของ Chutmanop *et al.* (2008) จำนวน 2 กิโลกรัม ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมัก นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้ปริมาณดินเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก ผสมกับปริมาณแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก คลุกเคล้าให้เข้ากัน ใส่ลงในตะแกรงเบด โดยมีแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นแบ่ง



วัสดุหมักตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางออกเป็น 6 ช่อง เท่า ๆ กัน ซึ่งช่วยในการให้อากาศไหลเข้าชั้นวัสดุหมักใน เบดอย่างทั่วถึงและเป็นการระบายความร้อนได้ดีขึ้น (จรัญ, 2548) ดังภาพที่ 9 ปรับวัสดุหมักในเบดให้มีความหนา 10 เซนติเมตร นำเบดตั้งที่ระดับความสูงจากกันถึง 15 เซนติเมตร พร้อมทั้งนำหัวเซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิเสียบลงในชั้นของวัสดุหมักเพื่อเก็บข้อมูลอุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในเบด ตลอดระยะเวลาการหมัก ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย ระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำการเก็บตัวอย่างวัสดุหมัก จำนวน 4 ตำแหน่งแบบสุ่ม ทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วนำส่วนวัสดุหมักที่เก็บมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความชื้นและค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมัก



ภาพที่ 9 ลักษณะการวางแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นแบ่งวัสดุหมักตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง

1.2 ศึกษาหาความเร็วของอากาศภายในถังหมักแพคเกจที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอสด้วยถังแพคเกจแบบชั้นเดียว

ทำการเตรียมวัสดุหมักและบรรจุลงถังหมักดังการทดลองที่ 1 แล้วนำอัดสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอัดด้านข้างเพื่อปิดหรือบังคับให้อากาศผ่านช่องตามต้องการ ดังภาพที่ 10 เติมอากาศให้ไหลเข้าถังหมักแพคเกจทางช่องด้านล่างถังหมัก พร้อมทั้งใช้แผ่นกรองอากาศยี่ห้อ 3M ซึ่งเป็นเส้นใยแบบโปรงผ่านขบวนการชาร์ทไฟฟ้าสถิตแบบถาวร สามารถดักจับสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดตั้งแต่ 0.1 ไมครอนขึ้นไปได้ดี ปิดปากปากท่อเพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่างๆ ในอากาศ ทำการปรับวาล์ว ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยกำหนดให้ความเร็วอากาศภายในถังหมักแพคเกจเท่ากับ 0.05 0.10 และ 0.15 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ทำการทดลอง

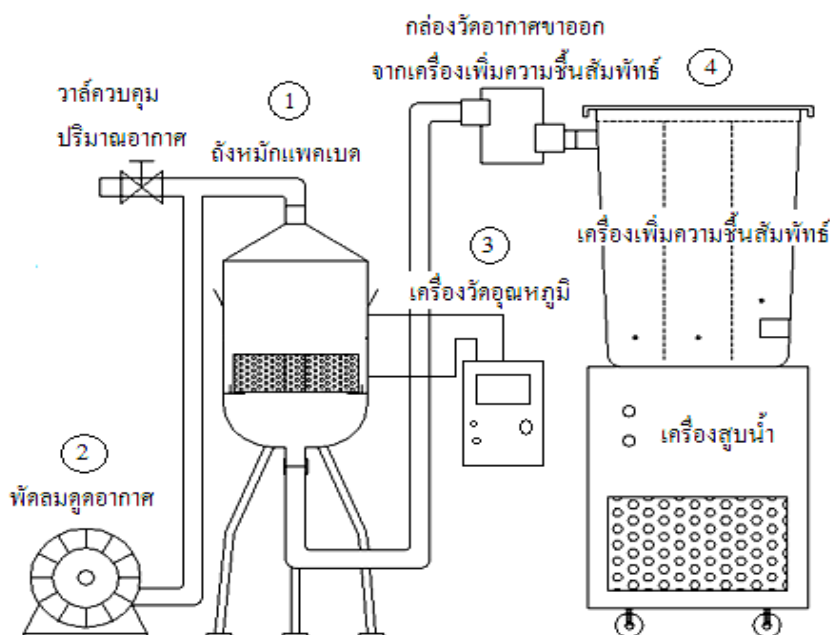
ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง สังเกตการเจริญเติบโตของรา *A.oryzae* เก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 1.1 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความชื้น และค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมัก



ภาพที่ 10 ลักษณะการอัดด้วยสาลิที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ด้านข้างถังหมักแพคเบด

1.3 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้อากาศเข้าถังหมัก

ทำการเตรียมวัสดุหมักและบรรจุลงถังหมักดังการทดลองที่ 1.1 หลังจากนั้นนำอากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มาต่อกับทางเข้าของอากาศเข้าในชั่วโมงที่ 12 ดังแสดงในภาพที่ 11 ด้วยความเร็วอากาศที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 โดยก่อนใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ต้องนำน้ำที่ต้องการใช้ไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ทำการวัดอุณหภูมิภายในวัสดุหมักทุก 30 นาที ด้วยเซนเซอร์ และเครื่องเก็บข้อมูล ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แต่ทุกครั้งเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และค่ากิจกรรมโปรติเอส



ภาพที่ 11 ระบบการหมักในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวพร้อมเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก วรรณูญ (2549)

## 2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

2.1 ศึกษาการจัดวางตำแหน่งเบดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

2.1.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นโดยกำหนดให้ตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กทึบติดอยู่ใต้ตะแกรงเบดเป็นเบดบน

ซึ่งวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าอัตราส่วน 1:3 จำนวน 4 กิโลกรัม ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมัก นำไปฆ่าเชื้อในหม้อหนึ่ง ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้ปริมาณดินเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก ผสมกับปริมาณแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของวัสดุหมัก คลุกเคล้าให้เข้ากัน บรรจุวัสดุหมักที่

เตรียมเสร็จลงในตะแกรงเบตทั้งสอง ซึ่งแต่เบตถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆ เหมือนการทดลองที่ 1 ปรับวัสดุหมักทั้งสองเบตให้มีความหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตร นำเบตที่มีแผ่นเหล็กทึบปิดที่ตรงกลางวางไว้ที่ระดับความสูงจากกันถึง 15 และนำเบตที่มีการเจาะรูกลวงตรงกลางวางไว้ที่ตำแหน่ง 30 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 12 แล้วนำอัดสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอัดด้านข้างของถังหมักทั้งสองเบต พร้อมทั้งนำหัวเซนเซอร์วัดอุณหภูมิเสียบลงในชั้นของวัสดุหมักเพื่อเก็บข้อมูลอุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในเบตตลอดระยะเวลาการหมัก ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย หลังจากนั้นนำอากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มาต่อกับทางเข้าของอากาศเข้าในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ดังภาพที่ 14 ด้วยความเร็วอากาศที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และค่ากิจกรรมโปรติเอส

2.1.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเกจแบบสองชั้นโดยกำหนดให้ตะแกรงเบตที่มีแผ่นเหล็กทึบติดอยู่ใต้ตะแกรงเบตเป็นเบตบน

ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 2.1.1 แต่จัดตำแหน่งเบตที่มีแผ่นเหล็กทึบติดอยู่ใต้เบตเป็นเบตล่าง ดังภาพที่ 13 ให้ความหนาของวัสดุหมักเบตล่างต่อเบตบนเท่ากับ 10 เซนติเมตร ทั้งสอง ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และค่ากิจกรรมโปรติเอส

2.2 ศึกษาผลความหนาของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเกจแบบสองชั้น

ทำการเตรียมวัสดุหมักและบรรจุลงถังหมักเหมือนการทดลองที่ 2.1 โดยบรรจุวัสดุหมักที่เตรียมเสร็จลงในตะแกรงเบตทั้งสอง ปรับวัสดุหมักทั้งสองเบตให้มีความหนาของเบตล่างต่อเบตบนเท่ากับ 10 และ 5 เซนติเมตร ตามลำดับ นำเบตทั้งสองตั้งที่ระดับความสูงจากกันถึง 15 และ 30 เซนติเมตร ตามลำดับ พร้อมทั้งนำหัวเซนเซอร์วัดอุณหภูมิเสียบลงในชั้นของวัสดุหมักเพื่อเก็บข้อมูลอุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในเบตตลอดระยะเวลาการหมัก ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย หลังจากนั้นนำอากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มาต่อกับทางเข้าของอากาศเข้าในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ด้วยความเร็วอากาศที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1.2 ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง แต่ครั้งเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้นในวัสดุหมัก และค่ากิจกรรมโปรตีน พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ 2.1



ถังหมักแพคเบด



เบดบน



เบดล่าง

ภาพที่ 12 ถังหมักแพคเบดและตำแหน่งการวางตะแกรงเบดในการทดลอง 2.1.1



ถังหมักแพคเบด



เบดบน



เบดล่าง

ภาพที่ 13 ถังหมักแพคเบดและตำแหน่งการวางตะแกรงเบดในการทดลอง 2.1.2



#### 4. การวิเคราะห์ตัวแปรต่างๆ

##### 4.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ทำโดยนำกระทงอูลุมิเนียม อบที่อุณหภูมิ  $103 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งจนได้น้ำหนักที่แน่นอน ซึ่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ความชื้น ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 ถึง 3 กรัม ใส่ลงในกระทงอูลุมิเนียม นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ  $103 \pm 2$  องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระทงอูลุมิเนียมออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักแล้วนำไปอบซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักส่วนที่หายไปคือน้ำหนักน้ำหรือความชื้น (A.O.A.C)

##### 4.2 การวัดค่ากิจกรรมโปรติเอส (protease activity)

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส ตามวิธีของ Fukushima *et al.*, 1989 ดังแสดงในภาคผนวก (ก) โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนให้ได้ไทโรซีนซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการวิเคราะห์ (Fan-Chiang and Lin, 1998)

## ผลและวิจารณ์

### 1. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว

#### 1.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสกรณีไม่มีการเติมอากาศถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว

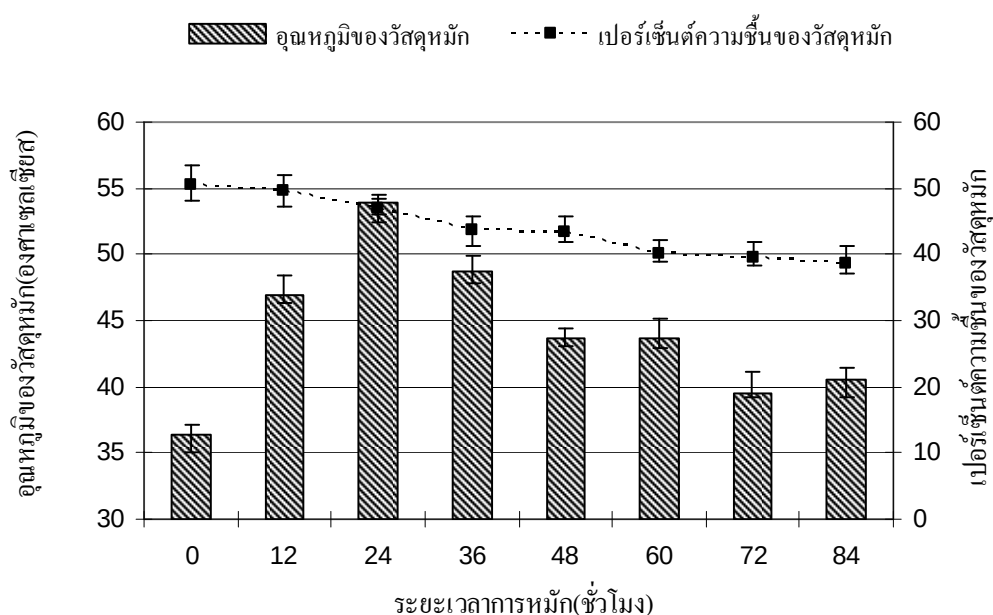
การผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *A.oryzae* โดยใช้วัสดุหมักข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้า อัตราส่วน 1 : 3 ในถังหมักแพคเบด เป็นเวลา 84 ชั่วโมง โดยไม่มีการเติมอากาศเข้าถังหมักระหว่างการหมัก พบว่าในกรณีไม่มีการเติมอากาศ ระหว่างชั่วโมงเริ่มต้นการหมักถึงชั่วโมงการหมักที่ 24 อุณหภูมิของวัสดุหมักจึงค่อยๆสูงขึ้นและสูงสุดที่ 53.9 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากเริ่มต้นชั่วโมงการหมักถึง 48 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากช่วงนี้ราเริ่มที่จะนำสารอาหารจากวัสดุหมักไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นอย่างรวดเร็ว (exponential phase) ระยะนี้รามี้อัตราการเจริญสูงมากขึ้น พร้อมทั้งมีการคายความร้อนออกมาอย่างมาก การหายใจและกระบวนการเมตาบอลิซึมของรานี้ เป็นผลให้เกิดการสะสมความร้อนในชั้นวัสดุหมัก (Raimbault, 1998) หลังจากนั้นอุณหภูมิจะมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนชั่วโมงการหมักที่ 84 มีค่าเท่ากับ 40.5 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 15 ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าชั่วโมงการหมักที่ 24 เป็นชั่วโมงวิกฤติที่จะเป็นอันตรายต่อรา อาจทำให้ราตายได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงมาก ซึ่งปกติแล้วรา *A.oryzae* จะเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส (Francis *et al.*, 2003) และถ้าปล่อยราให้เจริญอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 48 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานประมาณ 2 ชั่วโมง ว่าจะเกิดสภาวะที่เรียกว่า burn out ซึ่งราจะตายหรือไม่มีปฏิกิริยาใดๆที่อุณหภูมิสูงและการหมักจะจบลงนั่นเอง (Wenqing *et al.*, 2003) จากการทดลองนี้สาเหตุที่อุณหภูมิไม่ลดลง แม้อุณหภูมิจะสูงจนอาจทำให้อาหารตายได้ก็ตาม สาเหตุเกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถโตได้ในสภาวะไร้อากาศ (Ellen and Yang, 1998) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเปรี้ยวขึ้นขณะทำการทดลอง

ส่วนค่าความชื้นซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญผลต่อการเจริญของรา และราส่วนใหญ่ในการหมักแบบแห้งสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความชื้นของวัสดุหมักอยู่ในช่วง 40 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Raimbault, 1998) จากการทดลองนี้มีการปรับความชื้นเริ่มต้นที่ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าความชื้นที่ชั่วโมง 84 มีค่าเท่ากับ 38.75 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นลดลงเป็น 23 เปอร์เซ็นต์จากความชื้นเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 15 สาเหตุเกิดจากน้ำที่มีในวัสดุหมักร่วมกับความร้อนที่เกิดระหว่าง

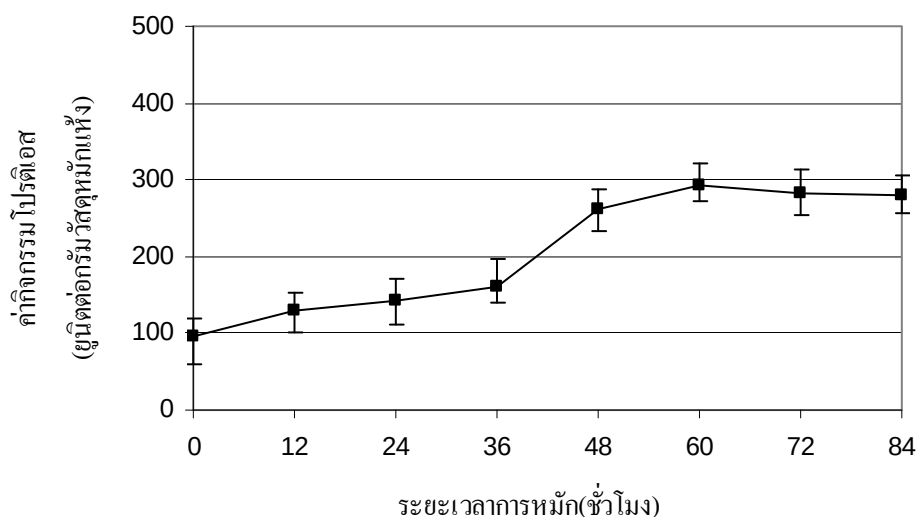


กระบวนการหายใจและเมตาบอลิซึมของรา ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะอยู่รูปเป็นไอน้ำแล้วระเหยออกจากวัสดุหมัก

ค่ากิจกรรมโปรติเอสช่วงแรกในชั่วโมงที่ 0-24 ยังคงค่อนข้างคงที่ เนื่องจากราปล่อยเอนไซม์อะไมเลสออกมาก่อนปล่อยเอนไซม์โปรติเอส (Ramachandran *et al.*, 2003) สาเหตุนี้เนื่องจากในงานวิจัยนี้ มีการเติมแป้งสาลีลงไป เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้ราใช้ในช่วงแรกของการเจริญ เพราะราสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ง่ายกว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีในรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า ดังนั้นค่ากิจกรรมโปรติเอสจึงยังไม่มากนักในช่วงแรก ดังภาพที่ 16 ต่อมาจะมีค่าเพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ชั่วโมงการหมักที่ 60 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 293.30 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง สาเหตุเนื่องจากอุณหภูมิสูงอาจมีการทำลายเส้นใยของราได้ (Wenqing *et al.*, 2003) และมักมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นระหว่างการหมัก



ภาพที่ 15 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว กรณีไม่มีการเติมอากาศ



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรตีนของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรตีนในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว กรณีไม่มีการเติมอากาศ

## 1.2 ศึกษาความเร็วอากาศที่เติมภายในถังหมักแพคเบดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนด้วยถังแพคเบดแบบชั้นเดียว

จากผลการทดลองข้อ 1.1 แสดงให้เห็นว่าการที่ไม่เติมอากาศเข้าถังหมักระหว่างการหมัก อุณหภูมิสะสมของวัสดุหมักจะมีค่าสูงและมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนอย่างมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแก้ไข เพื่อลดอุณหภูมิสะสมของวัสดุหมักโดยการเติมอากาศตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 12 เพื่อลดอุณหภูมิของวัสดุหมัก ก่อนที่จะมีอุณหภูมิสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตของราได้ โดยศึกษาความเร็วของอากาศภายในถังหมัก คือ 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ อัตราการให้อากาศถูกควบคุมให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับกรณีไม่ให้อากาศ เพื่อหาความเร็วที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีน

### 1.2.1 ผลการศึกษาการเจริญของรา *A.oryzae* ที่เปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาการหมัก

จากการทดลองผลการเจริญของรา *A.oryzae* บนวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลิกับรำข้าวเจ้า ดังภาพที่ 17 พบว่าเมื่อทำการหมักในชั่วโมงที่ 24 ราจะสร้างเส้นใยสปอร์สีขาวที่เรียกว่า ไมซีเลียม ปกคลุมวัสดุหมัก และในชั่วโมงที่ 60 ราจะเริ่มสร้างสปอร์ โดยสปอร์ของรา

*A.oryzae* มีสีเหลืองแกมเขียว และจะเข้มขึ้นเรื่อยๆตามปริมาณสปอร์ที่เพิ่มขึ้น ลักษณะการเจริญเติบโตที่เห็นเด่นชัดอยู่บริเวณที่ได้เบคและบริเวณผิวด้านบนเบคเป็นส่วนใหญ่ ดังภาพที่ 18

### 1.2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาการหมัก

จากภาพที่ 19 แสดงการศึกษาอุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักที่มีการเติมอากาศที่ความเร็วภายในถังหมักแพคเกจต่างๆ คือ 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที พบว่าในช่วงเวลาการหมักที่ 0-12 อุณหภูมิของวัสดุหมักจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีอุณหภูมิสูงสุดเท่ากับ 46.7 46.3 และ 46.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากนั้นเริ่มเติมอากาศแก่ถังหมักแพคเกจตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป อากาศที่ไหลผ่านจะพัดพาความร้อนที่สะสมในวัสดุหมัก มีผลทำให้อุณหภูมิของวัสดุหมักในช่วงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นชั่วโมงวิกฤติของรา อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่ราจะเจริญได้จากทดลองที่ 1.1 มีค่าอุณหภูมิลดลงเหลือ 45.6 42.2 และ 39.6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงจากชั่วโมงที่ 12 ที่ไม่มีการเติมอากาศ ถึงประมาณ 15 22 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นอุณหภูมิในวัสดุหมักจะลดลงจนมีอุณหภูมิต่ำสุดท้ายที่ชั่วโมง 96 เท่ากับ 34.9 31.9 29.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

โดยการทดลองนี้ อุณหภูมิของอากาศนอกถังหมักมีค่าเฉลี่ยประมาณ 30.5 องศาเซลเซียส ซึ่งการเพิ่มหรือลดของอุณหภูมิของวัสดุหมักอาจรับอิทธิพลจากอุณหภูมิอากาศภายนอกถังหมักที่จะถูกดูดเข้าไปถังหมักเพื่อให้อากาศและระบายความร้อนจากวัสดุหมัก เนื่องจากไม่มีระบบการควบคุมอุณหภูมิอากาศก่อนเข้าถังหมักแพคเกจ

### 1.2.3 การศึกษาปริมาณความชื้นที่เปลี่ยนแปลงต่อระยะเวลาการหมัก

ความชื้นสัมพัทธ์อากาศภายนอกถังหมักขณะทำการทดลองทุกการทดลองมีค่าเฉลี่ยประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออากาศเข้าถังหมักและผ่านวัสดุหมัก อากาศภายในถังจะมีความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าอากาศภายนอกถังหมักประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับระดับความเร็วอากาศที่ไหลผ่าน เนื่องจากน้ำในวัสดุหมักจะระเหยไปพร้อมกับอากาศที่ไหลผ่านและมีการพาความร้อนออกจากวัสดุหมักออกไปด้วย จนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการหมัก เมื่อความชื้นของวัสดุหมักลดลงและคงที่ ทั้งนี้ปริมาณน้ำอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของราขึ้นกับ ชนิด

ของวัสดุหมัก เนื่องจากวัสดุหมักแต่ละชนิดมีความสามารถในการอุ้มน้ำแตกต่างกัน (Raimbault, 1998)

จากการทดลองมีการให้อากาศภายในถังหมักที่ความเร็ว 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักจะลดลงอย่างต่อเนื่องตามความเร็วอากาศที่ให้แกถังหมัก โดยทำให้ความชื้นลดลงเหลือเป็น 21.11 14.70 และ 11.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์ความชื้นสุดท้ายนี้ เป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่เราสามารถเจริญได้น้อย ยังไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญรา

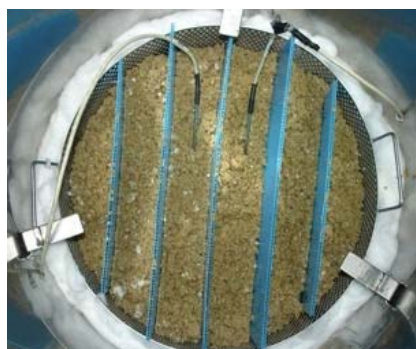
#### 1.2.4 ค่ากิจกรรมโปรติเอสที่เปลี่ยนแปลงต่อระยะการหมัก

ค่ากิจกรรมโปรติเอสในระหว่างการหมัก พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 12-72 ที่ทุกความเร็วของการเติมอากาศ แสดงว่า *A.oryzae* เจริญได้ดี และหลังจากชั่วโมงที่ 72 จนถึงชั่วโมงที่ 96 พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก

จากภาพที่ 21 พบว่าความเร็วอากาศภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที เป็นความเร็วที่เหมาะสมในการเติมอากาศเข้าถังหมักแฟลเบด เห็นชัดเจนว่าการปรับค่าอากาศภายในถังเป็น 0.1 เมตรต่อวินาที ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงกว่าทุกความเร็วของการเติมอากาศ และมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 713.50 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 96 ซึ่งมากกว่ากรณีไม่มีการเติมอากาศถึง 2.43 เท่า เนื่องจากความเร็วลมระดับนี้สามารถที่จะพัดพาความร้อนออกจากวัสดุหมักและเป็นความเร็วที่เพียงพอในการดึงอากาศที่มีปริมาณของออกซิเจน ทำให้ราตรึงออกซิเจนไปใช้ มีผลให้ราปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยสลายอาหารที่มีในวัสดุหมักมากขึ้น เป็นผลให้การวัดค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงตามไปด้วย

ในขณะที่ความเร็วภายในถังหมักที่ 0.05 และ 0.15 เมตรต่อวินาที ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 441.74 ในชั่วโมงการหมักที่ 96 และ 435.64 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 84 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก สาเหตุเนื่องจากที่ความเร็ว 0.05 เมตรต่อวินาที เป็นความเร็วที่น้อยเกินไป ทำให้อากาศซึ่งเป็นแหล่งของออกซิเจนไหลผ่านชั้นของวัสดุหมักได้ไม่ทั่วถึงและมีการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไปได้น้อยอีกด้วย ในขณะที่ความเร็วที่ 0.15

เมตรต่อวินาที เป็นความเร็วที่มากจนเกินไปทำให้อากาศที่ไหลผ่านไปยังชั้นเบดมีผลต่อความชื้นซึ่งลดลงอย่างรวดเร็วจน ลักษณะของวัสดุจะแห้งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา



ชั่วโมงที่ 0



ชั่วโมงที่ 24



ชั่วโมงที่ 60



ชั่วโมงที่ 96

ภาพที่ 17 วัสดุหมักที่ชั่วโมงที่ 0 24 60 และ 96

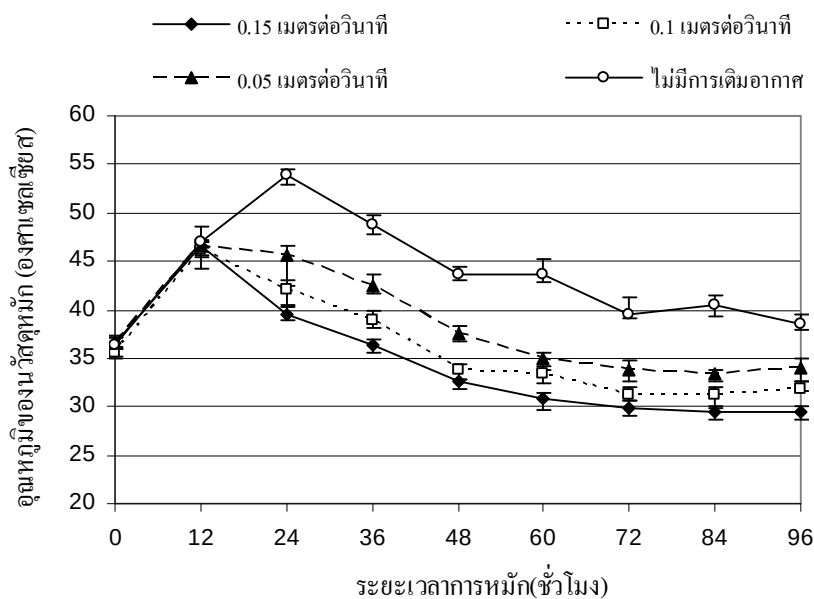


(ก)

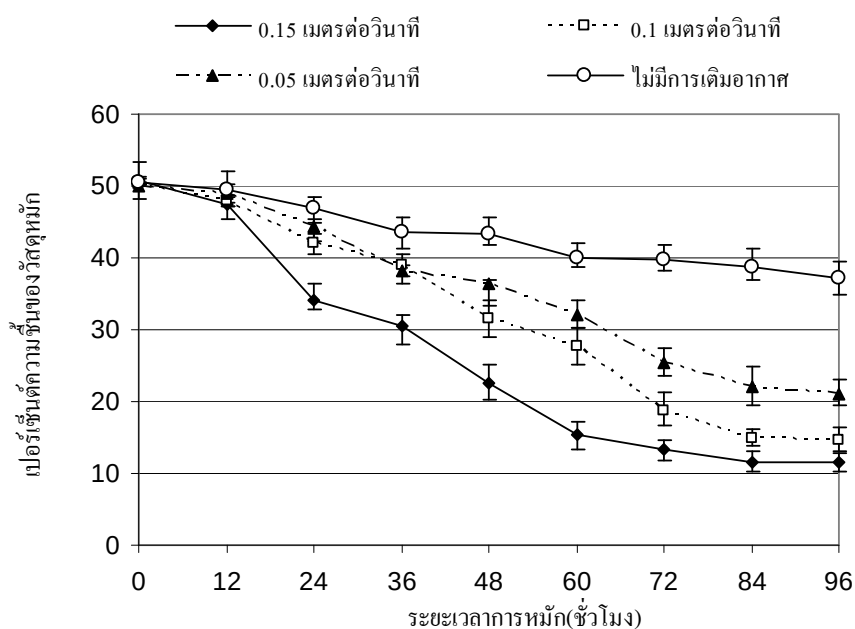


(ข)

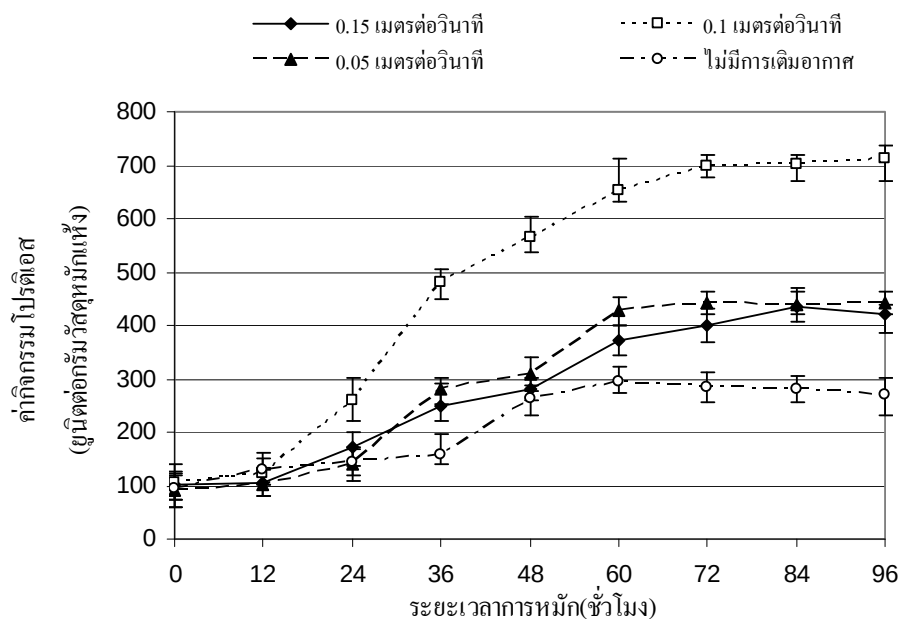
ภาพที่ 18 การเจริญของรา *A. oryzae* ในวัสดุหมักที่ชั่วโมงที่ 96 ก) ลักษณะการเจริญของรา *A. oryzae* ที่บริเวณผิวด้านบนของวัสดุหมัก ข) ลักษณะการเจริญของรา *A. oryzae* ที่บริเวณผิวด้านล่างของวัสดุหมัก



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรตีนในถังแพคเบดแบบขึ้นเดียวโดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรตีนในถังแพคเบดแบบขึ้นเดียว โดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ



**ภาพที่ 21** การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรตีนของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรตีนในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว โดยปรับค่าการความเร็วอากาศภายในถังเป็น 0.05 0.1 และ 0.15 เมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการเติมอากาศ

### 1.3 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีนในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวโดยใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้อากาศเข้าถังหมัก

สืบเนื่องจากการทดลองที่ 1.2 พบว่าการให้อากาศแก่ถังหมักแพคเบดจะช่วยลดอุณหภูมิสะสมของวัสดุหมักได้ก็จริง แต่มีข้อเสียคือ ทำให้ความชื้นของวัสดุหมักลดลงอย่างรวดเร็ว จนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา ในงานวิจัยนี้ จึงแก้ไขในจุดนี้โดยพยายามรักษาความชื้นในวัสดุหมักด้วยการใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เพื่อช่วยเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้กับอากาศที่ใช้ระบายความร้อนในวัสดุหมักภายในถังหมักแพคเบด นอกจากนี้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ยังสามารถลดอุณหภูมิอากาศไปพร้อมกับการเพิ่มความชื้นให้กับวัสดุหมัก (วรัญญ, 2549)

การทดลองนี้นำอากาศผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ได้ออกแบบไว้มาระบายความร้อนในการหมัก *A.oryzae* บนวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับรำข้าวเจ้าด้วยอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนัก ปรับความชื้นวัสดุหมักให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ใส่น้ำเชื้อรา *A.oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ และแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ บรรจุลงในตะแกรงเบคกิลที่ถูแบ่งด้วยแผ่นพลาสติกเป็น 6 ส่วน

ปรับวัสดุหมักเท่ากับ 10 เซนติเมตร ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ด้วยความเร็วอากาศภายในถัง 0.1 เมตรต่อวินาที

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในเบดตลอดระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในเบดมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา พบว่าหากเปรียบเทียบกับกรณีไม่ใช้ถังเพิ่มความชื้นพัทธ์ พบว่าอุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในแต่ละชั่วโมงมีค่าลดลง 7-10 องศาเซลเซียส โดยในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก มีอุณหภูมิเท่ากับ 28.8 องศาเซลเซียส

ปริมาณความชื้นในวัสดุหมักที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักรา *A.oryzae* ปริมาณความชื้นในวัสดุหมักจะลดลงตลอดการทดลอง โดยที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการให้อากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นที่สามารถเพิ่มความชื้นได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการทดลอง แต่เนื่องจากการส่งอากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มสัมพัทธ์ความชื้นไปยังถังหมักแพคเบดมีระยะทางไกลจึงทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศก่อนเข้าถังหมักลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทุกการทดลอง และปริมาณน้ำอิสระที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราขึ้นกับชนิดของวัสดุหมัก เนื่องจากวัสดุหมักแต่ละชนิดมีความสามารถในการอุ้มน้ำต่างกันและความชื้นในอากาศขณะทำการทดลอง

จากภาพที่ 22 พบว่าปริมาณความชื้นในวัสดุหมักลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24-84 เนื่องจากรา *A.oryzae* มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีผลให้อุณหภูมิในเบดสูง จึงทำให้น้ำระเหยออกจากวัสดุหมักอย่างรวดเร็ว และหลังจากชั่วโมงที่ 84 ปริมาณความชื้นในวัสดุหมักเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก และมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 18.10 เปอร์เซ็นต์

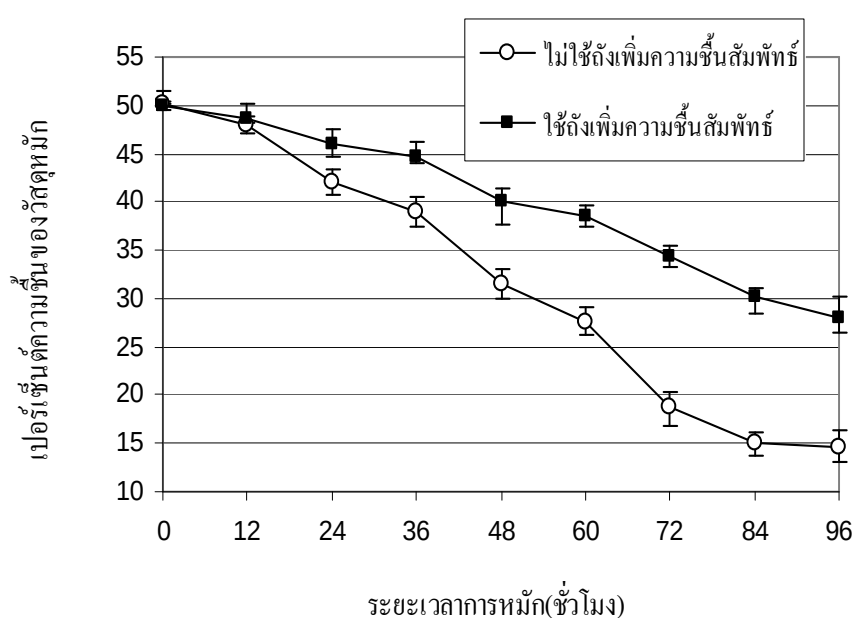
ดังนั้นหากเปรียบเทียบกับกรณีให้อากาศผ่านถังหมักโดยไม่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ เฉพาะในช่วงเวลาที่รามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว คือที่ชั่วโมงการหมัก 12-60 พบว่าในช่วงเวลานี้เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักจะมีค่าเพิ่มขึ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 12 และสูงกว่ากรณีไม่ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ถึง 39 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงการหมักที่ 60

ส่วนค่ากิจกรรมโปรติเอสในระหว่างการหมัก พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 12-60 แสดงว่า *A.oryzae* เจริญได้ดี และหลังจากชั่วโมงที่ 60 ค่ากิจกรรม

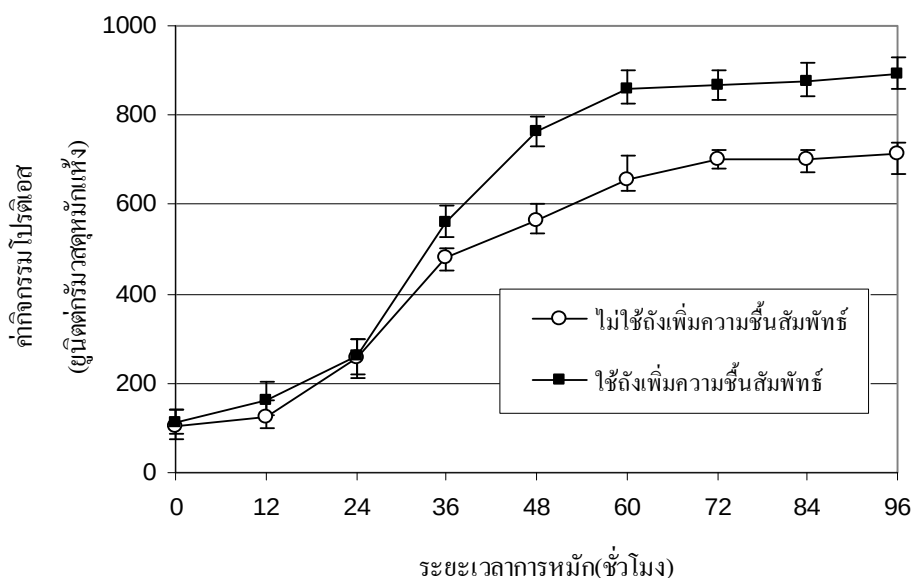


โปรตีนที่มีค่าคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในวัสดุหมัก ค่ากิจกรรมโปรตีนสูงสุดในช่วงเวลาที่ 96 เท่ากับ 893.93 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ซึ่งลักษณะกราฟจะคล้ายคลึงกับกรณีไม่ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ดังภาพที่ 23

จากการทดลองนี้พบว่าการใช้ถังเพิ่มความชื้นจะเป็นการช่วยลดอุณหภูมิของวัสดุหมักและการเพิ่มความชื้นของวัสดุหมักไปด้วย พร้อมทั้งทำให้ค่ากิจกรรมโปรตีนของรา *A.oryzae* ดีขึ้นกว่า กรณีไม่ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 25.28 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไปจึงจะใช้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์แล้วทุกการทดลอง



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักกรณีไม่ใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์กับกรณีใช้ถังเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ที่ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที



ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักกรณีไม่ใช้ถังเพิ่มความขึ้นสัมพัทธ์กับกรณีใช้ถังเพิ่มความขึ้นสัมพัทธ์ที่ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที

## 2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบดพบว่าความเร็วลมภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที และการใช้เครื่องเพิ่มความขึ้นสัมพัทธ์จะช่วยให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ โดยการใช้ถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น โดยศึกษาตัวแปรที่ส่งผลต่อการผลิตปริมาณเอนไซม์ดังนี้คือ ลักษณะการวางของเบดล่างและเบดบน และผลของความหนาของวัสดุหมักในเบดล่างและเบดบน

### 2.1 ศึกษาการจัดวางตำแหน่งเบดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

2.1.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นโดยกำหนดให้ตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กที่บิดอยู่ใต้ตะแกรงเบดเป็นเบดบน

ในการทดลองนี้ทำการจัดวางตะแกรงเบดโดยกำหนดให้ตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กที่บิดอยู่ใต้ตะแกรงเบดเป็นเบดบนและเบดที่มีท่อกลวงตรงกลางเบดเป็นเบดล่าง ปรึความหนาของวัสดุหมักทั้งสองเบดเท่ากับ 10 เซนติเมตร

การศึกษาตัวแปรทั้งอุณหภูมิของวัสดุหมัก เปอร์เซ็นต์ความชื้น และค่ากิจกรรมโปรติเอสที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลา ในการหมักแบบสองชั้นของการทดลองที่ 2.1.1 นี้ มีแนวโน้มคล้ายกับการศึกษาในถังหมักแบบชั้นเดียว ดังนั้นการจะมีข้อแตกต่างกันเพียงค่าของตัวแปรเท่านั้นแต่ลักษณะเส้นกราฟยังคงคล้ายกันกับการทดลองแบบชั้นเดียว

จากการศึกษาอุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดล่างและเบดบนจะมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงการหมักที่ 0-12 มีค่าเท่ากับ 46.32 และ 45.54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากนั้น เมื่อมีการให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป มีผลทำให้อุณหภูมิของวัสดุหมัก ชั่วโมงการหมักที่ 24 ในเบดล่างมีค่าลดลงเหลือ 45.43 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดบนมีค่าลดลงเหลือ 43.43 องศาเซลเซียส หลังจากชั่วโมงการหมักที่ 24 เป็นต้นไป อุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดล่างจะสูงกว่าในเบดบนประมาณ 2-4 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง อุณหภูมิของวัสดุหมักมีค่าเท่ากับ 34.98 และ 33.55 องศาเซลเซียส

สาเหตุที่เมื่อให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 แล้วทำให้อุณหภูมิของเบดล่างลดลงน้อยกว่าเบดบน เนื่องจากอากาศซึ่งไหลจากช่องด้านล่างของถังหมักส่วนใหญ่เคลื่อนที่ผ่านท่อกลวงบริเวณเบดล่างในแนวตั้งจึงทำให้การกระจายอากาศไปสู่เบดล่างไม่เพียงพอ จึงระบายความร้อนของวัสดุหมักซึ่งกักตัวอยู่ในเบดได้ไม่ดี อุณหภูมิของวัสดุหมักจึงลดลงน้อย ส่วนเบดบนนั้นอากาศที่ผ่านท่อกลวงของเบดล่างจะไปปะทะกับแผ่นเหล็กที่บิดอยู่ด้านล่างของเบดบน อากาศจึงมีการเปลี่ยนทิศทางเป็นแนวนอน แล้วอากาศนี้จะไหลไปปะทะกับด้านข้างถังหมัก ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำล้าอัดด้านข้างระหว่างเบดกับผนังถังหมักเพื่อช่วยป้องกันไม่ให้อากาศที่ปะทะกับด้านข้างแล้วเคลื่อนที่ไหลกลับลงไปที่ก้นถังและเบดบน จึงทำให้อากาศไหลผ่านเบดบนได้ดีกว่าเบดล่าง อุณหภูมิของเบดบนจึงน้อยกว่า พบว่าการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยทางด้านแบบจำลองและพลศาสตร์ของไหลของพิชณัฐ (2549)

ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักรา *A. oryzae* ปริมาณความชื้นในแต่ละเบดจะลดลงตลอดการทดลอง โดยมีลักษณะคล้ายกับการหมัก

แบบชั้นเดียว แต่เนื่องจากการที่อากาศไหลผ่านเบดล่างได้น้อยกว่าเบดบน จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นในวัสดุหมักมีมากกว่า คือเมื่อสิ้นสุดการหมักเบดล่างและเบดบน มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักเท่ากับ 31.20 และ 24.76 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก

และการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรติเอสต่อระยะเวลา พบว่ามีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 630.66 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 84 ส่วนเบดล่างนั้นค่ากิจกรรมโปรติเอสจะเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 72 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 384.59 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งและลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก สาเหตุที่ค่ากิจกรรมโปรติเอสของเบดล่างมีค่าน้อยกว่าเบดบนเพราะเบดล่างได้รับอากาศถ่ายเทน้อยกว่าทำให้อากาศที่ไหลเข้าไปไม่ผ่านไปยังวัสดุหมักที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้อุณหภูมิเบดล่างสูง ราวบางส่วนถูกความร้อนทำลายเส้นใย จึงมีผลให้ราผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาน้อยตามไปด้วย

2.1.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นโดยกำหนดให้ตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กทึบติดอยู่ใต้ตะแกรงเบดเป็นเบดล่าง

การทดลองนี้ทำการจัดวางตะแกรงเบดโดยกำหนดให้ตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กทึบติดอยู่ใต้ตะแกรงเบดเป็นเบดล่าง และเบดที่มีท่อกลวงตรงกลางเบดเป็นเบดบน ปรับความหนาของวัสดุหมักทั้งสองเบดเท่ากับ 10 เซนติเมตร

ผลการศึกษาตัวแปรทั้งอุณหภูมิของวัสดุหมัก เปอร์เซ็นต์ความชื้น และค่ากิจกรรมโปรติเอสที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลา ในการหมักแบบสองชั้นในข้อที่ 2.1.2 นี้ มีแนวโน้มคล้ายกับการศึกษาในถังหมักแบบชั้นเดียว ดังนั้นการจะมีข้อแตกต่างกันเพียงค่าของตัวแปรเท่านั้น แต่ลักษณะเส้นกราฟยังคงคล้ายกันกับการหมักแบบชั้นเดียว

ผลของอุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดล่างและเบดบนจะมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจากชั่วโมงการหมักที่ 0-12 มีค่าเท่ากับ 46.86 และ 46.75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อมีการให้อากาศที่ชั่วโมงที่ 12 ทำให้อุณหภูมิเบดล่างลดลงเหลือ 42.96 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดบนลดลงเหลือ 43.98 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงการหมักที่ 24 นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากชั่วโมงการหมักที่ 24 เป็นต้นไป อุณหภูมิของวัสดุหมักทั้งสองเบด

จะใกล้เคียงกันทุกชั่วโมงการหมัก เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมง พบว่าวัสดุหมักมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเหลือ 32.5 และ 32.97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

สาเหตุที่เบดล่างและเบดบนมีค่าอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากเบดล่างเป็นเบดที่มีแผ่นเหล็กที่ช่วยกระจายลมทำให้อากาศไหลผ่านเข้ามาจากท่อด้านล่างถึงหมัก ส่งผ่านไปถึงวัสดุหมักที่อยู่ในเบดแล้วพาความร้อนออกไป ส่วนเบดบนนั้นแม้จะได้รับอากาศจากทางด้านล่างน้อยกว่าแต่อยู่ใกล้กับเครื่องดูดอากาศทำให้อากาศดึงความร้อนออกไปได้เช่นกัน

ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในวัสดุหมักที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักรา *A. oryzae* ปริมาณความชื้นในแต่ละเบดจะลดลงตลอดการทดลอง และเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุในการทดลองนี้ใกล้เคียงกับทุกชั่วโมงของการหมัก เมื่อสิ้นสุดการหมักเบดล่างและเบดบนมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 23.45 และ 24.65 เปอร์เซ็นต์

ส่วนค่าการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรตีนต่อระยะเวลา พบว่าการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีนของวัสดุหมักทั้งสองเบดมีลักษณะแนวโน้มคล้ายคลึงกัน โดยที่เบดล่างมีค่ากิจกรรมโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 680.83 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 84 ส่วนเบดบนนั้นมีค่ากิจกรรมโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 620.54 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักเดียวกัน ซึ่งเบดทั้งสองมีค่ากิจกรรมโปรตีนใกล้เคียงกัน

ผลจากการทดลอง 2.1 ทั้งสองหัวข้อคือ 2.1.1 และ 2.1.2 สามารถสรุปได้ว่าการผลิตเอนไซม์โปรตีนแบบสองชั้นโดยใช้วัสดุหมักหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตรทั้งสองเบด การจัดวางตำแหน่งเบดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีน คือ การจัดวางแบบข้อ 2.1.2 โดยกำหนดให้เบดล่างคือตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กที่อยู่ใต้ตะแกรงเบด และให้เบดล่างคือเบดที่มีท่อกลวงอยู่ตรงกลางตะแกรงเบด ซึ่งการจัดวางเบดแบบนี้ มีผลทำให้ค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักทั้งสองเบดมีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผลของค่ากิจกรรมโปรตีนของแต่ละเบดในการจัดวางที่เหมาะสมนี้ยังมีย่านน้อยกว่าการผลิตในถังหมักแบบชั้นเดียวอยู่ประมาณ 230 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

## 2.2 ศึกษาผลความหนาของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสถึงแพคเบดแบบสองชั้น

จากการทดลองที่ 2.1 พบว่าหากใช้ความสูงของวัสดุหมักเบดล่างและเบดบนเท่ากับ 10 เซนติเมตรทั้งสองเบด ค่ากิจกรรมโปรติเอสลดลงจากการทดลองในถังแพคเบดแบบชั้นเดียวที่ความหนาของวัสดุหมักเท่ากัน ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสจึงศึกษาถึงผลของความหนาของชั้นวัสดุหมัก โดยลดความหนาของวัสดุหมักเบดบนลงครึ่งเท่าของความหนาวัสดุหมักเดิมและเปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้ความหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตรทั้งสองเบด ศึกษาผลของตัวแปรได้แก่ การเจริญของรา *A.oryzae* อุณหภูมิของวัสดุหมัก เปอร์เซ็นต์ความชื้น และค่ากิจกรรมโปรติเอส

จากภาพที่ 24 พบว่าในการทดลองที่ใช้ความหนาของเบดล่างเท่ากับ 10 เซนติเมตร และเบดบน 5 เซนติเมตร ลักษณะเส้นใยและสีของสปอร์เหมือนกับทดลองในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว แต่การเจริญของราในเบดล่างซึ่งมีวัสดุหมักของความหนา 10 เซนติเมตร รางจะเจริญได้ดีเฉพาะส่วนล่างของเบดเท่านั้น เช่นเดียวการใช้วัสดุหมักหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตร ทั้งสองเบดในการทดลองที่ 2.1 โดยจะสังเกตเห็นสปอร์สีเขียวด้านล่างของขอบเบดดังภาพที่ 27ก ส่วนในเบดบนซึ่งหนา 5 เซนติเมตรราส่วนใหญ่จะเจริญได้ดี จะเห็นเส้นใยและสปอร์ราครอบคลุมทุกส่วนของวัสดุหมัก ดังภาพที่ 27ข



(ก)



(ข)

ภาพที่ 24 การเจริญของรา *A.oryzae* ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบสองชั้น ก) วัสดุหมักในเบดล่างที่มีความหนา 10 เซนติเมตร ข) วัสดุหมักในเบดบนที่มีความหนา 5 เซนติเมตร

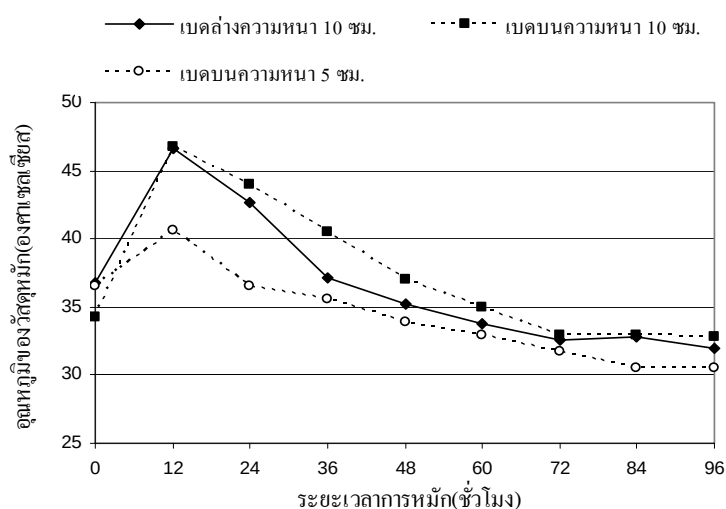
ผลของอุณหภูมิจากการทดลองที่ใช้ความหนาของเบดล่างเท่ากับ 10 เซนติเมตร และเบดบน 5 เซนติเมตร พบว่าอุณหภูมิของวัสดุหมักที่ความหนาเบดล่างสูงสุดที่ชั่วโมงการหมักที่ 12 มีค่าเท่ากับ 46.64 องศาเซลเซียส ส่วนเบดบนมีอุณหภูมิสูงสุดเท่ากับ 40.65 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงเดียวกัน เมื่อให้อากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป อุณหภูมิของเบดทั้งสองจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 96 เบดล่างมีอุณหภูมิเท่ากับ 31.97 องศาเซลเซียส ส่วนเบดบนมีค่าเท่ากับ 30.56 องศาเซลเซียส หากเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของเบดบนที่ใช้ความหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตร จากการทดลอง 2.1.2 พบว่าอุณหภูมิของวัสดุหมักเบดบนทั้งสองการทดลองมีค่าความแตกต่างลักษณะเดียวกับความแตกต่างของอุณหภูมิเบดล่างกับเบดบนของการทดลองนี้ ดังภาพที่ 25

ผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักที่ใช้ความหนาของเบดล่างเท่ากับ 10 เซนติเมตร และเบดบน 5 เซนติเมตร พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักเบดบนมีค่าเท่ากับ 44.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงถึงประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์จากความชื้นเริ่มต้น ส่วนเบดล่างมีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 46.65 เปอร์เซ็นต์ลดลง 6 เปอร์เซ็นต์จากความชื้นเริ่มต้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของทั้งเบดบนและเบดล่างมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 26.54 และ 22.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลของเบดล่างมีค่าใกล้เคียงกับการหมักโดยใช้ความหนาเท่ากับ 10 เซนติเมตร ทั้งสองเบดในการทดลองที่ 2.1.2 ส่วนเบดบนเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ชั่วโมงการหมัก 96 มีค่าแตกต่างกันประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์

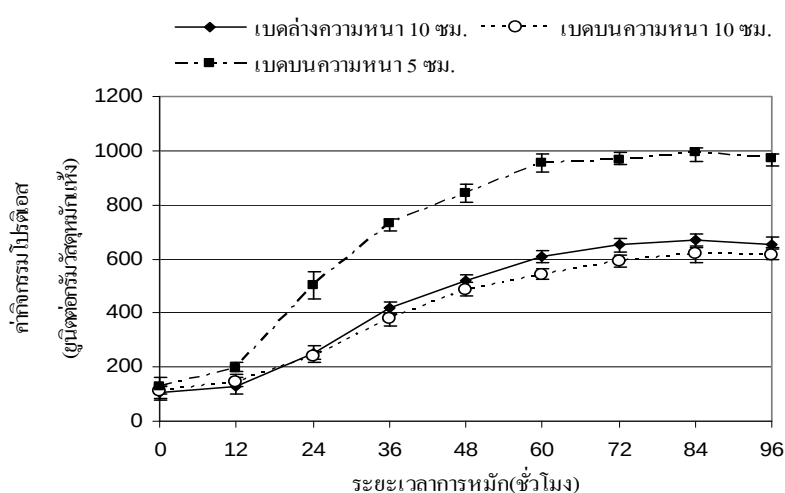
จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อลดความหนาที่เบดบนจาก 10 เซนติเมตรเป็น 5 เซนติเมตร โดยมีการให้อากาศผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์อัตรา 0.1 เมตรต่อวินาทีเท่ากัน วัสดุหมักที่มีความหนา 10 เซนติเมตร จะมีการสะสมความร้อนและมีอุณหภูมิสูงกว่าวัสดุหมักที่มีความหนา 5 เซนติเมตร เนื่องจากวัสดุหนามากขึ้น จะทำให้วัสดุมีการอัดตัวแน่นมากขึ้นทำให้อากาศไหลผ่านได้ไม่ดี ทำให้ความร้อนจากการเมตาบอลิซึมของราถ่ายเทออกไปได้ยากกว่าการใช้วัสดุหมักที่บางกว่า และวัสดุหมักที่บางกว่านั้นมีข้อดีคือจะทำให้สามารถผลิตต้นเชื้อในปริมาณน้อยกว่าทั้งนี้ยังสิ้นเปลืองพลังงานและต้นทุนการผลิต ในทางกลับกันการที่วัสดุบางกว่า อาจมีผลให้สูญเสียความชื้นในวัสดุหมักได้ง่ายกว่าวัสดุที่หนา

ส่วนผลของค่ากิจกรรมโปรติเอสจากการทดลองที่ใช้ความหนาของเบดล่างเท่ากับ 10 เซนติเมตร และเบดบน 5 เซนติเมตร พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสของเบดล่างมีค่าสูงสุดเท่ากับ

664.96 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และเบคบนมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 990.84 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 84 ซึ่งมากกว่าเบคล่างถึง 49 เปอร์เซ็นต์ และหากเปรียบเทียบผลค่ากิจกรรมโปรติเอสของการทดลอง 2.1.2 พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสของเบคล่างจะใกล้เคียงกันแต่ค่ากิจกรรมโปรติเอสของเบคบนต่างกับการทดลองนี้เท่ากับ 370.30 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นที่ความหนา 10 และ 5 เซนติเมตร



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นที่ความหนา 10 และ 5 เซนติเมตร



### 3. การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรติเอส จากการผลิตโดยใช้ถังหมักแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น

จากการทดลองทดลองที่ 1 และ 2 นำผลการทดลองทั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้นเฉพาะที่ได้ค่าสูงสุด ในสภาวะที่มีการให้อากาศซึ่งผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์มาเปรียบเทียบกัน โดยแสดงผลเป็นร้อยละผลได้ (percentage yield) ของค่ากิจกรรมโปรติเอส มีการกำหนดให้ผลงานในระดับห้องปฏิบัติการของ Chutmanop *et al.*, (2008) เป็นค่าควบคุมคิดเป็นค่าร้อยละผลได้เท่ากับ 100 เนื่องจากในการทดลองของ Chutmanop *et al.*, (2008) นั้น มีการใช้วัสดุหมัก ต้นเชื้อ *A.oryzae* แหล่งคาร์บอนซึ่งคือแป้งสาลี เช่นเดียวกับการทดลองในถังหมักแบบนี้ พร้อมทั้งมีการควบคุมอุณหภูมิที่ดีในตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการหมัก มีการใช้วัสดุหมักที่น้อย มีปริมาณวัสดุหมักเท่ากับ 20 กรัมเท่านั้น ทำให้ราเจริญได้ดี ส่งผลให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสในระดับห้องปฏิบัติการมีค่าสูงมากถึง 1200.00 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

จากตารางที่ 7 พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบชั้นเดียวได้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 893.93 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง เมื่อใช้วัสดุหมัก 2 กิโลกรัมความหนาวัสดุหมัก 10 เซนติเมตร คิดเทียบเป็นร้อยละผลได้เท่ากับ 74.50 ส่วนการผลิตเอนไซม์ด้วยถังหมักแบบสองชั้นใช้วัสดุหมัก 3 กิโลกรัม โดยเป็นเบดล่าง 2 กิโลกรัม ความหนาวัสดุหมัก 10 เซนติเมตร และเบดบน 1 กิโลกรัม หนา 5 เซนติเมตร เบดล่างให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 664.96 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และเบดบนให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 990.84 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละผลได้มีค่าเท่ากับ 55.41 และ 82.50 ตามลำดับ

หากเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของการหมักทั้งสองแบบที่สภาวะการให้อากาศผ่านเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เหมือนกัน ปริมาณวัสดุหมัก 2 กิโลกรัมเท่ากัน คือการหมักในแบบชั้นเดียวและเบดล่างของการหมักแบบสองชั้น พบว่าร้อยละผลได้ของการหมักแบบชั้นเดียวมีค่ามากกว่า แต่สำหรับการหมักแบบสองชั้นนั้นสามารถเพิ่มจำนวนเบดเป็นสองชั้นได้ โดยใช้วัสดุหมักเบดบน 1 กิโลกรัม ใช้สภาวะเหมือนกับที่ทำการทดลองในแบบชั้นเดียว พบว่าเบดบนของการหมักสองชั้นมีค่าร้อยละผลได้มากกว่าการหมักแบบการหมักแบบชั้นเดียว

จะเห็นว่าการผลิตแบบสองชั้นนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ครั้งละจำนวนมาก ได้ร้อยละผลได้ดีเทียบเท่าการผลิตในชั้นเดียว และมีข้อดี คือสามารถสกัดเอนไซม์ได้ครั้งละมากๆ เนื่องจากมีลักษณะเป็นชั้นๆ เป็นการประหยัดตัวสกัดเอนไซม์ ต้นทุน และพื้นที่ต่อการหมักหนึ่งครั้ง

ดังนั้นถือว่าการผลิตในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นให้ผลผลิตทางด้านปริมาณเอนไซม์สูง และเป็นการลดต้นทุนของการผลิตอีกด้วย

**ตารางที่ 7** ผลการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว และสองชั้น

| รูปแบบการผลิต                                                                                     | ปริมาณการผลิต<br>(กรัม) | ค่ากิจกรรมโปรติเอส<br>(ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก<br>แห้ง) | ร้อยละผลได้ |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| ระดับห้องปฏิบัติการ <sup>1</sup><br>(ควบคุมอุณหภูมิในตู้บ่ม<br>ที่ 30 องศาเซลเซียส)               | 20                      | 1200.00                                               | 100         |
| แพคเบดแบบชั้นเดียว<br>(ให้อากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้น<br>สัมพัทธ์ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที) | 2000                    | 893.93                                                | 74.50       |
| แพคเบดแบบสองชั้น                                                                                  |                         |                                                       |             |
| เบดล่าง                                                                                           | 2000                    | 664.96                                                | 55.41       |
| เบดบน                                                                                             | 1000                    | 990.84                                                | 82.50       |
| (ให้อากาศที่ผ่านเครื่องเพิ่มความชื้น<br>สัมพัทธ์ความเร็ว 0.1 เมตรต่อวินาที)                       |                         |                                                       |             |

ที่มา: <sup>1</sup> Chutmanop *et al.*, (2008)

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ปฏิบัติการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวและสองชั้น โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสามส่วนคือ การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบสองชั้น และการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรติเอส จากการผลิตโดยใช้ถังแพคเบดแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น

#### 1. การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดแบบชั้นเดียว

1.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสกรณีไม่มีการเติมอากาศในถังหมักแบบชั้นเดียว พบว่าเกิดความร้อนสะสมของวัสดุหมัก อุณหภูมิของวัสดุหมักจึงค่อยๆ สูงขึ้นและสูงสุดที่ 53.9 องศาเซลเซียสในชั่วโมงที่ 24 และจะมักเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เสมอ ค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าเท่ากับ 293.3 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

1.2 ผลการหาความเร็วที่เหมาะสมของอากาศภายในถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียวคือ 0.1 เมตรต่อวินาที ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงสิ้นสุดการหมัก มีผลทำให้อุณหภูมิของวัสดุหมัก ในชั่วโมงที่ 24 ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับมีค่าเท่ากับ 713.50 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 96 ซึ่งมากกว่ากรณีไม่มีการเติมอากาศถึง 2.43 เท่า

1.3 การทดลองใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มความชื้นของอากาศก่อนส่งเข้าถังหมักด้วยความเร็วภายในถัง 0.1 เมตรต่อวินาที พบว่ามีผลให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าเท่ากับ 893.93 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 96 เพิ่มขึ้นถึง 25 เปอร์เซ็นต์หากเปรียบเทียบกับกรณีไม่มีการใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์

## 2. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น

2.1 ศึกษาการจัดวางตำแหน่งของเบดที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการกำหนดให้เบดล่างคือตะแกรงเบดที่มีแผ่นเหล็กติดอยู่ด้านล่างและเบดบนคือตะแกรงเบดที่มีช่องกลวงตรงกลางเบด เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

2.2 ผลของการหาความหนาในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเบดล่าง 10 และเบดล่าง 5 เซนติเมตร โดยเบดล่างมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 664.96 และเบดบนมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 990.84 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 84

## 3. การเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์โปรติเอส จากการผลิตโดยใช้ถังแพคเบดแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแพคเบดแบบสองชั้นให้ผลผลิตทางด้านปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสูงเทียบเท่ากับการหมักแบบชั้นเดียว และยังให้ผลดีทางด้านประหยัดพื้นที่และต้นทุนการผลิตอีกด้วย

### ข้อเสนอแนะ

1. การหมักในถังหมักแบบแพคเบดมักพบปัญหาในการระบายความร้อน ซึ่งแก้ปัญหาโดยให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นระบายความร้อนในถังแพคเบด แต่ก็ยังทำให้ความชื้นของวัสดุหมักลดลงแม้ว่าอากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงก็ตาม ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของรา อาจจะมีผลจากการส่งผ่านอากาศที่ผ่านความชื้นไปยังถังหมักที่มีระยะทางไกลเกินไป ทำให้ได้อากาศชื้นมีประโยชน์น้อยลง

2. เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมัก ในการลดอุณหภูมิของวัสดุหมักในเบดควรมีระบบควบคุมอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ให้มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเบดซึ่งจะช่วยให้ความชื้นสัมพัทธ์รอบเบดที่อุณหภูมิสูงมีความชื้นสัมพัทธ์สูงตามไปด้วย

3. การผลิตเอนไซม์ในถังเพาะแบบสองชั้นต้องระมัดระวังในเรื่องการอัดลำลีด้านข้าง ถังหมักหรือควรมีการปิดท่อกวางเพื่อให้อากาศไหลผ่านเข้าสู่เบดมากที่สุด

4. การใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ต้องใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนเท่านั้น รวมถึงต้องทำความสะอาดถังหมัก ถังพลาสติก เครื่องสูบน้ำ เป็นอย่างดีเพราะจะเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2545. อากาศบ้านเรา. แหล่งที่มา: [http://www.tmd.go.th/knowledge/book\\_weather\\_06.html](http://www.tmd.go.th/knowledge/book_weather_06.html), 7 กันยายน 2548.

จรัญ ฉัตรมานพ. 2548. การหมักกากมันสำปะหลังโดยใช้ถังหมักเพคเบคแนวใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฬารัตน์ ครองแถว. 2547. การผลิตต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* โดยวิธีการหมักแบบแห้งในถังเพคเบค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากมันสำปะหลังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรวัช ปานบัว และ ภาสนันท์ วงศ์เหลือง. 2548. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย *Aspergillus oryzae* โดยการหมักแบบแห้ง. โครงการปริญญาตรี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นพดล เขียมสวัสดิ์. 2532. เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ. ใน การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องเฟอร์เมนเทชันเทคโนโลยี. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

ประสงค์ คุณานุวัฒน์ชัยเดช และคณะ. 2526. ตำราชีวเคมี เล่ม 1. โครงการตำรากองทุนมหิดลมูลนิธิคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พงษ์ประวัติ พิมพการัง. 2546. การควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติแบบคำนวณตัวแปรในถังเพคเบค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิบูลย์ มงคลสุข. 2541. เชื้อราวิทยา. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

- ไพไลพรรณ พงษ์พล. 2525. ราวทยาเบื้องต้น. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- พีชนัฐ พานิช. 2550. การคำนวณพลศาสตร์ของของไหลในถังหมักสองชั้นแบบแพคเบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2548. การพัฒนาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการหมักแบบแห้งในระดับอุตสาหกรรมด้วยถังแพคเบด. ใน การรายงานความก้าวหน้าของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- มณีนรัตน์ ดิรนนทกุล. 2542. การศึกษาทดลองหมักถั่วเหลืองแบบอาหารแห้งในระบบแพคเบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เรืองลักษณ์ จามิกรณ์. 2545. ชีวเคมี 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.
- วรารุณี ครุส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- วรารุณี ครุส่ง และกรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วรัญญู เสมรสุต. 2549. การพัฒนาเครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์สำหรับการหมักแบบแห้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุนทร ปิติเจริญพันธ์. 2549. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุนันทา ภิญญาวัฒน์. 2544. ชีวเคมี 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

สุนันทา ภัฏญวรัตน์. 2547. **ชีวเคมี 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ.

สุภาภรณ์ พิศพันธ์. 2545. การสร้างแบบจำลองการผลิตเอนไซม์และการจำลองระบบการหมักด้วย  
เครื่องในถังชีวภาพแบบแพคเบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โสพล สุวรรณยืน. 2532 . การออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ. ใน งานการอบรมเชิงปฏิบัติการ  
เรื่องเฟอร์เมนเทชันเทคโนโลยี. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอม  
เกล้าธนบุรี.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2540. **ข้าวสาลี: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรุณี อภิชาติสร่างกูร. 2530. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารทั่วไป**. สำนักพิมพ์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Aikat, K. and B.C. Bhattacharyya. 2001. Protease Production in solid state fermentation with  
liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in packed bed reactor by a local  
strain of *Rhizopus oryzae*. **Proc. Biochem.** 36: 1059-1068.

Amissah, J.G.N., W.O. Ellis, I.O Duro and J.T. Manful. 2003. Nutrient composition of bran  
from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control.** 14: 21-24.

Armstrong Humidification Group. 2005a. **Basic Application Principles**. Available Source:  
<http://www.armstrong-intl.com/common/hvacsource/basicprinciples.pdf>, August  
7, 2005.

Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1984. **Official Method of Analysis**.  
14<sup>th</sup> ed. George Banton Co., Ltd., Washington, D.C. 1080.



Barron, J. 2006. Proteolytic enzymes. **A Patent Pending Proteolytic Enzyme Formula.**

Available Source:

<http://www.jonbarron.org/baseline-health-program/08-26-2006.php>, September 26, 2006.

Cannel, E. and M. Moo-Yong. 1980. **Solid-state fermentation system, Solid Substrate Cultivation**, Doelle, H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E.(Eds.), Elsevier Science Publishers Ltd., England. 1 – 146.

Carlsen, M., A.B. Spohr, J. Nielsen and J. Villadsen. 1996. Effect of Controlled Gas Environments in Solid state Fermentations of Rice. **Biotech. Bioeng.** 22: 2219-2235.

Chandran, S., S. Alagarsamy., S. George and P. Ashok. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Proc. Biochem.** 40: 2689-2694.

Chutmanop, J., S. Chuichulcherm, Y. Chisti and P. Srinophakun. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 83: 1012 - 1018

Ellen, M. S.V and Y. Shang-Tian. 1998. Production of Amylases from Rice by Solid-State Fermentation in a Gas-Solid Spouted-Bed Bioreactor. **Biotechnol. Prog.** 14: 580-587

Fan-Ching ,Y., and I.H. Lin. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 23: 397–402.

Francis, F., A.Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs and A. Pandey A. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochem. Eng. J.** 15: 107-115.

- Gerhardt, A . L and N. B. Gallo. 1998. Full-fat rice bran and oat bran similarly reduced hyperchole-sterolemia in humans. **J. Nutri.** 128. 865-869.
- Gervais, P. and P. Molin. 2003. The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 85-101.
- Ghildyal, N.P., M. Ramakrisna, B.K. Lonsane and N.G. Karanth. 1992. Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors: effect on yield and productivities. **Bioproc.Eng.** 8: 67-72.
- Ghildyal, N.P., M.K. Gowthaman, K.S.M.S. Raghava Rao and N.G. Karanth. 1994. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentation: Effect of temperature gradients. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 253-257.
- Hamidi-Esfahani, Z., A. Shojasadati and A. Rinzema . 2004. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 21: 265–272.
- Hesseltine, C.W. 1972. Solid-state fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 14: 517-532.
- Lonsane, B. K., N.P. Ghildyal, S. Budiartman and S.V. Ramakrishna. 1985. Engineering aspects of solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 7:258–265.
- Matsumoto, Y., G. Saucedo-Castaneda, S. Revah and K. Shirai. 2004. Production of b-N – acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. **Proc. Biochem.** 39: 665–71.
- Moo-Yong, M., A.R. Moreira and Tengerdý. 1983. **Principles of solid substrate fermentation, Solid Substrate Cultivation.** Elsevier Science Publishers. 1 – 46.

- Mudgett, R.E. 1986. **Solid Substrate Cultivation**. Elsevier Science Publishers. 1 – 146.
- Ogawa,A., A. Yasuhara, T. Tanaka, T. Sakiyama and K. Nakanishi. 1995. Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM2704. **J. Ferment. Bioeng.** 80: 35-40.
- Oriol, E., M. Rimbault, S. Roussos and G. Viniegra-Gonzales. 1988b. Water and water activity in the solidstate fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 27:498-503.
- Rahardjo, Y., SP, Jolink F., S Haemers , J. Tramper and A. Rinzema . 2005. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. **Biomol. Eng.** 22 : 133–139
- Ramachandran, S., A.K Patel, K.M. Nampoothiri, F. Francis, V. Nagy, G. Szakacs and A. Pandey. 2003. Coconut oil cake a potential raw material for the production of  $\alpha$ -amylase. **Biores.Technol.** 93:169-174.
- Rimbault, M., and D. Alazard. 1980. Culture Method to study Fungal Growth in Solid Fermentation. **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 9: 199 – 209.
- Rimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Elec. J. Biotechnol.** 3: 167-188.
- Pandey, A., P Selvakumar, C.R. Soccol and P. Nigam. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.** 771: 149–162.
- Rao M.B., A.M. Tanksale, M.S.Ghatge and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol.** 62: 597–635.

- Read, N.D. 1991. Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions. **Elect. Micros. Plant Patho.** (ed. by K. Mendgen & D.-E. Lesemann). 17-29.
- Sandhya .C., A. Sumantha, G. Szakacs and A. Pandey. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Proc. Biochem.** 40: 2689-2694.
- Sangsurasak P. and D.A. Mitchell. 1995. The investigation of transient multi dimensional heat transfer in solid-state fermentation. **Chem. Eng. J.** 60: 199-204.
- Saucedo-Castaneda, G., B.K. Lonsane, M.M. Krishnaiah, J.M. Navarro, S. Roussos and M. Raimbault. 1992. Maintenance of heat and Water Balance as a Scale-up Criterion for the Production of Ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a Solid-state fermentation System. **Proc. Biochem.** 27 : 97-107.
- Scheuer, P.J. 1990. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential . **Sci.** 248: 173-177
- Senez, J.C., M. Raimbault and F. Deschamps. 1980. Protein enrichment of starchy substrates for animal feeds by solid state fermentation. **W. Ani. Rev.** 35: 36-40.
- Shuler M.L. and F. Kargi . 2002 . **Bioprocess Engineering.** 2<sup>nd</sup> edition. Prentice-Hall, Inc. 553.
- Silman, R.W. 1980. Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 411-420.
- Villegas E., S. Aubague, L. Alcantara, R. Auria and S. Revah. 1993. Solid state fermentation: Acid protease production in controlled CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> environments. **Biotechnol. Adv.** 11 : 387-397.

- Wenqing, L., L. Defa, W. Yubo . 2003. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme Microb. Technol** 32: 305-311
- Zandrazil ,F., H. Brunert . 1981. Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 11:183– 8.

ภาคผนวก

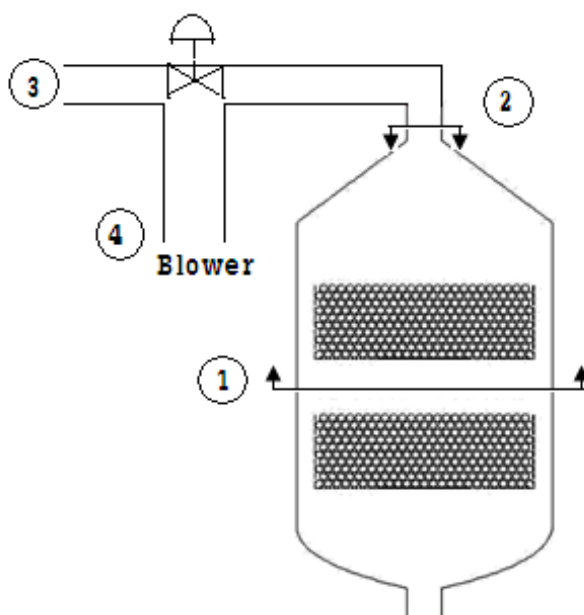
### ภาคผนวก ก

วิธีการคำนวณความเร็วลมในถังหมักแพคเบด

### วิธีการคำนวณความเร็วลมในถังหมัก

โดย  $A$  คือ พื้นที่หน้าตัด หน่วย เมตร

$V$  คือ ความเร็ว หน่วย เมตรต่อวินาที



ภาพผนวกที่ ก 1 ถังหมักชีวภาพแบบแพค

เมื่อกำหนดความเร็วอากาศภายในถังหมักแพคเบดที่ต้องการ เท่ากับ  $X$  เมตรต่อวินาที

จาก สูตร  $A_1 V_1 = A_2 V_2$

แทนค่า  $\pi R_1^2 V_1 = \pi R_2^2 V_2$

$$\pi (35/2)^2 X = \pi (4.5/2)^2 V_2$$

$$V_2 = Y \text{ เมตรต่อวินาที}$$



เมื่อทำการปิดวาล์ว  $V_3 = 0$  แล้ววัดความเร็วอากาศที่ตำแหน่งที่ 2 ได้เท่ากับ  $Z$  เมตรต่อวินาที ซึ่งเท่ากับความเร็วของพัดลมดูดอากาศ  $V_4$

$$V_3 = V_4 - V_2$$

$$V_3 = Z - Y$$

จากนั้นวัดความเร็วของอากาศที่ตำแหน่ง 3 ให้ได้  $V_3 = Z - Y$  เมตรต่อวินาที

### ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน และกราฟมาตรฐาน

## วิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

### การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์

#### 1 การสกัดเอนไซม์ (Fan-Chiang Yang and I.-Hsing Lin, 1998 )

##### 1.1 การเตรียมสารเคมีในการสกัดเอนไซม์

ก. สารละลาย 0.2 M acetic acid เตรียมโดยการผสมกรด  $\text{CH}_3\text{COOH}$  2.9 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลาย 0.2 M sodium acetate เตรียมโดยการละลาย  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1.65 กรัมหรือ  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  2.72 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 5.00 เตรียมโดยผสมสารละลาย 0.2 M acetic acid จำนวน 35.2 มิลลิลิตรกับสารละลาย 0.2 M sodium acetate จำนวน 14.8 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

##### 1.2 วิธีสกัดเอนไซม์

ก. ชั่งวัสดุหมักจำนวน 10 กรัมแห้ง (เมื่อวิเคราะห์ความชื้นได้จึงคำนวณกลับเป็นน้ำหนักแห้งได้) มาใส่ไว้ในพลาสติก

ข. เติมสารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 5.00 จำนวน 100 มิลลิลิตร และโทลูอีน (toluene) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ปิดปากพลาสติกด้วยกระดาษแล้วมัดปากพลาสติกด้วยยางให้เรียบร้อย ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการ

## วิเคราะห์ค่ากิจกรรมไอออนโปรตีน

### 1. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

ก. สารละลาย 0.1 N NaOH เตรียมโดยละลาย NaOH จำนวน 0.4 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลาย 0.1 N HCl เตรียมโดยการผสม HCl conc. (37 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 0.3 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลาย 0.2 M monobasic sodium phosphate เตรียมโดยละลาย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 3.12 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ง. สารละลาย 0.2 M dibasic sodium phosphate เตรียมโดยละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 3.56 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

จ. สารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.00 เตรียมโดยผสมสารละลาย 0.2 M monobasic sodium phosphate จำนวน 19.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย 0.2 M dibasic sodium phosphate จำนวน 30.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ฉ. สารละลายเคซีน (casein) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายเคซีนจำนวน 1.5 กรัมกับสารละลาย 0.1 N NaOH จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นพร้อมคนเบาๆ เพื่อให้เคซีนละลายจนหมด ปล่อยให้สารละลายเคซีนเย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.00 ด้วยสารละลาย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH จากนั้นเติมสารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.00 จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ช. สารละลาย 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) เตรียมโดยละลาย trichloroacetic acid จำนวน 6.54 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ซ. สารละลาย 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เตรียมโดยละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จำนวน 4.24 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ฉ. สารละลาย folin reagent เตรียมได้โดยผสมสารละลาย folin กับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปใช้ทันที

## 2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

ก. นำสารละลายเคซินที่เตรียมได้แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ข. ใส่น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ลงในหลอดทดลองที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ ใส่น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่สกัดออกจากวัสดุหมักที่ผ่านการหมักที่ ชั่วโมงต่างๆ จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์

ค. เติมสารละลายเคซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดอื่นๆ เติมสารละลายเคซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

ง. นาที่ที่ 10 เติมสารละลาย 0.4 M TCA ลงในหลอดที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 0.4 M TCA ลงในหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีเช่นกัน ตามลำดับ ตั้งหลอดทดลองทั้งหมดทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

จ. ดูดส่วนใสที่กรองได้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

ฉ. เติมสารละลาย 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ช. เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่กรองได้ของหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

ซ. นาที่ที่ 10 นำหลอดทดลองที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันที กด set blank ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีทันทีเช่นกัน ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

### 3. การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

ก. เตรียมสารละลาย L-tyrosine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย L-tyrosine จำนวน 0.2 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. ใส่น้ำกลั่นลงในหลอดทดลองด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 8

ค. เติมน้ำกลั่น 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

ง. เติมน้ำกลั่น folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 เพราะเป็นหลอดควบคุม (blank) ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมน้ำกลั่น folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

จ. นาที่ที่ 10 นำหลอดทดลองที่ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันที กด set blank ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีทันทีเช่นกัน ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6

ฉ. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาวาดกราฟมาตรฐาน ให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

ซ. จากกราฟมาตรฐานสามารถสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากวัสดุหมักที่ชั่วโมงต่างๆ จึงทราบค่ากิจกรรมโปรติเอสได้ ค่า

กิจกรรมโปรตีนกำหนดให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมโปรตีน หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้สาร L-tyrosine ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับ L-tyrosine 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

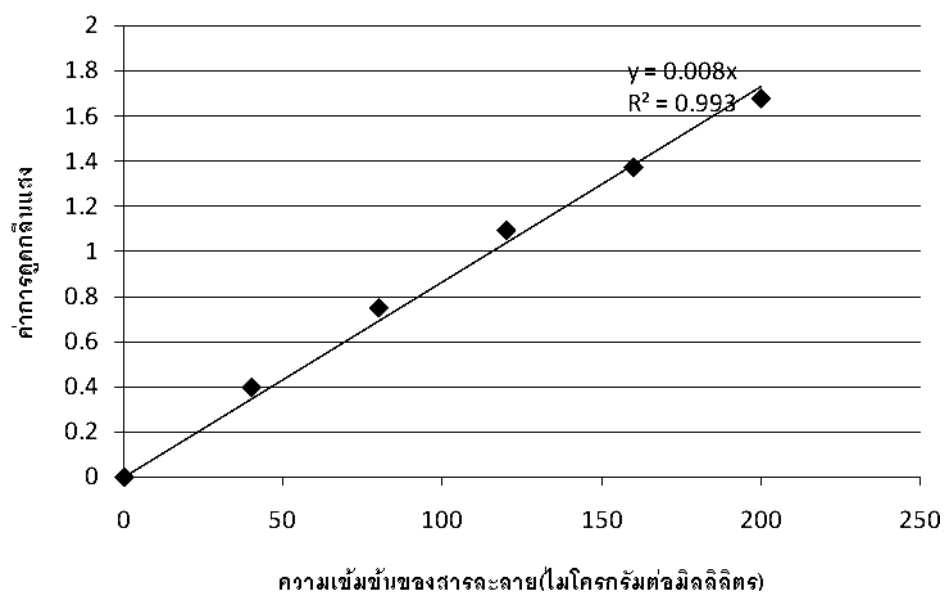
ตารางภาคผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้นต่างๆ

| หลอดที่ | ปริมาณสารละลาย L-tyrosine<br>(มิลลิลิตร) | ปริมาณน้ำกลั่น<br>(มิลลิลิตร) | ความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine<br>(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---------|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 1       | 0                                        | 1.0                           | 0                                                            |
| 2       | 0.2                                      | 0.8                           | 40                                                           |
| 3       | 0.4                                      | 0.6                           | 80                                                           |
| 4       | 0.6                                      | 0.4                           | 120                                                          |
| 5       | 0.8                                      | 0.2                           | 160                                                          |
| 6       | 1.0                                      | 0                             | 200                                                          |

กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

ตารางภาคผนวกที่ ข2 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

| ความเข้มข้น<br>(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสง |
|----------------------------------------|------------------|
| 0                                      | 0.000            |
| 40                                     | 0.396            |
| 80                                     | 0.749            |
| 120                                    | 1.092            |
| 160                                    | 1.370            |
| 200                                    | 1.675            |



ภาพภาคผนวกที่ ข1 ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน



**ภาคผนวก ค**

ตารางข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

### ตารางข้อมูลผลการทดลอง

**ตารางผนวกที่ ก1** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพลงเบด  
แบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1               | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 37.20                    | 35.11      | 36.71      | 36.34  |
| 12              | 48.49                    | 46.32      | 46.16      | 46.99  |
| 24              | 54.53                    | 52.98      | 54.13      | 53.88  |
| 36              | 49.85                    | 47.87      | 48.50      | 48.74  |
| 48              | 44.39                    | 43.13      | 43.67      | 43.73  |
| 60              | 45.13                    | 42.93      | 42.83      | 43.63  |
| 72              | 41.21                    | 39.16      | 38.31      | 39.56  |
| 84              | 41.48                    | 39.27      | 40.75      | 40.5   |
| 96              | 39.43                    | 37.88      | 38.01      | 38.44  |
| 108             | 40.15                    | 38.18      | 37.17      | 38.5   |
| 120             | 40.82                    | 38.77      | 40.05      | 39.88  |

**ตารางผนวกที่ ก2** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพลงเบด  
แบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ

| ระยะเวลาการหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|---------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 51.82                           | 49.34      | 50.549     | 50.57  |
| 12              | 51.00                           | 48.00      | 49.5       | 49.50  |
| 24              | 48.37                           | 45.53      | 47.25      | 47.05  |
| 36              | 44.77                           | 41.66      | 44.55      | 43.66  |
| 48              | 44.52                           | 42.39      | 43.29      | 43.40  |
| 60              | 42.01                           | 38.46      | 39.41      | 39.96  |
| 72              | 41.15                           | 38.02      | 39.78      | 39.65  |
| 84              | 40.62                           | 37.52      | 38.11      | 38.75  |
| 96              | 38.73                           | 35.50      | 37.04      | 37.09  |
| 108             | 39.23                           | 36.35      | 37.43      | 37.67  |
| 120             | 37.57                           | 35.01      | 35.78      | 36.12  |

**ตารางผนวกที่ ค3** ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
แบบเบดแบบชั้นเดียวโดยไม่มีการให้อากาศ

| ระยะเวลาการหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |        |
|-----------------|--------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 120.36             | 60.34      | 103.61     | 94.77  |
| 12              | 152.24             | 100.35     | 132.43     | 128.34 |
| 24              | 170.25             | 110.20     | 150.23     | 143.56 |
| 36              | 197.48             | 138.78     | 142.09     | 159.45 |
| 48              | 288.03             | 232.13     | 266.05     | 262.07 |
| 60              | 321.96             | 273.05     | 284.89     | 293.3  |
| 72              | 313.85             | 254.88     | 281.77     | 283.5  |
| 84              | 305.24             | 255.89     | 279.98     | 280.37 |
| 96              | 300.98             | 233.16     | 280.54     | 271.56 |
| 108             | 288.32             | 240.30     | 270.40     | 266.34 |
| 120             | 270.30             | 217.35     | 236.43     | 241.36 |

**ตารางผนวกที่ ค4** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแบบเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1               | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 37.40                    | 35.97      | 36.34      | 36.57  |
| 12              | 47.23                    | 44.17      | 48.61      | 46.67  |
| 24              | 46.54                    | 42.56      | 47.58      | 45.56  |
| 36              | 43.65                    | 41.71      | 41.99      | 42.45  |
| 48              | 38.34                    | 36.76      | 37.58      | 37.56  |
| 60              | 35.66                    | 33.85      | 35.19      | 34.9   |
| 72              | 34.73                    | 32.59      | 34.35      | 33.89  |
| 84              | 33.84                    | 32.63      | 33.70      | 33.39  |
| 96              | 34.88                    | 32.68      | 34.38      | 33.98  |
| 108             | 34.46                    | 32.81      | 33.44      | 33.57  |
| 120             | 34.26                    | 32.81      | 34.00      | 33.69  |

**ตารางผนวกที่ ค5** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
แพคเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|---------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 50.34                           | 49.96      | 50.00      | 50.1   |
| 12              | 50.23                           | 47.75      | 49.17      | 49.05  |
| 24              | 45.28                           | 42.26      | 45.24      | 44.26  |
| 36              | 39.47                           | 36.48      | 38.89      | 38.28  |
| 48              | 38.97                           | 33.39      | 36.81      | 36.39  |
| 60              | 34.94                           | 30.32      | 30.56      | 31.94  |
| 72              | 27.32                           | 23.70      | 25.18      | 25.4   |
| 84              | 24.96                           | 19.42      | 21.50      | 21.96  |
| 96              | 23.11                           | 19.49      | 20.73      | 21.11  |
| 108             | 20.12                           | 17.05      | 19.98      | 19.05  |
| 120             | 19.79                           | 16.55      | 18.41      | 18.25  |

**ตารางผนวกที่ ค6** ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
แพคเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.05 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอสของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|------------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 123.66                             | 60.97      | 93.32      | 92.65  |
| 12              | 134.95                             | 80.53      | 93.34      | 102.94 |
| 24              | 168.49                             | 120.79     | 129.58     | 139.62 |
| 36              | 302.15                             | 250.95     | 290.32     | 281.14 |
| 48              | 340.60                             | 278.48     | 309.78     | 309.62 |
| 60              | 452.94                             | 400.29     | 433.56     | 428.93 |
| 72              | 461.87                             | 420.39     | 440.32     | 440.86 |
| 84              | 461.54                             | 420.78     | 436.30     | 439.54 |
| 96              | 464.74                             | 420.25     | 440.23     | 441.74 |
| 108             | 455.32                             | 406.52     | 430.92     | 430.92 |
| 120             | 466.98                             | 406.48     | 434.48     | 435.98 |

**ตารางผนวกที่ ค7** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบด  
แบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1               | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 36.07                    | 34.97      | 35.82      | 35.62  |
| 12              | 47.05                    | 45.45      | 46.37      | 46.29  |
| 24              | 43.00                    | 40.54      | 42.94      | 42.16  |
| 36              | 39.87                    | 38.04      | 38.97      | 38.96  |
| 48              | 34.41                    | 32.90      | 34.24      | 33.85  |
| 60              | 34.18                    | 32.51      | 33.24      | 33.31  |
| 72              | 32.02                    | 30.55      | 31.09      | 31.22  |
| 84              | 31.97                    | 29.95      | 31.59      | 31.17  |
| 96              | 32.55                    | 31.55      | 31.60      | 31.90  |
| 108             | 32.04                    | 30.83      | 31.90      | 31.59  |
| 120             | 32.32                    | 30.74      | 31.26      | 31.44  |

**ตารางผนวกที่ ค8** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
แพคเบดแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|---------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 51.41                           | 50.14      | 49.17      | 50.24  |
| 12              | 48.75                           | 47.25      | 48.00      | 48     |
| 24              | 43.45                           | 40.63      | 42.04      | 42.04  |
| 36              | 40.51                           | 37.51      | 39.01      | 39.01  |
| 48              | 34.12                           | 29.02      | 31.57      | 31.57  |
| 60              | 30.15                           | 25.15      | 27.65      | 27.65  |
| 72              | 21.34                           | 16.74      | 18.44      | 18.84  |
| 84              | 16.23                           | 13.75      | 14.99      | 14.99  |
| 96              | 16.33                           | 13.07      | 14.70      | 14.7   |
| 108             | 14.97                           | 13.81      | 14.39      | 14.39  |
| 120             | 15.53                           | 13.81      | 14.67      | 14.67  |

**ตารางผนวกที่ ค9** ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
 แพคแบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอสของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|------------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 140.24                             | 75.34      | 100.47     | 105.35 |
| 12              | 160.88                             | 100.45     | 112.05     | 124.46 |
| 24              | 300.23                             | 220.44     | 253.81     | 258.16 |
| 36              | 503.60                             | 450.34     | 489.75     | 481.23 |
| 48              | 603.34                             | 536.34     | 559.13     | 566.27 |
| 60              | 710.90                             | 630.36     | 620.89     | 654.05 |
| 72              | 720.34                             | 678.60     | 700.85     | 699.93 |
| 84              | 720.34                             | 670.88     | 716.61     | 702.61 |
| 96              | 738.30                             | 668.43     | 733.77     | 713.5  |
| 108             | 713.99                             | 662.40     | 694.33     | 690.24 |
| 120             | 690.93                             | 653.34     | 660.33     | 668.2  |

**ตารางผนวกที่ ค10** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคแบบ  
 แบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1               | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 37.07                    | 35.97      | 36.67      | 36.57  |
| 12              | 46.96                    | 45.69      | 47.03      | 46.56  |
| 24              | 40.30                    | 38.91      | 39.47      | 39.56  |
| 36              | 36.99                    | 35.65      | 36.71      | 36.45  |
| 48              | 32.89                    | 31.91      | 32.88      | 32.56  |
| 60              | 31.50                    | 29.69      | 31.51      | 30.9   |
| 72              | 30.59                    | 29.12      | 29.96      | 29.89  |
| 84              | 30.12                    | 28.59      | 29.46      | 29.39  |
| 96              | 30.14                    | 28.72      | 29.58      | 29.48  |
| 108             | 30.21                    | 29.12      | 29.68      | 29.67  |
| 120             | 31.11                    | 28.81      | 28.85      | 29.59  |

**ตารางผนวกที่ ค11** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
 แพคแบบเบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|---------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 51.02                           | 50.59      | 50.67      | 50.76  |
| 12              | 48.34                           | 45.34      | 48.34      | 47.34  |
| 24              | 36.47                           | 32.73      | 33.40      | 34.2   |
| 36              | 34.57                           | 26.69      | 30.45      | 30.57  |
| 48              | 26.64                           | 19.50      | 21.57      | 22.57  |
| 60              | 17.07                           | 13.36      | 15.35      | 15.26  |
| 72              | 14.67                           | 11.73      | 13.98      | 13.46  |
| 84              | 11.95                           | 10.85      | 11.55      | 11.45  |
| 96              | 11.82                           | 11.22      | 11.37      | 11.47  |
| 108             | 12.03                           | 8.28       | 11.34      | 10.55  |
| 120             | 11.72                           | 8.53       | 11.34      | 10.53  |

**ตารางผนวกที่ ค12** ค่ากิจกรรมโปรติเอสของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมัก  
 แพคแบบเบบชั้นเดียว ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.15 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอสของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|------------------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1                         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 124.65                             | 72.14      | 113.26     | 103.35 |
| 12              | 128.44                             | 80.32      | 104.56     | 104.44 |
| 24              | 198.38                             | 135.99     | 176.77     | 170.38 |
| 36              | 290.24                             | 220.39     | 240.09     | 250.24 |
| 48              | 302.88                             | 260.77     | 278.99     | 280.88 |
| 60              | 400.95                             | 343.23     | 367.17     | 370.45 |
| 72              | 432.23                             | 368.48     | 399.98     | 400.23 |
| 84              | 469.22                             | 406.90     | 430.80     | 435.64 |
| 96              | 440.23                             | 387.70     | 432.76     | 420.23 |
| 108             | 462.67                             | 408.60     | 426.74     | 432.67 |
| 120             | 440.97                             | 390.71     | 434.23     | 421.97 |

**ตารางผนวกที่ ค13** อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของชั้นวัสดุหมัก |            |            |        |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1               | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 36.07                    | 34.92      | 35.72      | 35.57  |
| 12              | 47.26                    | 46.16      | 47.07      | 46.83  |
| 24              | 38.95                    | 37.76      | 37.92      | 38.21  |
| 36              | 37.24                    | 35.90      | 36.06      | 36.4   |
| 48              | 33.12                    | 31.87      | 32.57      | 32.52  |
| 60              | 31.46                    | 30.17      | 30.80      | 30.81  |
| 72              | 30.16                    | 28.76      | 29.34      | 29.42  |
| 84              | 29.88                    | 28.59      | 29.19      | 29.22  |
| 96              | 29.77                    | 28.33      | 28.99      | 29.03  |
| 108             | 29.26                    | 27.98      | 28.32      | 28.52  |
| 120             | 29.42                    | 28.12      | 28.92      | 28.82  |

**ตารางผนวกที่ ค14** เปอร์เซ็นต์ความชื้นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้น |            |            |        |
|-----------------|---------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1          | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 50.32               | 49.56      | 50.21      | 50.03  |
| 12              | 50.23               | 48.23      | 47.56      | 48.67  |
| 24              | 47.44               | 44.72      | 46.08      | 46.08  |
| 36              | 46.21               | 44.11      | 44.01      | 44.78  |
| 48              | 41.36               | 37.75      | 40.96      | 40.02  |
| 60              | 39.59               | 37.48      | 38.46      | 38.51  |
| 72              | 35.51               | 33.37      | 34.05      | 34.31  |
| 84              | 31.04               | 28.37      | 30.92      | 30.11  |
| 96              | 29.19               | 26.47      | 28.64      | 28.10  |
| 108             | 25.12               | 22.20      | 24.59      | 23.97  |
| 120             | 24.92               | 21.48      | 23.10      | 23.17  |



**ตารางผนวกที่ 15** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบชั้นเดียว ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลาการหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |        |
|-----------------|--------------------|------------|------------|--------|
|                 | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 140.65             | 87.55      | 110.65     | 112.95 |
| 12              | 204.79             | 126.59     | 152.49     | 161.29 |
| 24              | 300.65             | 212.80     | 274.81     | 262.75 |
| 36              | 597.21             | 526.94     | 557.17     | 560.44 |
| 48              | 797.52             | 730.07     | 766.27     | 764.62 |
| 60              | 902.36             | 824.56     | 853.56     | 860.16 |
| 72              | 898.37             | 833.99     | 867.41     | 866.59 |
| 84              | 917.24             | 841.14     | 865.54     | 874.64 |
| 96              | 928.43             | 857.16     | 896.20     | 893.93 |
| 108             | 895.32             | 825.72     | 854.82     | 858.62 |
| 120             | 877.79             | 807.59     | 840.89     | 842.09 |

**ตารางผนวกที่ 16** อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน

| ระยะเวลาการหมัก | อุณหภูมิของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|-----------------|----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                 | เบดล่าง              |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                 | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0               | 36.48                | 35.05      | 35.42      | 35.65  | 35.93      | 34.83      | 35.53      | 35.43  |
| 12              | 46.88                | 43.82      | 48.26      | 46.32  | 45.94      | 44.67      | 46.01      | 45.54  |
| 24              | 46.41                | 44.89      | 44.99      | 45.43  | 44.17      | 42.78      | 43.34      | 43.43  |
| 36              | 44.58                | 43.21      | 44.06      | 43.95  | 42.19      | 40.85      | 41.91      | 41.65  |
| 48              | 43.34                | 41.76      | 42.58      | 42.56  | 37.29      | 35.31      | 35.28      | 35.96  |
| 60              | 39.20                | 37.39      | 38.73      | 38.44  | 35.25      | 34.00      | 34.70      | 34.65  |
| 72              | 37.73                | 36.26      | 36.68      | 36.89  | 34.24      | 32.77      | 33.61      | 33.54  |
| 84              | 36.44                | 34.63      | 35.10      | 35.39  | 34.27      | 32.74      | 33.61      | 33.54  |
| 96              | 36.02                | 34.43      | 34.49      | 34.98  | 34.21      | 32.79      | 33.65      | 33.55  |
| 108             | 35.46                | 33.81      | 34.44      | 34.57  | 33.19      | 32.10      | 32.66      | 32.65  |
| 120             | 35.26                | 33.81      | 35.00      | 34.69  | 34.17      | 31.87      | 31.91      | 32.65  |

**ตารางผนวกที่ ค17** เปอร์เซ็นต์ความชื้นในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน

| ระยะเวลา<br>การหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|---------------------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง                         |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 50.80                           | 50.42      | 50.46      | 50.56  | 50.69      | 49.93      | 49.47      | 50.03  |
| 12                  | 49.55                           | 46.52      | 47.39      | 47.82  | 49.41      | 47.91      | 48.66      | 48.66  |
| 24                  | 47.28                           | 44.20      | 47.12      | 46.20  | 47.21      | 44.39      | 45.80      | 45.80  |
| 36                  | 44.92                           | 42.06      | 44.60      | 43.86  | 43.28      | 40.28      | 41.78      | 41.78  |
| 48                  | 43.33                           | 41.03      | 44.37      | 42.91  | 40.57      | 35.47      | 38.02      | 38.02  |
| 60                  | 38.97                           | 36.03      | 37.95      | 37.65  | 37.20      | 32.20      | 34.70      | 34.70  |
| 72                  | 37.57                           | 33.95      | 35.43      | 35.65  | 33.00      | 28.40      | 30.10      | 30.50  |
| 84                  | 36.43                           | 33.91      | 34.45      | 34.93  | 27.64      | 25.16      | 26.40      | 26.40  |
| 96                  | 32.52                           | 29.58      | 31.50      | 31.20  | 26.39      | 23.13      | 24.76      | 24.76  |
| 108                 | 31.97                           | 29.22      | 30.43      | 30.54  | 25.98      | 23.22      | 24.78      | 24.66  |
| 120                 | 31.56                           | 28.84      | 31.22      | 30.54  | 24.96      | 22.13      | 23.59      | 23.56  |

**ตารางผนวกที่ ค18** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดบน

| ระยะเวลา<br>การหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|--------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง            |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 132.11             | 76.21      | 105.66     | 104.66 | 123.04     | 63.53      | 108.93     | 98.5   |
| 12                  | 147.04             | 98.44      | 115.54     | 120.34 | 163.96     | 118.70     | 139.02     | 140.56 |
| 24                  | 230.20             | 176.99     | 194.10     | 200.43 | 296.93     | 263.22     | 264.34     | 274.83 |
| 36                  | 344.46             | 297.31     | 320.45     | 320.74 | 439.39     | 379.01     | 401.37     | 406.59 |
| 48                  | 374.10             | 328.45     | 349.10     | 350.55 | 570.65     | 506.35     | 538.65     | 538.55 |
| 60                  | 390.95             | 352.23     | 368.17     | 370.45 | 593.05     | 558.07     | 573.16     | 574.76 |
| 72                  | 404.99             | 362.59     | 386.19     | 384.59 | 637.35     | 594.45     | 614.55     | 615.45 |
| 84                  | 399.89             | 357.30     | 377.86     | 378.35 | 660.20     | 595.69     | 636.09     | 630.66 |
| 96                  | 352.61             | 307.41     | 326.20     | 328.74 | 641.71     | 597.44     | 622.35     | 620.5  |
| 108                 | 326.04             | 281.44     | 299.84     | 302.44 | 633.04     | 590.73     | 619.73     | 614.5  |
| 120                 | 314.04             | 269.59     | 296.84     | 293.49 | 629.71     | 590.53     | 593.86     | 604.7  |

**ตารางผนวกที่ ค19** อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดล่าง

| ระยะเวลา<br>การหมัก | อุณหภูมิของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง              |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 36.20                | 34.77      | 35.14      | 35.37  | 34.23      | 34.23      | 34.23      | 34.23  |
| 12                  | 47.42                | 46.11      | 47.05      | 46.86  | 46.75      | 46.75      | 46.75      | 46.75  |
| 24                  | 43.94                | 42.20      | 42.74      | 42.96  | 43.98      | 43.98      | 43.98      | 43.98  |
| 36                  | 41.20                | 39.71      | 40.44      | 40.45  | 40.45      | 40.45      | 40.45      | 40.45  |
| 48                  | 36.66                | 35.08      | 35.90      | 35.88  | 36.98      | 36.98      | 36.98      | 36.98  |
| 60                  | 35.74                | 33.93      | 35.27      | 34.98  | 34.98      | 34.98      | 34.98      | 34.98  |
| 72                  | 33.41                | 32.13      | 33.07      | 32.87  | 32.98      | 32.98      | 32.98      | 32.98  |
| 84                  | 33.20                | 31.99      | 33.06      | 32.75  | 32.87      | 32.87      | 32.87      | 32.87  |
| 96                  | 33.40                | 31.73      | 32.37      | 32.50  | 32.97      | 32.97      | 32.97      | 32.97  |
| 108                 | 33.86                | 32.21      | 32.84      | 32.97  | 32.06      | 32.06      | 32.06      | 32.06  |
| 120                 | 32.33                | 31.20      | 31.75      | 31.76  | 32.76      | 32.76      | 32.76      | 32.76  |

**ตารางผนวกที่ ค20** เปอร์เซ็นต์ความชื้นในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็นเบดล่าง

| ระยะเวลา<br>การหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|---------------------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง                         |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 51.74                           | 49.53      | 49.42      | 50.23  | 51.80      | 49.57      | 50.94      | 50.77  |
| 12                  | 49.42                           | 47.38      | 48.21      | 48.34  | 49.98      | 48.05      | 47.92      | 48.65  |
| 24                  | 44.79                           | 42.80      | 43.35      | 43.65  | 46.47      | 43.78      | 46.04      | 45.43  |
| 36                  | 39.48                           | 37.87      | 38.15      | 38.5   | 44.41      | 41.82      | 42.32      | 42.85  |
| 48                  | 37.52                           | 35.33      | 35.12      | 35.99  | 37.66      | 36.37      | 37.33      | 37.12  |
| 60                  | 35.24                           | 33.58      | 35.04      | 34.62  | 36.58      | 35.18      | 36.03      | 35.93  |
| 72                  | 31.10                           | 29.58      | 30.94      | 30.54  | 31.18      | 29.86      | 30.49      | 30.51  |
| 84                  | 26.29                           | 24.34      | 26.29      | 25.64  | 27.17      | 25.39      | 26.73      | 26.43  |
| 96                  | 24.08                           | 22.84      | 23.71      | 23.54  | 25.21      | 23.61      | 25.13      | 24.65  |
| 108                 | 24.40                           | 22.08      | 21.14      | 22.54  | 25.30      | 23.45      | 25.20      | 24.65  |
| 120                 | 24.21                           | 22.73      | 23.13      | 23.36  | 24.49      | 22.10      | 23.91      | 23.50  |

**ตารางผนวกที่ ค21** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบคบน 10:10 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที กำหนดให้เบดที่มีแผ่นโลหะทึบเป็น เบดล่าง

| ระยะเวลา<br>การหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|--------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง            |            |            |        | เบคบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 133.44             | 80.23      | 100.31     | 104.66 | 130.43     | 82.46      | 124.37     | 112.42 |
| 12                  | 163.37             | 100.56     | 128.44     | 130.79 | 170.34     | 130.38     | 140.10     | 146.94 |
| 24                  | 280.11             | 220.03     | 250.88     | 250.34 | 254.57     | 227.07     | 234.40     | 238.68 |
| 36                  | 440.99             | 393.87     | 416.95     | 417.27 | 398.33     | 352.74     | 389.89     | 380.32 |
| 48                  | 542.38             | 490.61     | 528.09     | 520.36 | 511.36     | 464.55     | 487.52     | 487.81 |
| 60                  | 628.38             | 584.00     | 607.45     | 606.61 | 561.73     | 526.75     | 541.84     | 543.44 |
| 72                  | 676.42             | 626.78     | 648.30     | 650.5  | 612.44     | 571.50     | 587.68     | 590.54 |
| 84                  | 692.49             | 642.87     | 677.13     | 670.83 | 650.08     | 588.00     | 623.54     | 620.54 |
| 96                  | 678.35             | 643.18     | 643.44     | 654.99 | 634.86     | 598.28     | 607.81     | 613.65 |
| 108                 | 660.46             | 629.67     | 630.77     | 640.3  | 619.10     | 576.08     | 606.50     | 600.56 |
| 120                 | 661.50             | 611.86     | 631.34     | 634.9  | 638.10     | 598.92     | 602.25     | 613.09 |

**ตารางผนวกที่ ค22** อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบคบน 10:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | อุณหภูมิของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง              |            |            |        | เบคบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 37.26                | 36.06      | 36.87      | 36.73  | 37.23      | 35.72      | 36.49      | 36.48  |
| 12                  | 47.23                | 46.08      | 46.61      | 46.64  | 41.41      | 40.00      | 40.54      | 40.65  |
| 24                  | 43.22                | 42.07      | 42.63      | 42.64  | 37.42      | 35.89      | 36.31      | 36.54  |
| 36                  | 37.86                | 36.44      | 36.94      | 37.08  | 36.53      | 34.80      | 35.35      | 35.56  |
| 48                  | 35.90                | 34.34      | 35.45      | 35.23  | 34.51      | 33.19      | 34.15      | 33.95  |
| 60                  | 34.39                | 33.10      | 33.76      | 33.75  | 33.82      | 32.30      | 32.73      | 32.95  |
| 72                  | 33.32                | 31.84      | 32.58      | 32.58  | 32.42      | 30.99      | 31.84      | 31.75  |
| 84                  | 33.52                | 31.89      | 33.17      | 32.86  | 31.42      | 30.01      | 30.22      | 30.55  |
| 96                  | 32.55                | 31.10      | 32.26      | 31.97  | 31.22      | 29.69      | 30.77      | 30.56  |
| 108                 | 32.51                | 31.22      | 31.61      | 31.78  | 31.34      | 29.79      | 30.82      | 30.65  |
| 120                 | 32.21                | 30.88      | 31.86      | 31.65  | 31.09      | 29.65      | 30.88      | 30.54  |

**ตารางผนวกที่ ค23** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|---------------------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง                         |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 51.54                           | 48.71      | 49.84      | 50.03  | 51.10      | 48.87      | 50.24      | 50.07  |
| 12                  | 49.42                           | 47.38      | 48.21      | 48.34  | 48.89      | 46.96      | 46.83      | 47.56  |
| 24                  | 47.79                           | 45.80      | 46.35      | 46.65  | 45.80      | 43.11      | 45.37      | 44.76  |
| 36                  | 41.48                           | 39.87      | 40.15      | 40.50  | 41.21      | 38.62      | 39.12      | 39.65  |
| 48                  | 37.52                           | 35.33      | 35.12      | 35.99  | 35.97      | 33.35      | 34.63      | 34.65  |
| 60                  | 35.02                           | 32.58      | 33.26      | 33.62  | 33.19      | 30.01      | 32.08      | 31.76  |
| 72                  | 33.94                           | 31.18      | 32.50      | 32.54  | 30.20      | 28.00      | 27.75      | 28.65  |
| 84                  | 28.84                           | 26.34      | 27.74      | 27.64  | 26.18      | 23.39      | 23.72      | 24.43  |
| 96                  | 28.18                           | 25.20      | 26.24      | 26.54  | 24.06      | 21.82      | 22.70      | 22.86  |
| 108                 | 26.40                           | 24.08      | 23.14      | 24.54  | 23.20      | 21.35      | 23.10      | 22.55  |
| 120                 | 25.79                           | 23.93      | 23.96      | 24.56  | 22.42      | 20.03      | 21.84      | 21.43  |

**ตารางผนวกที่ ค24** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 10:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|--------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง            |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 184.56             | 100.38     | 153.12     | 146.02 | 163.42     | 98.38      | 120.43     | 127.41 |
| 12                  | 210.10             | 173.48     | 180.36     | 187.98 | 220.38     | 183.32     | 190.42     | 198.04 |
| 24                  | 380.56             | 311.40     | 321.41     | 337.79 | 550.32     | 454.32     | 500.55     | 501.73 |
| 36                  | 464.32             | 401.13     | 445.37     | 436.94 | 750.38     | 701.18     | 734.57     | 728.71 |
| 48                  | 584.61             | 534.41     | 567.01     | 562.01 | 874.38     | 810.48     | 840.39     | 841.75 |
| 60                  | 662.89             | 597.82     | 628.24     | 629.65 | 988.83     | 920.84     | 951.25     | 953.64 |
| 72                  | 657.06             | 604.91     | 630.49     | 630.82 | 992.88     | 950.05     | 960.41     | 967.78 |
| 84                  | 680.73             | 643.17     | 670.98     | 664.96 | 1011.72    | 961.38     | 999.39     | 990.83 |
| 96                  | 660.16             | 618.68     | 640.83     | 639.89 | 990.62     | 944.62     | 976.35     | 970.53 |
| 108                 | 658.95             | 599.80     | 627.20     | 628.65 | 940.69     | 890.15     | 908.79     | 913.21 |
| 120                 | 644.17             | 593.26     | 603.19     | 613.54 | 906.91     | 876.34     | 887.53     | 890.26 |

**ตารางผนวกที่ ค25** อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 5:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | อุณหภูมิของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง              |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 36.01                | 34.87      | 35.56      | 35.48  | 36.69      | 35.18      | 35.95      | 35.94  |
| 12                  | 40.24                | 39.09      | 39.62      | 39.65  | 39.75      | 38.34      | 38.88      | 38.99  |
| 24                  | 36.22                | 34.98      | 35.42      | 35.54  | 36.31      | 34.98      | 35.00      | 35.43  |
| 36                  | 35.34                | 33.72      | 34.62      | 34.56  | 35.29      | 33.78      | 33.89      | 34.32  |
| 48                  | 34.83                | 33.06      | 33.96      | 33.95  | 33.98      | 32.66      | 33.62      | 33.42  |
| 60                  | 33.80                | 32.50      | 33.15      | 33.15  | 33.30      | 31.78      | 32.21      | 32.43  |
| 72                  | 33.39                | 31.91      | 32.65      | 32.65  | 33.43      | 32.00      | 32.85      | 32.76  |
| 84                  | 31.51                | 29.88      | 30.26      | 30.55  | 32.81      | 31.40      | 31.61      | 31.94  |
| 96                  | 31.13                | 29.71      | 30.90      | 30.58  | 31.44      | 29.90      | 30.97      | 30.77  |
| 108                 | 30.40                | 29.09      | 29.46      | 29.65  | 31.09      | 29.78      | 30.75      | 30.54  |
| 120                 | 30.30                | 28.79      | 29.53      | 29.54  | 31.01      | 29.59      | 30.75      | 30.45  |

**ตารางผนวกที่ ค26** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 5:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|---------------------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง                         |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 52.38                           | 50.03      | 49.78      | 50.73  | 51.37      | 49.14      | 50.51      | 50.34  |
| 12                  | 51.79                           | 48.91      | 48.88      | 49.86  | 50.00      | 48.07      | 47.94      | 48.67  |
| 24                  | 45.32                           | 43.02      | 43.27      | 43.87  | 45.92      | 44.23      | 44.49      | 44.88  |
| 36                  | 42.19                           | 40.13      | 39.96      | 40.76  | 42.52      | 40.84      | 42.25      | 41.87  |
| 48                  | 36.91                           | 35.20      | 35.47      | 35.86  | 36.40      | 35.21      | 35.97      | 35.86  |
| 60                  | 36.52                           | 33.94      | 34.48      | 34.98  | 34.42      | 33.01      | 33.88      | 33.77  |
| 72                  | 33.52                           | 31.02      | 31.40      | 31.98  | 32.54      | 31.22      | 31.85      | 31.87  |
| 84                  | 28.52                           | 25.57      | 26.52      | 26.87  | 26.30      | 25.09      | 25.89      | 25.76  |
| 96                  | 24.21                           | 23.02      | 23.78      | 23.67  | 25.43      | 24.22      | 24.96      | 24.87  |
| 108                 | 23.72                           | 21.40      | 20.46      | 21.86  | 22.64      | 20.79      | 22.54      | 21.99  |
| 120                 | 20.95                           | 19.76      | 20.19      | 20.3   | 21.36      | 20.15      | 20.89      | 20.8   |

**ตารางผนวกที่ ค27** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบคบน 5:5 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |         |            |            |            |         |
|---------------------|--------------------|------------|------------|---------|------------|------------|------------|---------|
|                     | เบดล่าง            |            |            |         | เบคบน      |            |            |         |
|                     | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย  | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย  |
| 0                   | 186.60             | 101.04     | 151.26     | 146.3   | 193.67     | 108.11     | 158.33     | 153.37  |
| 12                  | 260.29             | 170.98     | 210.46     | 213.91  | 243.25     | 153.94     | 193.42     | 196.87  |
| 24                  | 524.46             | 439.66     | 496.94     | 487.02  | 425.51     | 340.71     | 397.99     | 388.07  |
| 36                  | 692.14             | 617.55     | 656.24     | 655.31  | 625.03     | 550.44     | 589.13     | 588.2   |
| 48                  | 1012.92            | 926.55     | 965.91     | 968.46  | 842.33     | 755.96     | 795.32     | 797.87  |
| 60                  | 1078.32            | 998.40     | 1007.67    | 1028.13 | 983.04     | 923.11     | 952.37     | 952.84  |
| 72                  | 1102.17            | 1013.09    | 1082.41    | 1065.89 | 1030.12    | 941.03     | 1010.34    | 993.83  |
| 84                  | 1122.22            | 1045.23    | 1096.70    | 1088.05 | 1040.55    | 963.55     | 1015.01    | 1006.37 |
| 96                  | 1073.63            | 991.23     | 999.22     | 1021.36 | 1005.54    | 953.14     | 991.13     | 983.27  |
| 108                 | 1044.61            | 962.48     | 954.60     | 987.23  | 1005.45    | 943.31     | 955.42     | 968.06  |
| 120                 | 1026.74            | 944.82     | 939.04     | 970.2   | 972.04     | 920.11     | 944.32     | 945.49  |

**ตารางผนวกที่ ค28** อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบคบน 5:3 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | อุณหภูมิของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|----------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง              |            |            |        | เบคบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1           | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 35.87                | 34.67      | 35.48      | 35.34  | 36.73      | 35.22      | 35.99      | 35.98  |
| 12                  | 41.54                | 40.39      | 40.92      | 40.95  | 38.19      | 36.78      | 37.32      | 37.43  |
| 24                  | 38.75                | 37.60      | 38.16      | 38.17  | 36.86      | 35.33      | 35.75      | 35.98  |
| 36                  | 37.14                | 35.72      | 36.22      | 36.36  | 35.69      | 33.96      | 34.51      | 34.72  |
| 48                  | 36.15                | 34.59      | 35.70      | 35.48  | 35.22      | 33.90      | 34.86      | 34.66  |
| 60                  | 34.09                | 32.80      | 33.46      | 33.45  | 33.74      | 32.22      | 32.65      | 32.87  |
| 72                  | 34.19                | 32.71      | 33.45      | 33.45  | 33.43      | 32.00      | 32.85      | 32.76  |
| 84                  | 33.11                | 31.48      | 32.76      | 32.45  | 32.71      | 31.30      | 31.51      | 31.84  |
| 96                  | 32.16                | 30.71      | 31.87      | 31.58  | 31.33      | 29.80      | 30.88      | 30.67  |
| 108                 | 31.50                | 30.21      | 30.60      | 30.77  | 30.53      | 28.98      | 30.01      | 29.84  |
| 120                 | 30.48                | 29.15      | 30.13      | 29.92  | 29.58      | 28.14      | 29.37      | 29.03  |

**ตารางผนวกที่ ค29** เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 5:3 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก |            |            |        |            |            |            |        |
|---------------------|---------------------------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|--------|
|                     | เบดล่าง                         |            |            |        | เบดบน      |            |            |        |
|                     | ครั้งที่ 1                      | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0                   | 51.52                           | 48.69      | 49.82      | 50.01  | 51.09      | 48.86      | 50.23      | 50.06  |
| 12                  | 48.50                           | 46.46      | 47.29      | 47.42  | 49.38      | 47.45      | 47.32      | 48.05  |
| 24                  | 44.29                           | 42.30      | 42.85      | 43.15  | 43.17      | 40.48      | 42.74      | 42.13  |
| 36                  | 39.96                           | 38.35      | 38.63      | 38.98  | 38.13      | 35.54      | 36.04      | 36.57  |
| 48                  | 35.29                           | 33.10      | 32.89      | 33.76  | 32.00      | 29.38      | 30.66      | 30.68  |
| 60                  | 32.26                           | 29.82      | 30.50      | 30.86  | 30.97      | 27.79      | 29.86      | 29.54  |
| 72                  | 31.16                           | 28.40      | 29.72      | 29.76  | 29.20      | 27.00      | 26.75      | 27.65  |
| 84                  | 27.18                           | 24.68      | 26.08      | 25.98  | 26.59      | 23.80      | 24.13      | 24.84  |
| 96                  | 25.06                           | 22.08      | 23.12      | 23.42  | 23.94      | 21.70      | 22.58      | 22.74  |
| 108                 | 24.40                           | 22.08      | 21.14      | 22.54  | 20.84      | 18.99      | 20.74      | 20.19  |
| 120                 | 22.26                           | 20.40      | 20.43      | 21.03  | 20.74      | 18.35      | 20.16      | 19.75  |

**ตารางผนวกที่ ค30** ค่ากิจกรรมโปรติเอสในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยถังหมักแพคเบดแบบสองชั้น ความหนาของวัสดุหมักเบดล่างต่อเบดบน 5:3 เซนติเมตร ใช้เครื่องเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วภายในถังหมักเท่ากับ 0.1 เมตรต่อวินาที

| ระยะเวลา<br>การหมัก | ค่ากิจกรรมโปรติเอส |            |            |         |            |            |            |         |
|---------------------|--------------------|------------|------------|---------|------------|------------|------------|---------|
|                     | เบดล่าง            |            |            |         | เบดบน      |            |            |         |
|                     | ครั้งที่ 1         | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย  | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | เฉลี่ย  |
| 0                   | 173.97             | 89.79      | 142.53     | 135.43  | 126.49     | 87.95      | 165.03     | 126.49  |
| 12                  | 189.96             | 153.34     | 160.22     | 167.84  | 175.72     | 153.60     | 197.84     | 175.72  |
| 24                  | 434.10             | 364.94     | 374.95     | 391.33  | 452.70     | 409.93     | 495.47     | 452.70  |
| 36                  | 725.01             | 661.82     | 706.06     | 697.63  | 704.94     | 677.56     | 732.32     | 704.94  |
| 48                  | 978.74             | 928.54     | 961.14     | 956.14  | 970.18     | 947.58     | 992.78     | 970.18  |
| 60                  | 1091.64            | 1026.57    | 1056.99    | 1058.40 | 1079.04    | 1045.80    | 1112.28    | 1079.04 |
| 72                  | 1103.28            | 1051.13    | 1076.71    | 1077.04 | 1124.87    | 1098.63    | 1151.11    | 1124.87 |
| 84                  | 1100.86            | 1063.30    | 1091.11    | 1085.09 | 1134.71    | 1118.94    | 1150.48    | 1134.71 |
| 96                  | 1066.25            | 1024.77    | 1046.92    | 1045.98 | 1090.82    | 1070.55    | 1111.09    | 1090.82 |
| 108                 | 1044.38            | 985.23     | 1012.63    | 1014.08 | 1078.56    | 1048.26    | 1108.86    | 1078.56 |
| 120                 | 1034.26            | 983.35     | 993.28     | 1003.63 | 1058.98    | 1028.35    | 1089.61    | 1058.98 |



## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                      |                                                                                                                               |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ –นามสกุล        | ธัญรัตน์ สหายา                                                                                                                |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด | 4 เดือนเมษายน พ.ศ. 2526                                                                                                       |
| สถานที่เกิด          | ชลบุรี                                                                                                                        |
| ประวัติการศึกษา      | ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนพนัสพิทยาคาร<br>ระดับอุดมศึกษา วท.บ. เทคโนโลยีชีวภาพ<br>คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2549     |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม<br>ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ |