วิทยานิพนธ์

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย
Aspergillus oryzae ในถังหมักแบบแพคเบด

Protease Production in Solid-state Fermentation by
Aspergillus oryzae in Packed-bed Fermentors

นายสุนทร ปีติเจริญพันธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2549

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี	วิศวกรรมเคมี
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด

Protease Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus oryzae* in Packed-bed Fermentors

นามผู้วิจัย นายสุนทร ปิติเจริญพันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

กรรมการ .....

(อาจารย์นันทิยา หาญศุภลักษณ์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัจฉรา ดวงเดือน, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธำรงรัตน์ มุ่งเจริญ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 27 **เดือน** มีนาคม **พ.ศ.** 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด

Protease Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus oryzae* in Packed-bed Fermentors

โดย

นายสุนทร ปิติเจริญพันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1426-8

สุนทร ปิติเจริญพันธ์ 2549: การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.
106 หน้า
ISBN 974-16-1426-8

การศึกษาหาวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้วัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ต้นเชื้อรา *Aspergillus oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ แป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 5 วัน ทำการวิเคราะห์ตัวแปร คือ ค่ากิจกรรมโปรติเอสและความชื้นของวัสดุหมัก พบว่า เมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุด มีค่ากิจกรรมโปรติเอสเป็น 936.00 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 96 และความชื้นของวัสดุหมักเพิ่มขึ้นจาก 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 61.44 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นจึงเลือกใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด

นำวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด มีการให้อากาศที่ผ่านการเพิ่มความชื้นเข้าถังหมักเพื่อระบายความร้อนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากการหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 5 วัน ที่อัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาที ทำการเปรียบเทียบเมื่อใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากัน คือ 435.45 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งและสูงกว่าที่ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาผลของระยะเวลาเริ่มให้อากาศเปรียบเทียบระหว่างการเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 5 วัน ที่อัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาที โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดของการหมักในถังหมักแบบแพคเบด มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 60 ที่ค่าความชื้น 39.38 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเท่ากับ 6.0

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ 23, มิ.ค, 49

Sunthon Piticharoenphun 2006: Protease Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus oryzae* in Packed-bed Fermentors. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Penjit Srinophakun, Ph.D. 106 pages.
ISBN 974-16-1426-8

This study was carried out to find suitable substrate formula for protease production using 100% wheat bran, 100% rice bran, mixture of wheat and rice bran in the percentage proportion of 75:25, 50:50 and 25:75 in the laboratory scale. The innoculum of 0.3% *Aspergillus oryzae* and 10% wheat flour were added to dry substrate and was adjusted to 50% moisture content. The mixture was then inoculated at 30 ^{0}C for 5 days. Protease activity and substrate moisture content were analyzed. The results showed that the percentage ratio of 25:75 gave the highest protease activity of 936.00 unit / g dry substrate. The substrate moisture content was increased from 50 to 61.44% at the end of fermentation. This optimum substrate ratio was chosen to further study of protease production in a packed-bed fermentor.

According to the optimum percentage wheat to rice ratio of 25:75, the mixture was fermented in the packed-bed fermentor with air inlet through the humidifier for system heat removal after 12 hr of fermentation for 5 days at velocity of 0.1 m/s. Comparing of 50, 55 and 60% initial substrate moisture content, the results illustrated the moisture content of 50 and 50% gave the highest protease activity of 435.45 unit / g dry substrate which was higher than at 60%. Then the investigation of air inlet starting time at 12 and 24 hr after fermentation was performed until 5 days of fermentation period using air inlet velocity 0.1 m/s and initial substrate moisture content of 50 and 55%. The resulted showed that at 50% substrate moisture content and air inlet starting time of 24 hr gave the highest protease activity in the packed-bed fermentation of 668.53 unit / g dry substrate at 60 hr, at the moisture content of 39.38 % and pH of 6.0.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

23 / มิ.ย. / 49

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจและห่วงใยอย่างเสมอ รวมทั้งให้การสนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้า จนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ประสาทวิชาความรู้ รวมทั้งให้คำแนะนำและชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นันทิยา หาญศุภลักษณ์ กรรมการวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ดวงเดือน กรรมการวิชารอง รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ผู้แทนบัณฑิต และอาจารย์ ดร. จรัญ ฉัตรมานพ ที่สละเวลาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณพงษ์ประวัติ พิมพการัง และคุณจุฬารัตน์ ครองแถว ที่สละเวลาสาธิตวิธีการวิเคราะห์ต่างๆ สอนการใช้เครื่องมือ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณวรัญญู เสมรสุต ที่ช่วยพัฒนาถังเพิ่มความชื้น เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง รวมทั้งขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ และบุคคลรอบข้างที่ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในด้านต่างๆ เสมอ

และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบอาราธนาคุณพระศรีรัตนตรัย โปรดประทานพรให้ทุกท่านจงมีสุขภาพแข็งแรง มีความสุขกาย สุขใจ ปราศจากทุกข์โศกโรคภัยทั้งปวงด้วยเทอญ

สุนทร ปิติเจริญพันธ์

กุมภาพันธ์ 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการหมัก	4
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการหมักแบบแห้ง	15
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรา	19
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า	27
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์	30
อุปกรณ์และวิธีการ	43
อุปกรณ์	43
วิธีการ	47
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	55
สรุปและข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	73
ภาคผนวก	79
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐาน	80
ภาคผนวก ข ตารางข้อมูลผลการทดลอง	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความต้องการสภาวะแวดล้อมและสารอาหารของรา	21
2	องค์ประกอบของรา *Aspergillus oryzae*	26
3	องค์ประกอบของรำข้าวสาลี	27
4	องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวเจ้า	29
5	การใช้งานเอนไซม์	36
6	เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์	39
7	การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส	42
8	การเตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้นต่างๆ	52

ตารางผนวกที่

ก1	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส	81
ก2	ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน	82
ข1	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	84
ข2	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	84
ข3	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	85
ข4	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	85
ข5	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	86
ข6	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข7	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 50:50 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	87
ข8	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 50:50 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	87
ข9	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	88
ข10	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์	88
ข11	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	89
ข12	ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	89
ข13	อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	90
ข14	อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	90
ข15	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข16	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	91
ข17	ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	92
ข18	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	92
ข19	ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	93
ข20	อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	93
ข21	อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	94
ข22	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	94
ข23	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	95

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข24	ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	95
ข25	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	96
ข26	ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	96
ข27	อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	97
ข28	อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	97
ข29	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	98
ข30	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	98
ข31	ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์	99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข32	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	99
ข33	ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	100
ข34	อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	100
ข35	อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	101
ข36	ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	101
ข37	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	102
ข38	ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	102
ข39	กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข40	ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	103
ข41	อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	104
ข42	อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	104
ข43	ความชื้นของวัสดุหมักเมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	105
ข44	ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้าหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	105
ข45	ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	10
2	การงอกของสปอร์	24
3	(ก) พลังงานอิสระการกระตุ้น (ข) เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น	31
4	โครงร่างเอนไซม์ lysozyme ในไข่ขาวของไข่ไก่พร้อมกับการเรียงตัวของกรดอะมิโน	34
5	ลักษณะของรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า (ก) รำข้าวสาลีก่อนปรับความชื้น (ข) รำข้าวสาลีหลังปรับความชื้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ค) รำข้าวเจ้าก่อนปรับความชื้น และ (ง) รำข้าวเจ้าหลังปรับความชื้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์	43
6	ระบบการหมักในถังหมักแบบแพคเบด (1) พัดลมดูดอากาศ (2) ถังหมักแบบแพคเบด (3) ชั้นเบด (4) เครื่องวัดอุณหภูมิแบบเก็บข้อมูล (5) เครื่องประกอบวัดความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศ (6) ถังเพิ่มความชื้น และ (7) ถังน้ำ	46
7	กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆเป็นวัสดุหมัก เมื่อความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์	56
8	ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆเป็นวัสดุหมัก เมื่อความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์	57
9	ลักษณะของวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ในเบดที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ (ก) ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) ความชื้น 55 เปอร์เซ็นต์ และ (ค) ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์	58
10	กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ปริมาณกลูโคซามีนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	61
12	อุณหภูมิของอากาศขึ้นขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	62
13	อุณหภูมิในเบดที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	62
14	ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	63
15	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	63
16	ค่าพีเอชที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก	64
17	กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	67
18	ปริมาณกลูโคซามีนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	อุณหภูมิของอากาศชื้นขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	68
20	อุณหภูมิในเบดที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	68
21	ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	69
22	ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	69
23	ค่าพีเอชที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก	70

ภาพผนวกที่

ก1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส	81
ก2	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน	82

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด

Protease Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus oryzae* in Packed-bed Fermentors

คำนำ

เอนไซม์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในอุตสาหกรรมต่างๆ ในธรรมชาติสามารถพบเอนไซม์ได้ทั้งในพืชและสัตว์ และสามารถสกัดเอนไซม์จากพืชและสัตว์มาใช้ได้โดยตรงแต่ยังมีข้อจำกัดทางด้านคุณภาพและปริมาณ (อรพิน, 2523) ซึ่งการผลิตเอนไซม์มาใช้งานในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยมากแล้วผลิตจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย ฯลฯ บนวัสดุหมัก (substrate) ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือมีการเติมสารอาหารอื่นๆอีก

การที่จุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารมาใช้ได้นั้นต้องมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ย่อยสลายวัสดุหมักที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้กลายเป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้งานได้ แต่การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้สร้างเอนไซม์นั้นมักควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ยาก เพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นเนื้อเดียวกันของวัสดุหมัก เป็นต้น ดังนั้นถ้าสามารถสกัดแยกเอนไซม์ที่ผลิตได้ออกจากจุลินทรีย์แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในการย่อยสลายสารอื่นที่ต้องการโดยตรง ทำให้สามารถกำจัดปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ ทำให้ประสิทธิผลและประสิทธิภาพในการย่อยสลายดีขึ้น ปริมาณการใช้เอนไซม์ก็สามารถคำนวณหาได้แน่นอนในการใช้ทำปฏิกิริยา โดยคำนวณจากปริมาณวัสดุหมักที่ใช้และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) อีกทั้งวิธีการที่ใช้เอนไซม์ย่อยสลายวัสดุหมักได้โดยตรงแทนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้ลดขั้นตอนของกระบวนการหมักซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน

การหมักโดยทั่วไปเอนไซม์ที่ผลิตได้นั้นอาจอยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ (intracellular enzyme) หรือจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายวัสดุหมัก ซึ่งถ้าเอนไซม์ที่ผลิตได้อยู่ภายในเซลล์ต้องนำเซลล์นั้นมาทำการแยกเอนไซม์ออกจึง

สามารถนำเอนไซม์มาใช้งานได้ ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมานอกเซลล์สามารถทำการแยกได้ง่ายกว่าโดยนำของเหลว (liquid medium) มาชะล้างเอนไซม์ออกจากวัสดุหมัก นอกจากนี้อาจทำการชะล้างเอนไซม์ออกมาขณะทำการหมักได้ ทำให้ได้เอนไซม์ออกมาโดยที่ไม่ต้องรอให้กระบวนการหมักเสร็จสิ้นสมบูรณ์ (Aikat and Bhattacharyya, 2001)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีปริมาณการใช้งานมากในอุตสาหกรรมต่างๆ คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทั้งหมด (Shuler and Kargi, 2002) ในปี ค.ศ. 1971 มูลค่าของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นสูงถึง 18.34 ล้านดอลลาร์และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 24.51 ล้านดอลลาร์ในปี ค.ศ. 1980 (อรพิน, 2523) เพราะเอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ได้ในงานหลายประเภท เช่น ใช้ในการฟอกหนัง ใช้เป็นส่วนผสมของผงซักฟอกเพื่อย่อยสลายคราบโปรตีนที่มีอยู่ในเนื้อผ้า เป็นตัวช่วยย่อยในอุตสาหกรรมยา ใช้ย่อยสลายโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดี เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นกระบวนการต้นแบบในการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นที่ต้องการใช้ต่อไป

ปัจจุบันเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้กันมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นเมื่อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ขึ้นเองในประเทศไทย แน่นอนที่สุดว่าต้นทุนในการผลิตเอนไซม์จะถูกกว่าการนำเข้า เป็นการลดต้นทุนเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสต่อไป

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยจุลินทรีย์ประเภทรา เพราะการใช้จุลินทรีย์ประเภทรามักมีต้นทุนต่ำและให้ผลิตผลสูง (Wang et al., 2005) โดยเลือกใช้รา *Aspergillus oryzae* ทำการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) ในถังหมักแบบแพคเบด (packed-bed fermentor) เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อรา *A. oryzae* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก เพราะการหมักแบบแห้งเป็นการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนวัสดุหมักที่ไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) หรือวัสดุหมักมีความชื้นต่ำในช่วง 40-50 เปอร์เซ็นต์ และถังหมักแบบแพคเบดที่ใช้ไม่ได้มีการกวนวัสดุหมัก จึงไม่ทำลายเส้นใยของรา สภาวะเช่นนี้จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา

วัตถุประสงค์

1. หาสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการหมักแบบแห้งด้วยรา *Aspergillus oryzae* ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale)

2. ทำการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้ถังหมักแบบแพคเบดโดยการหมักแบบแห้งด้วยรา *Aspergillus oryzae*

การตรวจเอกสาร

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับกระบวนการหมัก

1. การหมัก (Fermentation)

การหมัก (fermentation) มีรากคำมาจากภาษาลาตินว่า “fervere” แปลว่า เดือด เนื่องจากเกิดฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาเหมือนน้ำเดือดจากกระบวนการหมักยีสต์ในน้ำสกัดจากผลไม้หรือเมล็ดข้าวมอลท์ซึ่งยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลในสภาวะไม่มีออกซิเจนทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความหมายของการหมักอาจแตกต่างกันไปบ้าง เช่น ในทางชีวเคมี การหมักหมายถึงการสร้างพลังงานจากกระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม การหมักหมายถึงกระบวนการผลิตผลผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก (mass culture) ซึ่งครอบคลุมทั้งกระบวนการแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน ในขณะที่ทางชีวเคมี การหมักหมายถึงกระบวนการแบบไม่ใช้ออกซิเจนเท่านั้น (สมใจ, 2537)

การหมักหรือกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม หมายถึง กระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอินทรีย์สาร โดยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ เอนไซม์ทำให้อินทรีย์สารย่อยสลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์หรือมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ผลิตภัณฑ์ในที่นี้อาจเกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่หรือได้จากการย่อยสลายทางชีวเคมีก็ได้ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศเต็มที่ ให้อากาศเพียงเล็กน้อย หรือปราศจากอากาศก็ได้

1.1 ขั้นตอนพื้นฐานของการหมัก

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน (วราวุฒิ, 2529) คือ

1.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum preparation) เป็นการเตรียมจุลินทรีย์ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก และจุลินทรีย์นั้นต้องแข็งแรงพอที่สามารถเจริญเติบโตในการหมักได้ รวมทั้งต้องปราศจากจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการ

1.1.2 การเตรียมวัตถุดิบ (raw material preparation) เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบ (raw material) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า วัสดุหมัก (substrate) เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ถ้าวัสดุหมักเป็นวัสดุที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ง่ายก็สามารถเตรียมได้ง่าย ถ้าจุลินทรีย์ใช้วัสดุหมักได้ยากก็จะทำให้การเตรียมวัสดุหมักเป็นไปได้ยากด้วย

1.1.3 การหมัก (fermentation) เป็นการนำวัสดุหมักและหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาถ่ายลงสู่ถังหมัก แล้วทำการปรับสภาวะถังหมักให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น การเติมอากาศ การกวน การควบคุมอุณหภูมิ การปรับพีเอช เป็นต้น

1.1.4 การแยกผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์ (product isolation and product purification) เป็นกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์หลังจากหมักเสร็จแล้วออกจากวัสดุหมัก โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น การกรอง (filtration) การเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifugation) การตกตะกอน (coagulation and flocculation) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (extraction) การตกผลึก (crystallization) การระเหย (evaporation) การทำให้แห้ง (drying) เป็นต้น เมื่อแยกผลิตภัณฑ์ได้แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟฟี่แบบดูดซับ (adsorption chromatography) โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) โครมาโตกราฟฟี่แบบเจล (gel chromatography) เป็นต้น

1.2 ประเภทของการหมัก

ประเภทของการหมักแบ่งได้หลายประเภท (วราวุฒิ, 2529) ตามแต่วัตถุประสงค์ของการใช้งาน

แบ่งตามความต้องการใช้อากาศ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. การหมักที่ต้องการอากาศ (aerobic fermentation) เป็นการหมักที่จำเป็นต้องใช้อากาศหรือออกซิเจน เช่น การผลิตกรดอะซีตริค กรดซิตริค

2. การหมักที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic fermentation) เป็นการหมักที่ไม่จำเป็นต้องใช้อากาศหรือออกซิเจน เช่น การหมักก๊าซชีวภาพ

แบ่งตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักในสภาพเปิด (septic fermentation) เป็นการหมักในสภาพเปิด ไม่ได้ควบคุมจุลินทรีย์ภายนอกที่อาจปนเปื้อนวัสดุหมักในระหว่างการหมัก

2. การหมักในสภาพกึ่งเปิดที่ไม่ต้องการอากาศ (semi-septic fermentation) เป็นการหมักที่กึ่งควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ภายนอก

3. การหมักในสภาพปิด (aseptic fermentation) เป็นการหมักที่จำเป็นต้องทำให้ไม่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการเพราะอาจทำความเสียหายให้แก่กระบวนการหมัก เช่น การผลิตยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

แบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติม แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) หรือเรียกอีกอย่างว่า การหมักบนอาหารแข็ง เป็นการหมักที่ต้องการปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อย เพื่อปรับให้วัสดุหมักที่แห้งมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2. การหมักในสภาพกึ่งเหลว (semi-solid fermentation) เป็นการหมักที่มีอาหารหมักเป็นของเหลวแต่มีของแข็งแขวนลอยอยู่บางส่วน

3. การหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) เป็นการหมักที่อาหารหมักเป็นของเหลว

แบ่งตามกระบวนการที่ใช้ แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักแบบกะ (batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมัก สารอาหารและหัวเชื้อจุลินทรีย์ลงไปเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาในการหมัก คือ เติมลงไปในตอนต้นของการหมักเท่านั้น

2. การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมักหรือสารอาหารลงไปมากกว่า 1 ครั้ง เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้วัสดุหมักและสารอาหารได้เต็มที่ เพื่อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงขึ้น

3. การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัสดุหมักหรือสารอาหารตลอดเวลา และในขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากการหมักตลอดเวลาด้วยเช่นกัน

1.3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก

แบ่งได้เป็น 3 จำพวก (วราวุฒิ, 2529) คือ

1.3.1 สารโมเลกุลต่ำ ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาชีวเคมีในการย่อยสลายวัสดุหมักหรือสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อใช้ในการสร้างพลังงานหรือสารบางอย่างที่เป็นส่วนประกอบในการสร้างเซลล์

1.3.2 สารโมเลกุลใหญ่ เช่น เอนไซม์ โปรตีน ฮอร์โมน เป็นต้น

1.3.3 สารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น โดยไม่มีความสัมพันธ์กับขบวนการเมตาบอลึซึ่มในการสร้างพลังงานและสารประกอบที่จำเป็นในการสร้างเซลล์ เช่น ยาปฏิชีวนะ สารพิษของแบคทีเรีย เป็นต้น

2. <u>วัสดุหมัก (Substrate)</u>

วัสดุหมักที่ใช้ในการหมักต้องเป็นวัสดุหมักที่หาได้ง่าย ราคาถูก ซึ่งส่วนใหญ่มาจากผลผลิตและผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันสำปะหลัง รำ ชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น (กำเนิด, 2534) หรือได้จากผลิตภัณฑ์จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น น้ำตาลกลูโคส วิตามิน กรดอะมิโน หรือได้จากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น กากน้ำตาล น้ำหางนม น้ำย่อยเยื่อกระดาษ เป็นต้น บางครั้งวัสดุหมักอาจใช้ทดแทนกันได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์หนึ่งๆ ซึ่งขึ้นกับประสิทธิภาพการผลิต

3. <u>จุลินทรีย์ (Microorganism)</u>

3.1 ประเภทของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกับเซลล์สัตว์ชั้นสูง สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีคล้ายกันหลายปฏิกิริยา สามารถดำรงชีพโดยใช้อาหารอย่างง่ายๆ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ (นงลักษณ์, 2547)

3.1.1 สาหร่าย มีลักษณะค่อนข้างง่าย เซลล์ของสาหร่ายทุกชนิดมีคลอโรฟิลล์เพื่อทำหน้าที่สังเคราะห์แสง สามารถพบสาหร่ายได้ทั่วไปในแหล่งน้ำหรือดินชื้นแฉะ

3.1.2 ไวรัส เป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเท่านั้น ยังไม่มีองค์ประกอบของเซลล์ ไวรัสก่อให้เกิดโรคทางพืช สัตว์ แบคทีเรีย และโพรทิสต์อื่นๆ การเพาะเลี้ยงไวรัสต้องอาศัยเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

3.1.3 แบคทีเรีย เป็นพวกโพรคาริโอตเซลล์เดียว โดยทั่วไปเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธีการแบ่งเซลล์

3.1.4 โพรโทซัว เป็นพวกยูคาริโอตเซลล์เดียว มีความแตกต่างกันทั้งด้านรูปร่างลักษณะทางโภชนาการ และสรีระวิทยา มีบทบาทแตกต่างกันในธรรมชาติ

3.1.5 รา เป็นพวกยูคาริโอตที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ มักมีหลายเซลล์ แต่ไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นราก ลำต้น และใบ ขนาดและรูปร่างแตกต่างกันมากตั้งแต่ยีสต์ซึ่งมีเซลล์เดียวขนาดเล็กต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จนถึงเห็ดที่มีขนาดใหญ่หลายเซลล์

3.2 ลักษณะสำคัญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก (วราวุฒิ, 2529; กำเนิด, 2534) มีดังนี้

3.2.1 สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูงและสม่ำเสมอภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3.2.2 ต้องให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่านั้นที่เป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ต้องการ

3.2.3 เลี้ยงขยายปริมาณได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ

3.2.4 มีสมบัติคงทนในการรักษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.5 มีความคงทนต่อผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูง และต้องไม่แปรสภาพผลิตภัณฑ์เดิมไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆต่อไป

3.2.6 สามารถใช้วัสดุหมักราคาถูกเป็นแหล่งอาหารได้

3.2.7 ใช้ระยะเวลาสั้นในการหมักและการเพิ่มจำนวนเซลล์

3.2.8 สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

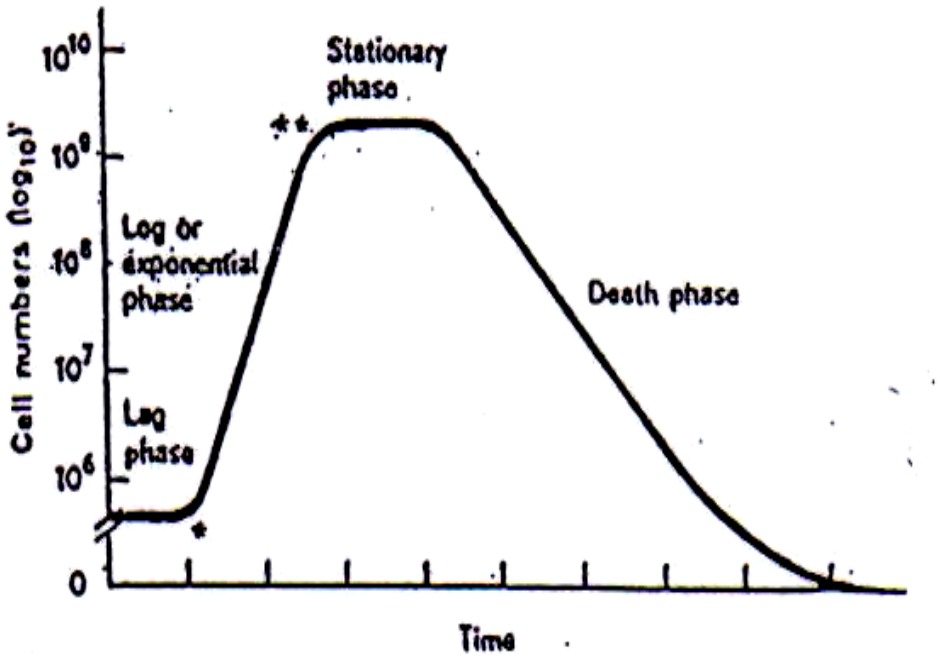
3.2.9 มีการผลิตเอนไซม์ได้มากชนิดในเซลล์ ทำให้ความสามารถมีขอบเขตที่กว้าง

3.2.10 มีลักษณะการดำเนินชีวิตแบบไม่คงที่ แปรเปลี่ยนได้ง่ายและรวดเร็ว กล่าวคือสามารถเจริญเติบโตเร็วและตายเร็วด้วยเช่นกัน

3.2.11 มีความสามารถในการปรับตัวกว้างพอสมควรเพราะในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้มีสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ชนิดและปริมาณสารเคมีต่างๆ

3.3 วงจรการเติบโตของจุลินทรีย์

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มักแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็นระยะต่างๆ 4 ระยะ ดังภาพที่ 1 (วราวุฒิ, 2529; สาโรจน์, 2538)



ภาพที่ 1 วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
ที่มา: วราวุฒิ (2529)

3.3.1 ระยะปรับตัว (lag phase) เป็นช่วงเวลาที่เซลล์จุลินทรีย์ปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมเมื่อมีการถ่ายจุลินทรีย์ไปยังแหล่งอาหารใหม่ ในช่วงนี้อัตราการขยายขนาด (rate of growth) สูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (rate of multiplication) ดังนั้นขนาดของเซลล์ในช่วงนี้จึงมีขนาดใหญ่กว่าของเซลล์ในช่วงอื่นๆ ในการหมักโดยทั่วไปมักต้องการระยะปรับตัวที่สั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ความสมบูรณ์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของกล้าเชื้อ เป็นต้น ในช่วงท้ายของระยะปรับตัวเซลล์จะมีการแบ่งตัวประมาณ 4-5 ครั้ง ก่อนเข้าสู่ช่วงระยะการเติบโตต่อไป เรียกระยะนี้ว่าระยะเร่งตัว (acceleration phase)

3.3.2 ระยะเติบโตทวีคูณ (logarithmic or exponential phase) เป็นระยะที่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ในสภาพสมดุล (balance growth) เรียกระยะนี้ว่าระยะคงที่ (steady state period) แต่ความเป็นจริงสภาวะนี้เป็นเพียงทฤษฎีเท่านั้นเพราะในทางปฏิบัติสภาวะเช่นนี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากส่วนประกอบและขนาดของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในระหว่างการหมัก สภาวะเช่นนี้จึงเป็นสมมติฐานที่เกิดขึ้นและสามารถรักษาให้คงที่ได้ในระยะเติบโตทวีคูณเท่านั้น ในตอนท้ายของระยะนี้สารอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ หมดลงหรือสภาวะแวดล้อมรอบจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม มีการสะสมสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึ่มมากขึ้น ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงต่ำลง การเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรือเกิดขึ้นอย่างช้าๆก็ได้ ซึ่งช่วงนี้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะเริ่มลดลงโดยที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เรียกระยะนี้ว่าระยะถดถอย (deceleration or retardation phase)

3.3.3 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงที่จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ที่จุดสูงสุด เพราะเป็นระยะที่อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับอัตราการตายของเซลล์ จำนวนเซลล์จึงมีค่าคงที่ ซึ่งระยะนี้มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ

3.3.4 ระยะตาย (death or declining phase) ในระยะนี้เซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์จะต่ำกว่าอัตราการตายรวมทั้งมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้นด้วย

3.4 อาหารที่เหมาะสมของจุลินทรีย์

ลักษณะอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ดี (กำเนิด, 2534) มีดังนี้

3.4.1 มีสารอาหารและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์

3.4.2 ควรมีสารอาหารที่ใกล้เคียงกับอาหารตามธรรมชาติ เพราะทำให้ช่วงเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์สั้น จึงสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้เร็วขึ้น

3.4.3 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

3.4.4 มีความชื้นที่เหมาะสมถ้าทำการหมักแบบแห้ง

3.4.5 ต้องไม่มีสารที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นปริมาณมาก

3.4.6 ปราศจากสารพิษและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

3.4.7 ให้ผลผลิตหรือชีวมวลมากที่สุดต่อหน่วยน้ำหนักของอาหารที่ใช้ ให้ผลผลิตต่อชีวมวลและอัตราเร็วในการเกิดผลผลิตสูง

3.4.8 มีราคาถูก มีคุณสมบัติคงที่ มีปริมาณมาก และหาซื้อได้ง่ายตลอดปี

3.4.9 ทำให้เกิดปัญหาในการผลิตน้อยที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการให้อากาศ การกวน การสกัด และทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์รวมทั้งน้ำเสียที่เกิดขึ้นด้วย

3.5 แหล่งอาหารของจุลินทรีย์

3.5.1 แหล่งไนโตรเจน หมายถึง สารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน เกลือแอมโมเนียมต่างๆ เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการและมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

3.5.2 แหล่งคาร์บอน หมายถึง สารประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์โบไฮเดรต คาร์บอนไดออกไซด์ เกลือคาร์บอเนต โปรตีน ไขมัน เป็นต้น ซึ่งเซลล์จะใช้สารประกอบจากแหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน

3.5.3 แหล่งพลังงาน จุลินทรีย์ต้องการแหล่งพลังงานเพื่อนำมาสังเคราะห์ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ แหล่งพลังงานที่เซลล์ได้รับอาจมาจากแสงแดด การออกซิไดซ์สารประกอบบางชนิด ขบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ (โดยเฉพาะพวกแป้ง น้ำตาล)

3.5.4 แหล่งเกลือแร่ จุลินทรีย์มีความต้องการเกลือแร่ในปริมาณน้อย เนื่องจากเกลือแร่บางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่าง เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ฟอสฟอรัส (P) แมกนีเซียม (Mg) ซึ่งเป็นเกลือแร่ที่จำเป็นมากเพราะเป็นตัว

เร่งปฏิกิริยาในการสร้างและถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ เกลือแร่สามารถแบ่งออกเป็นอีก 2 ประเภท คือ

ก. เกลือแร่ที่จุลินทรีย์ต้องการปริมาณพอควร (major element) บางครั้งอาจจำเป็นต้องเติมเพิ่มลงไปในอาหาร เช่น P, Mg, Ca, K, S, Na เป็นต้น

ข. เกลือแร่ที่จุลินทรีย์ต้องการเพียงเล็กน้อย (minor element) มักไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารอีก เพราะอาจมีปะปนมากับวัสดุหมักอยู่เพียงพอแล้ว เช่น Fe, Co, Cu, Mn, Zn, Mo, B เป็นต้น

3.5.5 แหล่งอาหารเสริม หมายถึง อาหารเสริมที่จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ แต่มีความจำเป็นในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน เป็นต้น

4. <u>ถังหมัก (Fermentor)</u>

ถังหมัก (fermentor) คือ ภาชนะที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ สามารถบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมากได้เท่าที่ต้องการและสามารถควบคุมสภาวะในถังหมักให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รูปร่างของถังหมักสามารถมีรูปร่างแตกต่างกันไป แต่ที่นิยมใช้กันมาก คือ รูปร่างเป็นทรงกระบอกวางในแนวตั้ง มีทั้งขนาดเล็กที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale) ระดับโรงงานต้นแบบ (pilot scale) และระดับโรงงานผลิต (factory scale) (กำเนิด, 2534)

วัสดุที่ใช้ทำถังหมักต้องทนต่อการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนได้อย่างดี อาจทำด้วยแก้วซึ่งมีคุณสมบัติที่ดี คือ ผิวเรียบ ไม่เป็นพิษ ไม่ผุกร่อน สามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงภายในได้ เหมาะแก่การใช้ในระดับปฏิบัติการ ส่วนวัสดุที่ใช้ทำถังหมักในขนาดโรงงานต้นแบบหรือระดับโรงงานผลิตมักทำด้วยเหล็กไร้สนิมหรือบุด้วยเหล็กไร้สนิมเพื่อป้องกันการผุกร่อน บางกรณีอาจทำด้วยเหล็กอ่อนแล้วบุผิวด้วยแก้วหรือสารฟีนอลิกอีพอกซี (phenolic epoxy) นอกจากนี้ยังมีการใช้พลาสติก ไม้ หรือคอนกรีตในการสร้างถังหมักด้วย

4.1 คุณลักษณะของถังหมัก ควรมีดังนี้ (กำเนิด, 2534; Raghavaroa et al., 2003)

4.1.1 สามารถใช้งานได้เป็นระยะเวลานานในการหมัก อายุการใช้งานนาน และไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน

4.1.2 มีระบบอื่นๆที่จำเป็นสนับสนุน เช่น การกวน การควบคุมอุณหภูมิ การปรับค่าพีเอช การปรับความชื้น เป็นต้น

4.1.3 ใช้แรงงานและพลังงานน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้

4.1.4 สามารถเก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักได้โดยไม่เกิดการปนเปื้อน

4.1.5 สามารถใช้งานได้สะดวกทั้งเรื่องการจัดเรียงวัสดุหมักและการเก็บผลิตภัณฑ์

4.1.6 ควรใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ได้หลายประเภท

4.1.7 ผิวด้านในของถังหมักควรเรียบ รอยต่อเป็นแบบเชื่อมและขัดเรียบ ไม่ต่อแบบซ้อนกัน

4.1.8 ถังหมักควรมีรูปร่างแบบเดียวกันทั้งขนาดเล็ก และขนาดใหญ่เพื่อความสะดวกในการเพิ่มกำลังการผลิต

4.1.9 ใช้วัสดุราคาถูก มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งปกติจะใช้เหล็กไร้สนิม

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับกระบวนการหมักแบบแห้ง

1. ความหมายของกระบวนการหมักแบบแห้ง (Solid-state fermentation)

กระบวนการหมักแบบแห้ง หมายถึง กระบวนการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนวัสดุหมักในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระ (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) ไม่รวมถึงการหมักในของเหลวที่มีปริมาณของแข็งไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูง ดังนั้นน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักแบบแห้งนี้จะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่บนวัสดุหมักเท่านั้น ปริมาณน้ำในกระบวนการหมักแบบแห้งจึงต่ำซึ่งเหมาะต่อการหมักด้วยจุลินทรีย์ราเป็นส่วนใหญ่ กระบวนการหมักแบบแห้งสามารถประยุกต์ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตเอนไซม์ การผลิตโคจิ การผลิตกรดอินทรีย์ การผลิตอาหารหมัก การผลิตปุ๋ยหมัก หรือใช้ในการกำจัดสารพิษที่เป็นอันตรายซึ่งอยู่ในวัสดุทางการเกษตร เป็นต้น (Pandey et al., 2000)

2. ลักษณะของกระบวนการหมักแบบแห้ง

2.1 วัสดุหมักที่นิยมใช้ในกระบวนการหมักแบบแห้ง มักเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชหรือสัตว์ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง เช่น ข้าวสาลี ข้าว ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง ฯลฯ เพื่อใช้หมักเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร (Yovita et al., 2005) บางกรณีอาจมีการเติมสารอาหารอื่นๆเพิ่มเข้าไปอีก เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ เป็นต้น

2.2 วัสดุหมักที่นิยมมักมีขนาดที่เหมาะสมเพื่อให้มีช่องว่างระหว่างวัสดุหมักเพียงพอให้อากาศถ่ายเทได้ดี

2.3 การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียลดน้อยลง เพราะในระบบการหมักมีความชื้นต่ำซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของราแต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

2.4 ในกระบวนการหมักแบบแห้งมักเกิดปัญหาความร้อนสะสม ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักแบบแห้งเพื่อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ตาย นอกจากนี้อาจต้องควบคุมปริมาณออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ฯลฯ เป็นต้น

3. <u>ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการหมักแบบแห้ง</u> (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532; กำเนิด, 2534)

3.1 ต้นเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) ซึ่งเตรียมให้อยู่ในรูปของสปอร์ต้องมีอัตราการงอก (germination) ที่รวดเร็วและมีลักษณะเดียวกัน (uniform) สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

3.2 ความชื้นของวัสดุหมักต้องปรับให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และต้องพยายามควบคุมให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะตลอดเวลา ถ้าความชื้นมากไปอาจทำให้การถ่ายเทอากาศในวัสดุหมักไม่ดี ผลการหมักก็จะลดต่ำลงด้วย

3.3 ถังหมักที่ใช้ต้องเลือกให้ตรงกับวัตถุประสงค์ของการหมักและกำลังการผลิตที่ต้องการ แต่ควรมีการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความเหมาะสมของระบบพร้อมทั้งประเมินความเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐศาสตร์

3.4 การเตรียมวัสดุหมักต้องเตรียมเพื่อปรับเปลี่ยนสภาพของวัสดุหมักให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายและใช้ได้ง่าย เช่น วัสดุหมักต้องมีขนาดพอเหมาะต่อการถ่ายเทมวลและความร้อน ถ้ามีขนาดใหญ่ไปทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยสลายได้เต็มที่ ประสิทธิภาพการหมักก็ลดลง เป็นต้น

3.5 การถ่ายต้นเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้หัวเชื้อที่อยู่ในรูปที่เหมาะสม เช่น กระบวนการหมักแบบแห้งมักใช้ราในการหมัก หัวเชื้อราควรอยู่ในรูปของสปอร์ที่มีอัตราการงอกเป็นเส้นใยสูง

3.6 การส่งถ่ายมวลและความร้อนต้องสามารถทำได้สะดวก

3.7 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแห้งไม่ได้อยู่ในรูปของเหลว การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์อาจแตกต่างไปจากการหมักแบบเหลวซึ่งขึ้นกับลักษณะของผลิตภัณฑ์และความต้องการเป็นสำคัญ เช่น ถ้าผลิตภัณฑ์สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงอาจจำเป็นต้องทำให้แห้ง ซึ่งกรณีนี้ไม่จำเป็นต้องแยกน้ำออกมาก่อน แต่ถ้าผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ต้องทำการสกัดเอนไซม์ออกมาก่อนด้วยตัวทำละลาย เป็นต้น

4. <u>ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักแบบแห้ง</u>

กระบวนการหมักแบบแห้งมีข้อดีและข้อเสีย (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532; Hesseltine, 1972; Mitchell et al., 1992) ดังต่อไปนี้

4.1 ข้อดีของกระบวนการหมักแบบแห้ง

4.1.1 วัสดุหมักสามารถหาได้ง่าย เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี หรือเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรหรืออาจเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมต่างๆ

4.1.2 ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งอุปกรณ์เครื่องมือในการหมักไม่มาก

4.1.3 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขนายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยากและไม่ต่างจากวิธีที่ใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1.4 ต้นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มักอยู่ในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับเตรียมต้นเชื้อซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

4.1.5 สภาวะการเจริญของราในกระบวนการหมักแบบแห้งคล้ายคลึงกับสภาวะที่ราสามารถเจริญเติบโตได้ในธรรมชาติ ดังนั้นระยะเวลาในการปรับตัวของราจึงสั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี

4.1.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรง ใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก การทำการสกัดอาจทำได้ทันทีโดยเติมสารละลายลงไป หรืออาจนำมาเก็บแช่แข็งไว้ก่อนนำมาสกัดภายหลังก็ได้ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องแยกออกจากวัสดุหมักก่อน

4.1.7 ปริมาตรของถังหมักมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลที่ได้ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อยและมีสารอาหารอยู่ในปริมาณเข้มข้น ทำให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนและปฏิบัติการน้อยลง

4.1.8 วัสดุหมักซึ่งมีความชื้นต่ำ ทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย เป็นต้น จึงไม่ค่อยมีความจำเป็นในการเข้มงวดเรื่องการฆ่าเชื้อก่อนทำการหมัก

4.2 ข้อเสียของกระบวนการหมักแบบแห้ง

4.2.1 มีความจำกัดชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งกระบวนการหมักแบบแห้งต้องการจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความชื้นต่ำ ทำให้การเลือกใช้จุลินทรีย์ไม่สามารถทำได้สะดวก ส่วนมากใช้ราเพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความชื้นต่ำ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น ยีสต์ แบคทีเรีย

4.2.2 มักเกิดปัญหาความร้อนสะสมเมื่อทำการหมักในปริมาณมาก เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนไม่ดี ถ้าผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์อาจโดนทำลายด้วยความร้อน (Santos et al., 2004) และมีปัญหาในเรื่องการถ่ายเทมวลด้วย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน สารอาหาร ฯลฯ (Raghavarao et al., 2003) นอกจากนี้ยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการถ่ายเทของสารต่างๆ และข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการเกิดปฏิกิริยาในการหมักแบบแห้ง (Pandey, 2003)

4.2.3 การติดตามตัวแปรต่างๆในการหมักแบบแห้งทำได้ยาก เช่น ค่าพีเอช ความเข้มข้นของสารอาหาร การหามวลของเส้นใย เป็นต้น

4.2.4 ต้นเชื้อสปอร์จำเป็นต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะได้ผลดี

4.2.5 วัสดุหมักจำเป็นต้องผ่านการแปรสภาพก่อนเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น การทำให้มีขนาดเล็กลง การนึ่งให้วัสดุหมักสุก เป็นต้น

4.2.7 สมการการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงไม่สามารถออกแบบหรือกำหนดสภาวะที่เหมาะสมได้

4.2.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบแห้งมักเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าค่อนข้างต่ำ

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรา

1. ความหมายของรา

ฟังไจ (fungi) เป็นคำเรียกแทนจุลินทรีย์จำพวก รา ราเมือก ยีสต์ เห็ด ไว้ด้วยกัน หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เชื้อรา (พิไลพรรณ, 2525)

รา อาจหมายถึงกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่มีสปอร์ มีเซลล์เป็นแบบยูคาริโอต (eukaryote) คือ มี nuclear membrane คล้ายเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่น พืช สัตว์ เป็นต้น และอาจมีเซลล์เดียว เช่น ยีสต์ หรือมีหลายเซลล์ก็ได้ เช่น พวกที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย (filamentous) ที่ผนังเซลล์ประกอบไปด้วยสารพวกเซลลูโลสหรือไคติน มีอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้ง 2 อย่างก็ได้ ราส่วนใหญ่สร้างสปอร์เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ซึ่งมีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (วิจัย, 2546)

2. ลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์รา

2.1 ไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้

2.2 มีรูปร่างเป็นแบบ filament เรียกว่า เส้นใย (hyphae) เมื่อเส้นใยรวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า มัยซีเลียม (mycelium) ซึ่งจะพัฒนาต่อกลายเป็นเนื้อเยื่อ (บางครั้งเส้นใยของราสามารถเปลี่ยนรูปร่างได้เพื่อทำหน้าที่พิเศษบางอย่าง) ความหนาของเส้นใยแตกต่างกันไปตั้งแต่เส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 0.5 ไมโครเมตรจนถึงใหญ่กว่า 100 ไมโครเมตร ความยาวอาจยาวเพียง 2-3 ไมโครเมตร หรือยาวหลายๆ เมตรได้

2.3 มีนิวเคลียสแบบ eukaryotic nucleus คือ นิวเคลียสมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสห่อหุ้มไว้

2.4 มีผนังเซลล์

2.5 มีการสร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์

3. <u>การดำรงชีพของรา</u>

เนื่องจากราไม่มีคลอโรฟิลล์จึงไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้เอง การดำรงชีพของราจึงต้องพึ่งสารอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หรือจากซากพืช สัตว์ ราต่างชนิดกันมีความต้องการสารอาหารไม่เหมือนกัน (พิไลพรรณ, 2525) ราบางชนิดสามารถใช้สารอาหารได้หลายประเภท เช่น ราพวก *Penicillium sp.* และ *Aspergillus sp.* สามารถเจริญได้ตั้งแต่ในแยมผลไม้จนถึงบนเครื่องหนัง แต่บางชนิดมีความจำเพาะต่อสารอาหาร คือ สามารถเจริญในสารอาหารไม่กี่ชนิด ถ้าเปลี่ยนสารอาหารอาจทำให้ไม่เจริญเติบโตได้

สารอาหารที่ราต้องการมีด้วยกันหลายประเภท ส่วนมากราเจริญได้ดีในแหล่งอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงหรือมีแหล่งคาร์บอนมาก (พิบูลย์, 2541) แหล่งคาร์บอนพบได้จากสารพวกแป้ง น้ำตาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับราเกือบทุกชนิด ส่วนแหล่งอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจน ซึ่งรานำสารประกอบไนโตรเจนมาใช้ในการสร้างโปรตีน สารประกอบไนโตรเจนได้มาจากสารประกอบอินทรีย์ของไนโตรเจน แอมโมเนีย หรือพวกไนเตรต เป็นต้น นอกจากนี้รายังต้องการแหล่งวิตามินมาใช้ในการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ด้วย การใช้สารอาหารของราทำได้โดยราปล่อยน้ำย่อยหรือพวกเอนไซม์ออกมาย่อยสารแล้วทำการดูดซึมมาใช้ ซึ่งสารอาหารจะสะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจนหรือ oil

สภาวะแวดล้อมในการเจริญของราต้องมีความเหมาะสม (พิไลพรรณ, 2525) ราจะเจริญในที่มีความชื้นพอสมควร น้ำที่อยู่ในรูปความชื้นมีหน้าที่ในการรักษาความดันภายในเซลล์ให้คงที่ช่วยให้อัตราการแตกกิ่งและการเพิ่มเส้นใยคงที่ (Gervais and Molin, 2003) ราสามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 0 ถึง 70 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เจริญเติบโตในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญของราลดลง ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ราเกือบทุกชนิดถูกฆ่าตายหมด (เป็นการหยุดกระบวนการหมักของราได้) แต่สปอร์ของรายังอยู่ ถ้าต้องการกำจัดสปอร์ราต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีค่าพีเอชประมาณ 5-6 และส่วนมากราไม่ต้องการพลังงานแสงมาใช้แต่ต้องการออกซิเจนหรืออากาศเป็นอย่างมากในการเจริญเติบโต สภาพทางกายภาพและความต้องการอาหารของรา แสดงได้ดังตารางที่ 1

4. <u>อาหารเลี้ยงรา (Fungus culture medium)</u>

หมายถึง วัตถุใดก็ตามที่นำไปเลี้ยงราแล้วสามารถทำให้ราเจริญได้ดี และปราศจากจุลินทรีย์อื่นๆขึ้นปะปน

4.1 คุณสมบัติที่ดีของอาหารเลี้ยงรา (พิบูลย์, 2541) พิจารณาจาก

4.1.1 ส่วนประกอบของธาตุอาหารและความเข้มข้น

4.1.2 ระดับพีเอชของอาหาร

4.1.3 อัตราของออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงความชื้นและอุณหภูมิ

4.1.4 ความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น

<u>ตารางที่ 1</u> ความต้องการสภาวะแวดล้อมและสารอาหารของรา

ความต้องการของรา	ค่า
pH :	
Range	2-9
Optimum	5.6
Temperature :	
Range	0-62 ^{0}C
Optimum	22-30 ^{0}C
Gases	strictly aerobic
Light	none
Sugar concentration in medium	4 %
Carbon	Heterotrophic

ที่มา: สุพจน์ (2545)

4.2 ประเภทของอาหารเลี้ยงรา แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

4.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อตามธรรมชาติ (natural media) คือ อาหารที่ประกอบไปด้วยสารตามธรรมชาติ อาจได้จากชิ้นส่วนของพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ด้วยกัน และไม่ทราบอัตราส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน

4.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic media) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีในปริมาณแน่นอน

การเลือกประเภทและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของราที่ต้องการเลี้ยงและสิ่งที่ต้องการศึกษา เพราะอาหารแต่ละประเภทและแต่ละสูตรมีความเหมาะสมต่อราแตกต่างกัน เมื่อได้อาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว สิ่งที่ต้องทำในขั้นตอนต่อไป คือ การฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (พิบูลย์, 2541) ซึ่งทำได้ 2 วิธีด้วยกัน คือ

ก. วิธีทางฟิสิกส์ (physical methods) โดยการใช้ความร้อนหรือการกรอง การกรองเป็นวิธีการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมแก่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ระเหยได้ง่ายหรือเสื่อมสลายได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน แต่ที่นิยมใช้ในการฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ การใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อซึ่งใช้ในรูปของไอน้ำร้อน เพราะสามารถแทรกซึมผ่านเข้าทำลายจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้ดี และไม่ทำให้น้ำซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อสูญหายไป เช่น การฆ่าเชื้อโดยให้หม้อนึ่งไอ (autoclave sterilizer) เป็นการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนในหม้อนึ่งที่ทนความดันได้สูง จุลินทรีย์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 15 นาที บางครั้งการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนอาจต้องทำการฆ่าเชื้อหลายครั้ง เช่น วิธีการฆ่าเชื้อแบบอาร์โนลด์ (Arnold sterilization) เป็นการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำการฆ่าเชื้อนาน 20 นาทีต่อ 1 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน (แต่ละครั้งเว้นให้ห่างกัน 24 ชั่วโมง) วิธีนี้เหมาะต่อการฆ่าเชื้อแก่อาหารเลี้ยงเชื้อพวกเยลาติน นม และคาร์โบไฮเดรตต่างๆ เพราะหากใช้อุณหภูมิสูงเกินไป ทำให้เกิดการแตกตัวของสารประกอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่แข็งตัวเมื่อทิ้งไว้ให้เย็น การฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 เป็นการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด แต่ยังหลงเหลือสปอร์อยู่ ซึ่งสปอร์จะงอกใหม่ภายใน 24 ชั่วโมง จึงต้องทำการฆ่าเชื้อเป็นครั้งที่สองทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นเซลล์และสปอร์ถูกทำลายหมด และเพื่อความแน่นอนอีกครั้งหลังผ่าน 24 ชั่วโมงจึงทำการฆ่าเชื้อครั้งสุดท้ายเป็นครั้งที่ 3

ข. วิธีทางเคมี (chemical methods) เป็นวิธีการที่นิยมเหมือนกัน และใช้ได้ผลมากพอควร แต่มีข้อเสีย คือ สารเคมีที่ใช้อาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และพืช และสารเคมีบางชนิดยังมีราคาแพง สารเคมีที่ใช้ เช่น สารโปรไพลีนออกไซด์ (propylene oxide) ใช้ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของวุ้น เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์และสารประกอบของเกลือแคลเซียมหรือโซเดียมไฮโปคลอไรด์ใช้ฆ่าเชื้อบนโต๊ะปฏิบัติการ หรือใช้ด่างทับทิม 5 กรัมผสมฟอร์มาลินเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำไปวางทิ้งในตู้เขี่ยเชื้อก่อนใช้งาน 5 วัน เป็นต้น

5. <u>การสืบพันธุ์ของรา</u>

การสืบพันธุ์ของราสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ (พิไลพรรณ, 2525; สุพจน์, 2545) คือ

5.1 แบบไม่อาศัยเพศ แบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

5.1.1 การฉีกขาดของเส้นใย (fragmentation) เส้นใยที่เกิดการฉีกขาดแต่ละเส้นสามารถงอกเป็นเส้นใยใหม่ได้อีก

5.1.2 การแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อ พบได้ในยีสต์

5.1.3 การแบ่งเซลล์ตามขวาง (Transverse fission) คือ การแบ่งเซลล์ตามขวางจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์

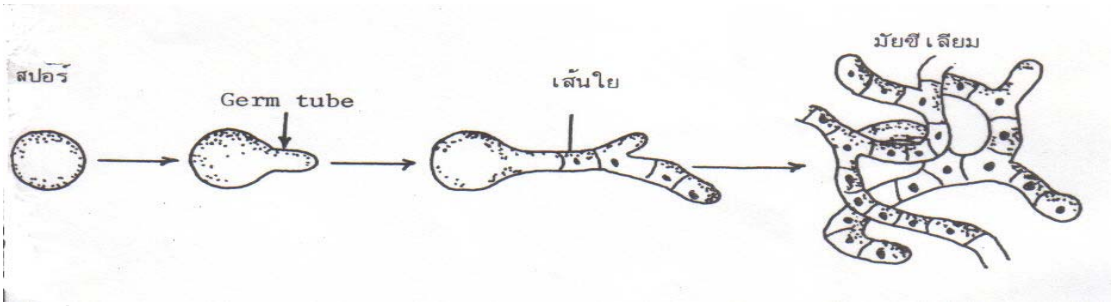
5.1.4 การสร้างสปอร์ (Sporulation) ซึ่งสปอร์ที่สร้างขึ้นเกิดโดยไม่มีการผสมกันทางเพศ

5.2 แบบอาศัยเพศ

เป็นการสร้างสปอร์ซึ่งเกิดขึ้นจากการสืบพันธุ์โดยใช้เพศ แบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 พลาสโมกามี (plasmogamy) เป็นระยะนำเอานิวเคลียสสองอันที่สอดคล้องกันมาไว้ในโปรโตพลาส (protoplast) หรือเซลล์เดียวกันด้วยวิธีการต่างๆ ระยะที่ 2 คารีโอกามี (karyogamy) เป็นระยะที่นิวเคลียสทั้งสองถูกทำให้รวมตัวเป็นตัวเดียวกันได้เป็นดิพลอยไซโกตนิวเคลียส (diploid zygote

nucleus) ระยะที่ 3 ไมโอลิส (meiosis) เป็นการแบ่งเพื่อลดจำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสลงให้ได้นิวเคลียสอยู่ในระยะแฮพลอย (haploid state) จึงมีการงอกเจริญเติบโตไปเป็นเส้นใยต่อไปได้ ซึ่งการรวมตัวของนิวเคลียสของราเกิดขึ้นจากเซลล์เพศผู้และเพศเมียจับคู่กัน ปกติสปอร์เพศไม่ถูกสร้างขึ้นมาบ่อยนักและมีจำนวนน้อยกว่าสปอร์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับเพศ สปอร์เพศอาจถูกสร้างขึ้นเฉพาะภายใต้สภาวะพิเศษบางอย่างเท่านั้น

โดยเมื่อสปอร์ของราอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา สปอร์จะสร้าง germ tube ขึ้น ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นเส้นยาวออกไปเป็นเส้นใย เมื่อเส้นใยเติบโตขึ้นก็มีการแตกกิ่งก้านสาขาจนเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า มัยซีเลียม ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การงอกของสปอร์
ที่มา: พิไลพรรณ (2525)

6. ประโยชน์และโทษของรา

ประโยชน์และโทษของรา (พิไลพรรณ, 2525; กำเนิด, 2534; สุพจน์, 2545) มีดังนี้

6.1 ประโยชน์ของรา

6.1.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เทมเป้ อองจอม ฮามานัตโต ซูพู เป็นต้น ใช้งานด้านโภชนาการในการปรับปรุงคุณภาพของอาหาร เช่น เพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหารให้มากขึ้น หรือใช้เป็นอาหารโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein)

6.1.2 ใช้ในการผลิตเอนไซม์ เช่น โปรติเอส อะไมเลส เปปติเดส ไลเปส

6.1.3 ใช้ในการผลิตสารเคมี เช่น วิตามิน กรดซิตริก กรดกลูโคนิค และกรดอินทรีย์อื่นๆ

6.1.4 ใช้ผลิตยา เช่น ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เพนนิซิลลิน (penicillin) คลาวาซิน (clavacin) เซฟาโลสปอริน (cephalosporin) ฟูมากิลลิน (fumagillin) เป็นต้น

6.1.5 ใช้ในการวินิจฉัยโรค

6.1.6 ใช้ควบคุมแมลง เป็นการกำจัดและป้องกันแบบ biological control เช่น รา *Entomophthora grylli* ใช้กำจัดตั๊กแตน

6.2 โทษของรา

6.2.1 ทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ หรือพืช เกิดโรคได้ทั้งภายในร่างกาย เช่น รา *Aspergillus fumigatus* เข้าไปทำลายปอด พบทั้งในคนและนก แต่นกติดโรคนี้ได้ง่ายกว่าและเป็นพาหะนำโรคนี้สู่คนได้ และเกิดโรคภายนอกร่างกายตามเส้นผม เล็บ ผิวหนัง

6.2.2 สร้างสารพิษ เช่น *Aspergillus flavus* สร้างสารอัลฟาทอกซิน (aflatoxin) ในพืชจำพวกถั่ว ข้าว ทำให้ไขมันคั่งในตับ มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ตับ ซึ่งอาจทำให้เป็นโรคตับหรือมะเร็งตับได้ หรือราบางประเภทสร้าง mycotoxin ซึ่งมีพิษมาก ราบางชนิดสร้างสารจำพวก carcinogen ซึ่งทำให้เกิดโรคมะเร็ง

6.2.3 ทำลายสิ่งของ เครื่องใช้ เช่น ราเติบโตบนหนังสือหรือภาพวาด ทำให้เลนส์กล้องเป็นรอย นอกจากนี้ยังทำลายผลิตผลทางการเกษตร เช่น ทำลายส่วนที่เป็นเอมบริโอ ทำให้เมล็ดตาย และเปลี่ยนเป็นสีดำ วิธีแก้ไขอาจทำได้โดยเก็บวัตถุไว้ในที่มีความชื้นต่ำ หรือมีการเติมสาร antifungal agent ผสมลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้ราเกิดการเจริญเติบโต

7. รา *Aspergillus oryzae*

ราสายพันธุ์พวก *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักพบอยู่บนพวกผัก ผลไม้ และ

แหล่งอาหารอื่นๆ เป็นตัวการที่ทำให้อาหารหลายชนิดเสีย (พวงพร, 2546) แต่บางสายพันธุ์ก็มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากใช้ในอุตสาหกรรมหมักต่างๆ เช่น การผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว กรดซิตริก (citric acid) และกรดกลูโคนิค (gluconic acid) เป็นต้น รูปร่างทางสัณฐานวิทยาของราสายพันธุ์นี้มีมัยซีเลียมซึ่งแตกแขนงได้และมีผนังกั้น ส่วนเซลล์ด้านล่างจะจมอยู่ในอาหาร โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) หรือไฮฟาซึ่งเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (fertile hypha) จะเกิดขึ้นจากเซลล์เทา (foot cell) ซึ่งอาจจมอยู่ในอาหารเช่นกัน โคนิดิโอฟอร์อาจมีหรือไม่มีผนังกั้นแบ่ง ที่ยอดของโคนิดิโอฟอร์จะพองกลมขึ้นเป็นวิสิเคิล (visicle) มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไป และมีก้านเล็กๆ โผล่ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เรียกว่า สตีริกมาต้า (sterigmata) อาจมีชั้นเดียว (primary) หรือมี 2 ชั้น (primary และ secondary) โคนิเดียจะเกิดขึ้นจากสตีริกมาต้าและอยู่ติดต่อกันเป็นลูกโซ่ โคดิเนียอาจมีสีแตกต่างกันซึ่งเป็นลักษณะประจำของสายพันธุ์ย่อย โดยทั่วไปมักมีสีดำ น้ำตาล หรือเขียว เมื่อเติบโตโคโลนีไม่แผ่ขยายมาก สายพันธุ์ *Aspergillus* สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลสูง แสดงว่ารานี้สามารถสกัดน้ำที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโตจากสารที่ค่อนข้างแห้งได้ (สุพจน์, 2545)

รา *A. oryzae* ถูกแยกออกจากโคจิได้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1878 โดยนาย Ahlburg (มณีรัตน์, 2542) โดยรา *A. oryzae* มีองค์ประกอบดังตารางที่ 2 และได้มีผู้ทำการศึกษาราชนิดนี้อย่างกว้างขวางเพราะเป็นราที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำโคจิ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสได้สูงซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อคุณภาพของโคจิ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์อื่นๆได้อีก เช่น เซลลูเลส ไลเปส เปปติเดส และอินเวอร์เทส การเลี้ยงราในตู้บ่มพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (Francis et al., 2003) แต่การขยายขนาดการผลิตอาจทำการควบคุมอุณหภูมิได้ยาก

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของรา *Aspergillus oryzae*

ส่วนประกอบ	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	Ash
เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง	9.00	22.75	2.20	5.33

ที่มา: พิไลพรรณ (2525)

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า

1. รำข้าวสาลี (Wheat bran)

รำข้าวสาลีเป็นส่วนรวมของเปลือกเมล็ดข้าวสาลี เกิดจากระบวนการบดเมล็ดข้าวสาลีซึ่งมีรำข้าวเป็นองค์ประกอบประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ให้เป็นแป้ง รำข้าวสาลีจัดเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการขัดผิวข้าวซึ่งสามารถนำรำข้าวสาลีมาขายเป็นอาหารสัตว์ได้ (อรอนงค์, 2540) จึงมีผู้สนใจทำการศึกษาหาปริมาณองค์ประกอบสารอาหารในรำข้าวสาลี ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (ที่ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์
โปรตีน	11.8-14.5
ไขมัน	3.1-4.82
เถ้า	5.3-9.5

ที่มา: อรอนงค์ (2540)

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

เนื่องจากรำข้าวสาลีได้มาจากการโม่ข้าวสาลีให้กลายเป็นแป้ง แต่ในประเทศไทยปริมาณข้าวสาลีที่ปลูกมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในการใช้บริโภค จึงต้องสั่งนำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งสิ้น โดยนำเข้าในรูปข้าวสาลีชนิดผสมเป็นส่วนใหญ่ รองมาคือในรูปแป้งสาลีและกลูเตน รัฐบาลจึงมีการส่งเสริมให้มีการปลูกข้าวสาลีให้มากขึ้นรวมทั้งปรับปรุงคุณภาพข้าวสาลีให้มีมาตรฐาน เพราะข้าวสาลีพันธุ์เดียวกันแต่ปลูกในสถานที่ต่างกัน จะมีคุณภาพของเมล็ดแตกต่างกันได้ทั้งลักษณะทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน รวมทั้งการดูแลในขณะปลูก เช่น การให้น้ำและการใส่ปุ๋ย เป็นต้น

2. <u>รำข้าวเจ้า (Rice bran)</u>

รำข้าวเจ้าเป็นผลพลอยได้จากการขัดสีข้าวทั้งหมด มีทั้งรำหยาบ (hull) ซึ่งได้จากการขัดสีข้าวเปลือกครั้งที่ 1 เพื่อให้ได้ข้าวกล้องและรำละเอียด (bran) ซึ่งได้จากการขัดสีข้าวกล้องให้ได้ข้าวขาว (จุฬารัตน์, 2547) โดยมีองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวดังตารางที่ 4 รำข้าวที่เป็นส่วนเหลือทิ้งทั้งหมดมีประมาณ 5-9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณข้าวเปลือกที่ผ่านการขัดสี รำข้าวสามารถนำมาทำเป็นน้ำมันรำข้าวมีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวถึง 77 เปอร์เซ็นต์ โดยพวกนี้เป็นกรดไขมันจำเป็นถึง 31.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินอี วิตามินบี สารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นน้ำมันรำข้าวจึงเป็นน้ำมันคุณภาพดีและเป็นน้ำมันเพื่อสุขภาพ

องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวเจ้า มีการรายงานอย่างกว้างขวางจากกระบวนการขัดสีที่แตกต่างกัน มีดังต่อไปนี้

2.1 โปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน โปรตีนที่พบในรำข้าวมีถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่พบในเมล็ดข้าวทั้งหมด โดยปริมาณไลซีนในโปรตีนจากรำข้าวสูงกว่าข้าวขาวที่ผ่านการขัดสีแล้ว และพบกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงกว่าข้าวขาว นอกจากนี้มีปริมาณอัลบูมินจากโปรตีนสูงกว่าองค์ประกอบอื่นๆ จึงนิยมใช้รำข้าวเป็นส่วนประกอบสำคัญในการเพิ่มโปรตีนในอาหารของคนและสัตว์

2.2 คาร์โบไฮเดรตและลิกนิน คาร์โบไฮเดรตที่พบมักเป็นพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหรือเพนโตซาน มีปริมาณผสมอยู่เล็กน้อยอันเนื่องมาจากกระบวนการขัดสีข้าว เซลลูโลสและเพนโตซานที่พบในรำข้าวมีปริมาณใกล้เคียงกัน เพนโตซานประกอบไปด้วยน้ำตาลอะราบิโนสและไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบกาแลคโตสในปริมาณไม่มาก นอกจากนี้ยังพบลิกนินซึ่งเป็นเซลลูโลสตรงผนังเซลล์ของข้าว

2.3 ไขมัน พบชนิดและปริมาณไขมันในรำข้าวมากกว่าเมล็ดข้าว ไขมันที่พบในรำข้าว คือ กลีเซอรอล สเตอรอล และสฟิงกอล คิดเป็น 18-19 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดในรำข้าว ดังนั้นในอนาคตสามารถนำรำข้าวมาใช้ทำเป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันเพื่อการบริโภคได้

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

2.5 เกลือแร่ แร่ธาตุที่พบในรำข้าวพบฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบมากที่สุด รองมาคือ โพแทสเซียม แมกนีเซียม และซิลิกา ตามลำดับ ส่วนโซเดียม แคลเซียม และเหล็ก พบในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังพบซัลเฟอร์ แบเรียม โบรอน ตะกั่ว และสังกะสี

2.6 องค์ประกอบอื่นๆ องค์ประกอบอื่นๆ ที่พบ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งพบในปริมาณน้อย เป็นสารประกอบจำพวกวิตามิน แร่ธาตุ เฟวานอย หรือเอนไซม์ที่ช่วยปกป้องร่างกายจากอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระทำให้ร่างกายชะลอความแก่อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และยังสามารถกำจัดพวกไวรัสและแบคทีเรียได้ด้วย ซึ่งในรำข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 100 ตัว นอกจากนี้ยังพบสารให้กลิ่นซึ่งมีองค์ประกอบเป็นแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล เพนทานอล และเฮกซานอล และมีสารพวกคาร์บอนิล เช่น อะซิตัลดีไฮด์ อะซิโตน โพรพานาล บิวทานาล เพนทานาล และเฮกซานาล ซึ่งสารพวกคาร์บอนิลสามารถถูกออกซิไดซ์เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้เกิดการสะสมของแอลกอฮอล์ในรำข้าวเมื่อเก็บไว้นาน

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า

องค์ประกอบ	**เปอร์เซ็นต์ (ที่ความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์)**
โปรตีน	11.3-14.9
ไขมัน	15.0-19.7
เถ้า	6.6-9.9
คาร์โบไฮเดรต	34.62
เส้นใยหยาบ	7.0-11.4
เส้นใยอาหาร	24-29

ที่มา: อรอนงค์ (2540)

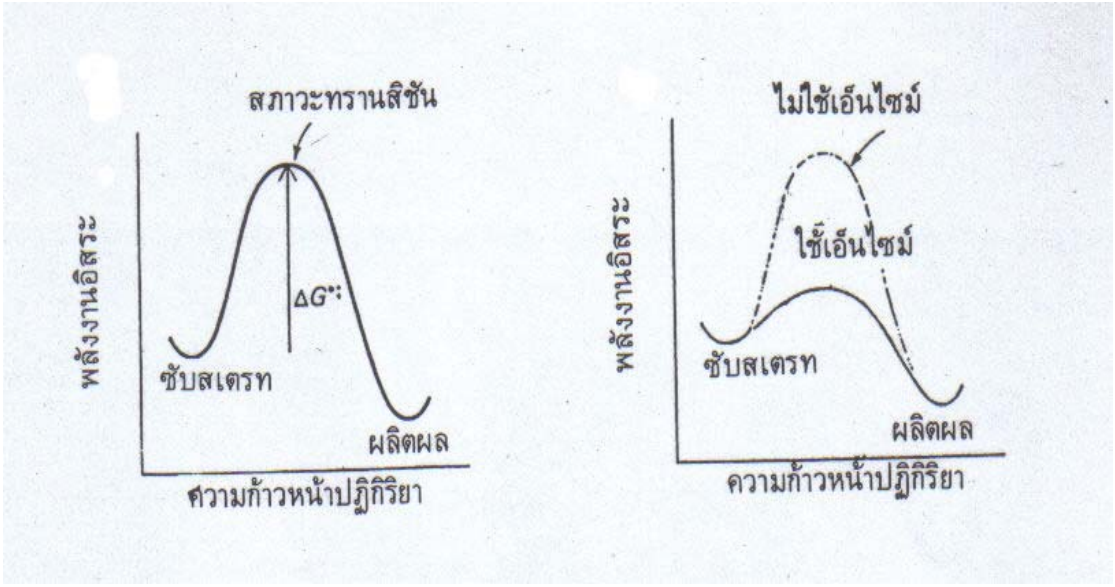
ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์

คำว่า enzyme แปลว่า in yeast (ประสงค์และคณะ, 2526) ที่นาย Friedrich Wilhelm Kuhn นำมาใช้เป็นครั้งแรกในปีค.ศ.1878 เพื่อใช้เรียกตัวเร่งปฏิกิริยาการหมักน้ำตาลโดยยีสต์ ต่อมาพบว่าปฏิกิริยาเคมีของการใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นในร่างกายต้องอาศัยตัวเร่งชนิดเดียวกันนี้ ดังนั้นเอนไซม์จึงไม่ได้หมายถึงตัวเร่งที่พบในยีสต์เท่านั้น แต่รวมถึงตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีอื่นๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย (biological catalysts) เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น (สุนันทา, 2547) ซึ่งจัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพหรือตัวเร่งอินทรีย์เพราะสังเคราะห์ขึ้นมาภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต หรือพูดอีกนัยหนึ่งว่าเอนไซม์เกิดจากสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ด้วยวิธีทางเคมี เอนไซม์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในขบวนการเมตาบอลิซึ่มของสิ่งมีชีวิต เพราะปฏิกิริยาในระบบต่างๆของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นเองได้ยากถ้าขาดเอนไซม์ เพราะสิ่งมีชีวิตต้องสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ให้ทันต่อความต้องการของร่างกายไม่เช่นนั้นก็ไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ ดังนั้นเอนไซม์จึงต้องมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่สูงมาก

เอนไซม์ปริมาณเพียงเล็กน้อยสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เป็นล้านเท่าหรือมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสด้วยเอนไซม์ invertase (sucrase) ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมากและไม่ต้องใช้ความร้อน แต่ถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี คือ กรดไฮโดรคลอริก ปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่ามากและต้องให้ความร้อนด้วยจึงเกิดผลิตภัณฑ์ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนระดับสมดุลของปฏิกิริยาได้ (chemical equilibrium) คือ ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นก็จริง แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จะคงที่ไม่ว่าปฏิกิริยานั้นจะมีเอนไซม์หรือไม่มีก็ตาม (ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเร็วเท่านั้น) นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ invertase ที่ได้กล่าวถึงไปแล้วมีความจำเพาะต่อน้ำตาลซูโครสเท่านั้น ถ้ามีไดแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น มาลโตสหรือแลคโตสปนมา เอนไซม์จะไม่ไฮโดรไลซ์น้ำตาลสองตัวนี้ แต่กรดไฮโดรคลอริกจะสลายพันธะไกลโคซิดิคทุกพันธะ และความจำเพาะของปฏิกิริยาจะมีต่อตัวซับสเตรทหรือสารตั้งต้นด้วย เช่น เอนไซม์อาจทำปฏิกิริยากับซับสเตรทเพียงชนิดเดียวหรือสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงสัมพันธ์กันได้

ในปี ค.ศ. 1926 นักเคมีชาวอเมริกา ชื่อ นาย James B.Sumner (เรืองลักขณา, 2545) สามารถสกัดเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ซึ่งไฮโดรไลซ์ยูเรียให้กลายเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาได้ และแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ยูรีเอสเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง จากนั้นได้มีการทดลองค้นคว้า

ต่างๆ จนสรุปว่า เอนไซม์ทุกชนิดมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลล์ และเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อน (globular protein) (พัชรา , 2541) ดังนั้นเอนไซม์จึงสามารถโดนทำลายได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆคล้ายโปรตีน ในเซลล์ปกติจะมีเอนไซม์ชนิดต่างๆประมาณ 3,000 ชนิด การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำได้โดยลดพลังงานกระตุ้น (activated energy) ของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งการที่สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ได้นั้นต้องผ่านสภาวะทรานสิชัน (transition state) ที่จุดนี้พลังงานจะสูงกว่าสารตั้งต้น ดังนั้นปฏิกิริยาต้องได้รับพลังงานที่มากกว่าความแตกต่างของพลังงานระหว่างสภาวะทรานสิชันและสารตั้งต้นหรือที่เรียกว่า พลังงานกระตุ้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อเอนไซม์ทำให้พลังงานกระตุ้นลดลง สารตั้งต้นจึงสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ง่ายขึ้น ปฏิกิริยาจึงเกิดเร็วขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 3



(ก) (ข)

ภาพที่ 3 (ก) พลังงานอิสระการกระตุ้น (ข) เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น
ที่มา: สุนันทา (2547)

ในอุตสาหกรรมต่างๆหลายประเภทมีการใช้เอนไซม์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือปฏิกิริยาอื่นที่ไม่สามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้ เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีกว่าของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยามากกว่าและไม่เป็นอันตรายเพราะเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันที่สูง (พัชรา, 2541) การทำงานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้องอาศัยความละเอียดอย่างมากเพราะตัวแปรที่เกี่ยวข้องมักเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเอนไซม์และโครงสร้างของเอนไซม์เองซึ่งมีโปรตีนเป็นสารองค์ประกอบ เอ น ไ ซ ม์ มี

มากมายหลายพันชนิด เอนไซม์ชนิดเดียวกันอาจผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ประเภทแล้วแต่กรรมวิธีในการผลิต

1. <u>การแบ่งประเภทของเอนไซม์</u>

คณะกรรมาธิการเอนไซม์นานาชาติ (The International Enzyme Commission, EC) ได้แบ่งเอนไซม์เป็น 6 ประเภท ดังนี้ (เรืองลักขณา, 2545)

1.1 เอนไซม์ที่โมเลกุลสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้สภาพที่เป็นตัวออกซิไดซ์หรือรีดิวส์ (oxidoreductases) ซึ่งใช้ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันระหว่างซับสเตรท 2 ชนิดใดในกระบวนการต่างๆ อาทิ การหายใจ การหมัก เป็นต้น ตัวซับเสตรทที่อยู่ในสภาพรีดิวส์จะถูกเอนไซม์ออกซิไดซ์ให้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น แล้วตัวเอนไซม์ก็จะกลายสภาพเป็นตัวรีดิวส์ โดยการกลับเข้าสู่สภาพเป็นตัวออกซิไดซ์ได้อีกนั้น ต้องมีตัวรับอิเล็กตรอนมารับอิเล็กตรอนไป

1.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการเคลื่อนย้ายหมู่ต่างๆ (transferases) จากตำแหน่งหนึ่งไปยังอีกตำแหน่งหนึ่ง

1.3 เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลาย (hydrolases) ใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำ (hydrolysis reaction) โดยดูว่าพันธะที่ถูกสลายนั้นเป็นพันธะชนิดใด เช่น ถ้าเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ เรียกเอนไซม์นั้นว่า เอสเทรอเรส (esterase) ถ้าย่อยสลายพันธะเปปไทด์ เรียกว่า เอนไซม์เปปทิเดส หรือถ้าย่อยสลายพันธะฟอสเฟท เรียกว่า เอนไซม์ฟอสฟาเทส เป็นต้น

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

1.5 เอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปไอโซเมอร์ของสาร (isomerases)

1.6 เอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมโมเลกุลบางชนิดเข้าด้วยกัน (ligases) เช่น โมเลกุลของกรดอะมิโนหรือกรดนิวคลีอิค เป็นต้น โดยการเชื่อมนี้ต้องมีพลังงานจากภายนอกมาช่วยด้วยหรือเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอน คาร์บอน-ซัลเฟอร์ เป็นต้น ซึ่งได้มาจากการตัดหมู่ฟอสเฟทหรือไพโรฟอสเฟทออกจาก ATP

2. <u>ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์</u>

ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ ความสามารถในการเลือกเกิดปฏิกิริยาและเลือกทำการเร่งปฏิกิริยากับซับสเตรทต่างๆ โดยความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับ (สุนันทา, 2547)

2.1 โครงสร้างของโมเลกุลซับสเตรท (สารตั้งต้น) โดยโครงสร้างของซับสเตรท ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

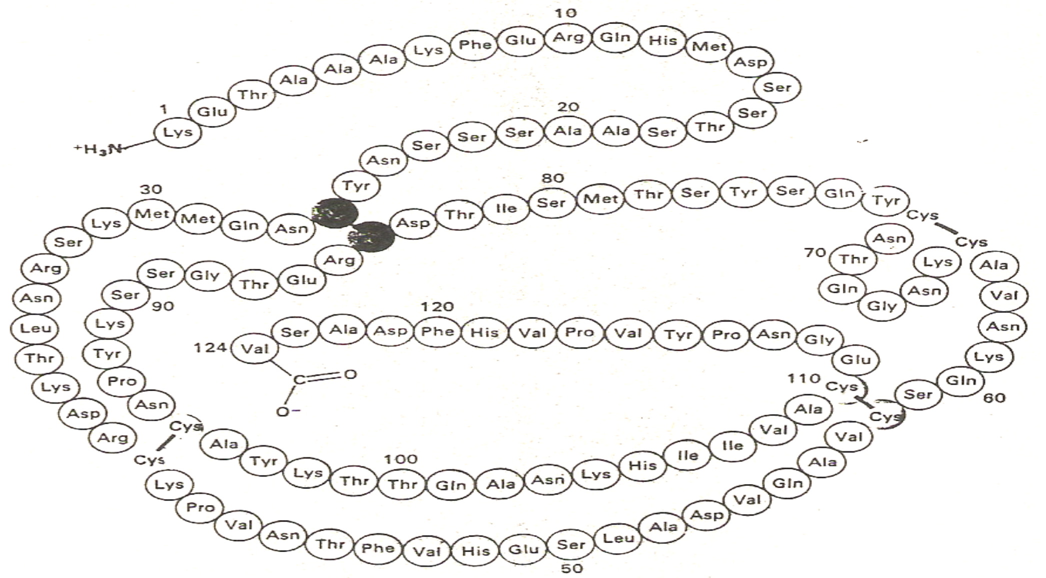
2.1.1 ส่วนที่จะไปจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ (binding group)

2.1.2 พันธะที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (susceptible bond) จากการกระทำของเอนไซม์

2.2 โครงสร้างของเอนไซม์ (conformation) เอนไซม์แต่ละชนิดมีโครงสร้างเฉพาะตัว และเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเหมือนกันทุกครั้งก่อนเข้าไปทำการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ต้องไม่ใช่สายโปรตีนที่ยาวเหยียดเป็นเส้นตรงแต่ต้องมีการคดงอที่จำเพาะ (specific folding) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมในการรวมตัวกับซับสเตรท ซึ่งทุกครั้งที่มีการเร่งปฏิกิริยาต้องเกิดการคดงอให้มีโครงสร้างแบบเดิมนี้ทุกครั้ง จึงสามารถทำการเร่งปฏิกิริยาได้ ดังภาพที่ 4

2.3 ลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site, substrate site หรือ catalytic site) เป็นตำแหน่งบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นแอ่งเล็กๆให้โมเลกุลซับสเตรทเข้าไปจับ ซึ่งจะเกิดแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อนระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท เช่น แรงแวนเดอวาลส์ พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน เป็นต้น บริเวณเร่งเป็นบริเวณที่มีการรวมกันของหมู่ R ของกรดอะมิโนซึ่งอยู่ใน

เปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ ทำให้หมู่ R มาอยู่ใกล้กัน เอนไซม์จึงมีการคดงออย่างจำเพาะเพื่อมีโครงสร้างพร้อมเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งซับสเตรทจะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่บริเวณนี้



<u>ภาพที่ 4</u> โครงร่างเอนไซม์ lysozyme ในไข่ขาวของไข่ไก่พร้อมกับการเรียงตัวของกรดอะมิโน
ที่มา: สุนันทา (2547)

3. <u>การหากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme assay)</u>

การหากิจกรรมของเอนไซม์เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ เพราะเอนไซม์ปริมาณหนึ่งๆประกอบด้วยเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้และไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ (สุนันทา, 2544)

การหากิจกรรมของเอนไซม์มักทำการหาหลังขั้นตอนการแยกและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ การหาค่ากิจกรรมนั้นใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทและโคแฟคเตอร์ค่อนข้างสูง เพื่อให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว โดยวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพราะมีความถูกต้องแม่นยำกว่าการติดตามซับสเตรทที่หายไป และจะวัดสะดวกยิ่งขึ้นถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารมีสีหรือสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น UV ได้ โดยใช้เครื่องมือสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ควรบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสารตลอดจนสภาวะที่ใช้ในการทดลองไว้ให้ชัดเจน คือ บอกความเข้มข้นของซับสเตรท เอนไซม์ โคแฟคเตอร์ อุณหภูมิ ค่าพีเอช หรือค่าต่างๆที่จำเป็นให้ละเอียด และมีคำที่ต้องรู้นิยาม ดังนี้

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

Specific activity มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน หรือ ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โดยค่า specific activity ที่สูงขึ้นหมายความว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

Yield (percent) เป็นการคิดเทียบความบริสุทธิ์ของขั้นตอนหนึ่งๆกับขั้นตอนแรก คิดจาก

$$\frac{\textit{ปริมาณ unit ทั้งหมดของขั้นตอนนั้น}}{\textit{ปริมาณ unit ทั้งหมดของขั้นตอนแรก}} x100$$

เอนไซม์ยิ่งมีความบริสุทธิ์มากเท่าใด นั่นคือ yield ที่ได้ยิ่งลดน้อยลง เพราะต้องผ่านกระบวนการอื่นๆในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

Purification factor เป็นตัวเลขที่บอกว่า เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการหนึ่งๆมีความบริสุทธิ์เป็นกี่เท่าของเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนแรก โดยคิดจาก

$$\frac{\textit{specific activity ของขั้นตอนนั้น}}{\textit{specific activity ของขั้นตอนแรก}}$$

โดยถือว่า purification factor ของขั้นตอนแรกเท่ากับ 1 เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนมากกว่าจะมีค่า purification factor มากตามด้วย คือ มีความบริสุทธิ์มากกว่า

4. <u>การใช้งานเอนไซม์ในอุตสาหกรรม</u>

ในอุตสาหกรรมหลายประเภทมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในการย่อยสารโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้ง โปรตีน ฯลฯ ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กลง โดยคุณสมบัติที่ดีของเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่เลือกทำปฏิกิริยาเฉพาะ เช่น การย่อยสลายเฉพาะที่ไม่เหมือนกับการย่อยสลายด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น กรดหรือด่างซึ่งจะย่อยสลายทุกอย่างหมด นอกจากนี้การหยุดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็ทำได้ง่ายโดยการเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพด้วยความร้อน และเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่ก่อพิษหรืออันตรายต่อผู้ผลิตหรือผู้ใช้ อุตสาหกรรมต่างๆที่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิต แสดงได้ดังตารางที่ 5 นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้ด้วย (นิลวรรณ, 2548) เช่น สามารถต้านการเกิดมะเร็ง ส่งเสริมระบบไหลเวียนของโลหิต กำจัดโลหะหนักที่ร่างกายได้รับและลดพิษของมัน ควบคุมการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการทำลายเซลล์เชื้อโรค (ปราณี, 2547) ใช้ตรวจวัดปริมาณสาร ใช้วินิจฉัยโรค ใช้เป็นตัวบ่งบอกทางพันธุกรรม (ประสงค์, 2526) เป็นต้น

<u>ตารางที่ 5</u> การใช้งานเอนไซม์

Process or Product	Enzyme Preparation
Alcohol	α-amylases, β-amylases, amyloglucosidase, β-glucanase, protease, cellulases
Amino acids	amino acid acylase (immobilized), protease with peptidases
Animal feed	Proteases, amylases, hemicellulases, β-glucanases
Beer	α-amylases, β-glucanases, amyloglucosidase, proteases
Bread	α-amylases, β-amylases, amyloglucosidase, fungal proteases, pentosanases
Bread preservation	Bacterial α-amylase, branching enzyme, β-glucanases, pentosanases, β-amylase
Cheese ripening	Lipases, proteases, peptidases
Cheesemaking	Animal and microbial rennet, lysozyme
Chicken feed	β-glucanases

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Process or Product	Enzyme Preparation
Citrus juices	Lowering viscosity or clarification: pectinases
	Eliminating bitterness: naringinase
Coffee	Extracts: β-glucanases
Cookies, crackers	α-amylases, protease
Dential hygiene	dextranase, mutase, glucanases, peroxidases
Detergents	Proteases, amylases
Egg products	Preservation: glucose oxidase, catalase
	Whippability: lipases
Fish curing	Pancreatin
Fish protein	Lowering viscosity of water extracts: protease
Flavors	From fruits: pectinases, hemicellulases, cellulases
	Form milk products: lipases, proteases
	In baked good: lipases
Fructose production	From inulin: inulinase
	From glucose: glucose isomerase
Fruit, vegetable pulps	Macerases
Glucose production	From starch: α-amylases, amyloglucosidase
Invert-sugar production	Invertase
Lactose	Milk hydrolysis: yeast lactase
Laundry detergents	Proteases, cellulases, lipases, amylases
Leather manufacture	Proteases, carbohydrases, lipases
Meat tenderizing	Proteases, especially papain
Milk	Cold sterilization: H_2O_2/catalase
Oils	Olive and ditrus oil production: pectinases
	Hydrolysis, transesterification: lipases
Plant pigment	Anthocyanin production: pectinases
Rubber	Proteases

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Process or Product	Enzyme Preparation
Soft drinks	Stabilization: glucose oxidase
Soybean hydrolysis	Proteases, α-glucosidase
Tea	Extraction: tannase
Wastewater	Proteases, cellulases, complex enzyme preparations
Winemaking	Maceration: pectinases
	Clarification: pectinases, proteases, β-glucanases
Yeast hydrolysis	β-glucanases for lysing cell walls

ที่มา: Helmut (1998)

รูปแบบการใช้งานของเอนไซม์ (ปราณี, 2547) อาจนำเอนไซม์มาใช้ได้โดยตรง หรือเรียกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ (free enzyme) แต่ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ เช่น ความไม่เสถียร ใช้ได้ครั้งเดียวไม่ต่อเนื่อง แยกออกจากสารละลายที่เป็นผลิตภัณฑ์ได้ยากถ้าสามารถละลายได้ ฯลฯ ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยนำมาทำเป็นเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) คือ ทำให้เอนไซม์มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้โดยการเชื่อมด้วยพันธะ ทำให้ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ละลาย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง ซึ่งการตรึงรูปอาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น ใช้ซ้ำหรือต่อเนื่องได้ แต่การตรึงรูปอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์หรือมีปัญหาในการใช้งานเมื่อซับสเตรทเป็นสารแขวนลอย

5. <u>เอนไซม์โปรติเอส</u>

เอนไซม์โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของสารจำพวกโปรตีน จึงมักถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน (นิลวรรณ, 2548) โดยย่อยให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ เอนไซม์หลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสและสามารถแบ่งประเภทออกเป็นประเภทย่อยๆได้อีก โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งใช้ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในซับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนต่างๆ เอนไซม์โปรติเอสต่างชนิดกันชอบย่อยพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน

เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ พืชที่นำมาสกัดเอนไซม์โปรติเอส เช่น ต้นมะละกอ (carica papaya) ต้นสับปะรด (anana sativa pineapple) ต้น figs (ficus carica, ficus glabrata) ต้น artichokes (cynera cardunculus) และถั่วเหลือง (soya hispidus) ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชนั้นมีหมู่ sulfhydryl ตรงบริเวณเร่งเป็นสมบัติเฉพาะ เอนไซม์ที่ผลิตจากพืช เช่น papain, chymopapain, bromelain, ficin หรือสามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสได้จากสัตว์จำพวกเลี้ยงลูกด้วยนม เช่น รกสัตว์ (animal pancres) เอนไซม์ที่ผลิตได้จากสัตว์ส่วนมากในตอนแรกจะอยู่ในรูปที่ไม่เร่งปฏิกิริยา (proenzyme) จนกว่าอยู่ในสภาวะที่ทำให้เอนไซม์เริ่มทำงาน เช่น ได้รับความเป็นกรดจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร คือ พีเอชจะเริ่มต่ำลง ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูป active ซึ่งสามารถทำงานได้ที่พีเอชต่ำๆ เรียกเอนไซม์ประเภทนี้ว่า endoprotease เช่น pepsin, chymosin, trypsin etc. ดังตารางที่ 6 การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส เช่น ทำเนื้อให้อ่อน การผลิตอาหาร เบียร์ เบเกอรี่ หรืออุตสาหกรรมที่ย่อยโปรตีน ฟอกหนัง หรือยารักษาโรค (เป็นตัวช่วยเตรียมการย่อย) (Anwar and Saleemuddin, 1998) แต่การสกัดเอนไซม์จากพืชและสัตว์ยังมีข้อจำกัดเรื่องคุณภาพและปริมาณ (อรพิน, 2523)

ตารางที่ 6 เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากสัตว์

Protease	Proenzyme	pH Range	Activated
Pepsin	Pepsinogen	1.5-4.0	H^+, protease
Chymosin (gastric)	Prochymosin	5-6	Ca^{2+}
Trypsin	Trypsinogen	6.5-9	Enderokinase, Ca^{2+}
Chymotrypsin	Chymotrypsinogen	7-8.5	Ca^{2+}
Carboxypeptidases	Procarboxypeptidase	7.4 (6-8.5)	Trypsin
Aminopeptidases	-	7.5-9.0 (6.5-8)	-

ที่มา: Helmut (1998)

นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสยังสามารถผลิตได้จากพวกจุลินทรีย์ต่างๆ แต่มีแค่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้ เพราะให้ผลได้ (yield) จากการผลิตที่สูงและเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จะออกมาอยู่นอกเซลล์ ทำให้สามารถสกัดแยกได้ง่าย ไม่ได้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วอยู่ในเซลล์จึงไม่ต้องทำการแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของ

ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้มาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตได้ เช่น แบคทีเรีย (*B.licheniformis*) รา (*A.candidus, A.flavor, A.oryzae, A.niger*) หรือพวกยีสต์ เป็นต้น

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดยรา *A. oryzae* สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ชอบความเป็นกรด เป็นกลาง และเป็นด่าง (acid protease, neutral protease และ alkaline protease) (Reed, 1975 ; Yokotsuka, 1960; Yong และ Wood, 1974)

Ogawa (1995) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *A. oryzae* โดยให้เจริญแบบ membrane-surface liquid culture ซึ่งราจะเจริญบนรูพรุนของเมมเบรนที่สัมผัสกับอาหารเหลว พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบนี้ให้ผลดีกว่าการเลี้ยงแบบ shaking culture, liquid-surface culture และ agar plate culture อีกทั้งแบบ membrane-surface liquid culture สามารถทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างต่อเนื่องด้วยการเปลี่ยนอาหารเหลวชุดใหม่แทนที่อาหารเหลวชุดเก่า

มณีรัตน์ (2542) ศึกษาทดลองหมักถั่วเหลืองแบบอาหารแข็งด้วยรา *A. oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด 2 ขนาด คือ ขนาดเล็ก 6.4 ลิตรและขนาดใหญ่ 42 ลิตร เพื่อผลิตโคจิโดยมีการระบายความร้อนที่เกิดขึ้นในถังแพคเบดด้วยอากาศชื้นเพื่อควบคุมให้มีอุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ถังหมักขนาดเล็กมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเป็น 110.21 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่ามากกว่าการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ซึ่งมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเป็น 96.63 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 36 เนื่องจากการหมักในถังขนาดใหญ่มีปัญหาเรื่องการระบายความร้อนที่ไม่ดีพอ อุณหภูมิจึงสูงซึ่งมีผลต่อการเจริญของรา

สุภาภรณ์ (2545) ได้เสนอแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเกิดกิจกรรมโปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองด้วยรา *A. oryzae* ในถังหมักแบบแพคเบด พบว่าค่ากิจกรรมโปรติเอสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิในเบดสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส และได้สรุปเกี่ยวกับตัวแปรที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก คือ อัตราเร็วอากาศชื้นที่ผ่านเข้าถังหมักควรอยู่ในช่วง 0.1-0.3 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิของอากาศที่เข้าถังไม่ควรเกิน 35 องศาเซลเซียส ความสูงเบดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเบดควรต่ำกว่า 0.5

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

Wang et al. (2005) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *A. oryzae* ด้วยการหมักแบบเหลว พบว่าการหมักแบบเหลวต้องใช้ความหนืดต่ำซึ่งทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนสูง นอกจากนี้การเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์และยูเรียผสมไปด้วยทำให้ช่วยให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น และการรักษาความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอสทำได้โดยเติมสารแคลเซียมคาร์บอเนตและแมกนีเซียมซัลเฟต

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 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสดีสุด จากนั้นนำรา *A. oryzae* มาทำการหมักแบบเหลวและแบบแห้ง พบว่าการหมักแบบแห้งรา *A.oryzae* NRRL 1808 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าการหมักแบบอาหารเหลว โดยการหมักแบบแห้งมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเป็น 31.2 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก และการหมักแบบอาหารเหลวมีค่ากิจกรรมโปรติเอสเป็น 8.7 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมัก

นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังแพคเบดอาจใช้แบคทีเรียได้ โดยเพ็ญจิตร (2548) ได้พัฒนาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการหมักแบบแห้งด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในถังหมักแบบแพคเบดขนาด 40 ลิตร ความสูงเบดเป็น 10 เซนติเมตรพร้อมมีแผ่นพลาสติกกั้นในเบด ใช้กากถั่วเหลืองผสมกับรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 1:1 ผสมกับอาหารเสริมเป็นวัสดุหมัก มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด 253 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 30

การหมักแบบแห้งเมื่อทำการขยายขนาดการผลิตในถังหมักแบบแพคเบดมักพบปัญหาเรื่องการระบายความร้อน (Ghildyal et al, 1994; Sangsurasak and Mitchell, 1995; Mitchell et al., 1999) เพราะปฏิกิริยาส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาคายความร้อน การจัดเรียงตัวของของแข็งภายในเบด

ค่อนข้างหนาแน่น จึงส่งผลต่อการถ่ายเทความร้อนเป็นไปได้ยาก บางครั้งอุณหภูมิในถังแพคเบดตรงส่วนบนอาจสูงกว่าอุณหภูมิของอากาศมากกว่า 20 องศาเซลเซียส (Ashley V.M. et al., 1999) ทำให้การทำงานของจุลินทรีย์ลดลงหรือตายได้ (เพ็ญจิตร และมณีรัตน์, 2541) เช่น รา *A.oryzae* ต้องการอุณหภูมิในการเจริญประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส (Biesebede R.T. et al., 2002)

การให้อากาศนอกจากเป็นการระบายความร้อนแล้วยังเป็นการระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเป็นการให้ออกซิเจนแก่ราด้วย เช่น รา *A. oryzae* ต้องการออกซิเจนในการสร้างเส้นใย ถ้าได้รับปริมาณออกซิเจนไม่พอ ทำให้การเจริญของราไม่ดี ซึ่งมีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Rahardjo Y.S.P. et al, 2005) แต่ปัญหาการระบายความร้อนพบน้อยเมื่อทำการหมักแบบเหลว (Biesebeke R.T. et al., 2002)

การใช้งานเอนไซม์โปรติเอสแสดงได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์	**อุตสาหกรรม**	**การประยุกต์ใช้**
โปรติเอส	ขนมอบและแป้ง	ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของแป้งหมัก
	เบียร์	Chillproofing
	ผลิตภัณฑ์นม	ผลิตโปรตีนสกัด ทำให้นมระเหยมีค่าคงตัว
	อาหารสัตว์	Pig starter rations
	เครื่องหนัง	การย่อยขนและการซักฟอก
	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	การทำให้เนื้อนุ่ม การเตรียมโปรตีนจากปลาชนิดเข้มข้น
	เภสัชกรรม	Digestive aids
	การสกัดโปรตีน	การเตรียมโปรตีนเข้มข้น

ที่มา: สาโรจน์ และประวิทย์ (2538)

อุปกรณ์และวิธีการ

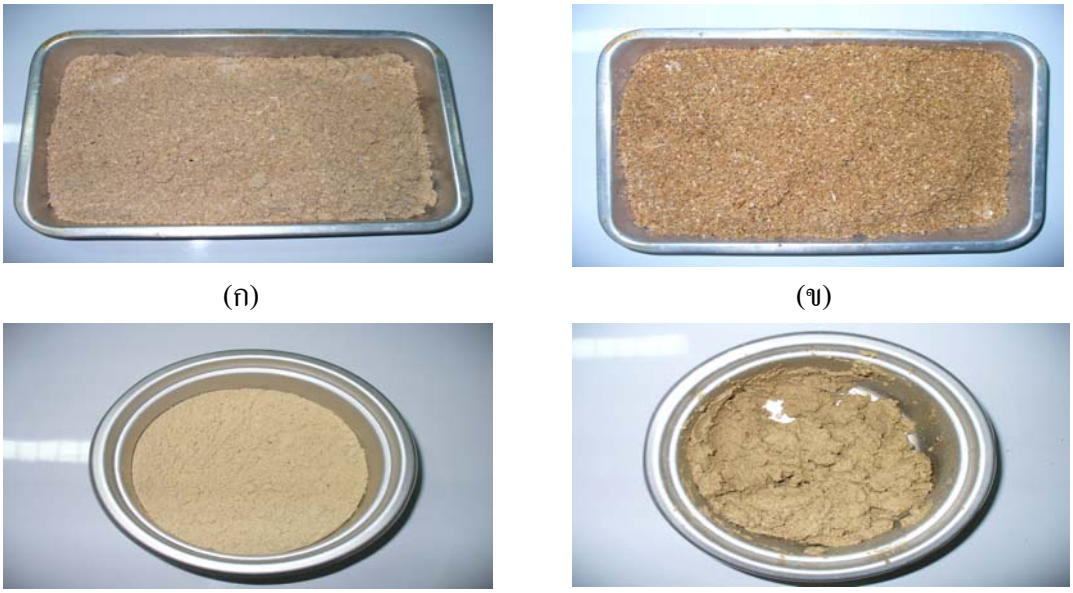
อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ คือ รา *Aspergillus oryzae* มีชื่อทางการค้าว่า Ozykat-1 มีความเข้มข้นของ สปอร์ต้นเชื้อเท่ากับ 10^9 สปอร์ต่อกรัม สั่งซื้อจากคุณราตรี มงคลวัย บ้านเลขที่ 47 หมู่ 7 ต.โพสะ อ.เมือง จ.อ่างทอง 14000 โทรศัพท์ 0-3562-0321

2. วัสดุหมัก

วัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ และวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 ตามลำดับ โดยรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าที่นำมาใช้ในการทดลองมีลักษณะดังภาพที่ 5



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 5 ลักษณะของรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า (ก) รำข้าวสาลีก่อนปรับความชื้น (ข) รำข้าวสาลีหลังปรับความชื้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ค) รำข้าวเจ้าก่อนปรับความชื้น และ (ง) รำข้าวเจ้าหลังปรับความชื้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

3. <u>ระบบการหมักในถังหมักแบบแพคเบด</u>

ระบบการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังภาพที่ 6

3.1 ถังหมักแบบแพคเบด (packed-bed fermentor)

ถังหมักแบบแพคเบดที่ใช้ในการหมักทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมเกรด 304 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร (ไม่รวมฝาปิดถังหมัก) มีปริมาตรถังประมาณ 50 ลิตร ตัวถังประกอบด้วยฝาปิดที่มีช่องให้อากาศระบายออกและทางด้านล่างของถังแพคเบดมีช่องเพื่อให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นไหลเข้าถังเพื่อระบายความร้อนที่เกิดจากการหมัก รอบถังหมักมีช่องเพื่อเสียบหัวเซนเซอร์วัดอุณหภูมิ ภายในถังหมักมีตะแกรงชั้นเบดทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิมซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร มีปริมาตรเบดประมาณ 7 ลิตร ตะแกรงชั้นเบดมีรูพรุนโดยรอบ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุน 2 มิลลิเมตร นอกจากนี้มีการใส่แผ่นกั้นพลาสติกจำนวน 5 แผ่นลงในชั้นเบดเพื่อช่วยในการระบายความร้อนด้วยอากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นมาแล้วในการหมัก 1 ครั้งชั้นเบดสามารถบรรจุวัสดุหมักได้ประมาณ 2.3-2.4 กิโลกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง

3.2 ถังเพิ่มความชื้นของอากาศขาเข้า

การหมักแบบแห้งในถังแพคเบดจำเป็นต้องมีการให้อากาศแก่วัสดุหมักเพื่อระบายความร้อนที่เกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการสูญเสียความชื้นของวัสดุหมักจึงต้องมีถังเพิ่มความชื้นของอากาศขาเข้าให้มีความชื้นสูงก่อนเข้าถังหมัก ถังเพิ่มความชื้นของอากาศขาเข้าประกอบด้วยถังน้ำพลาสติกขนาดใหญ่ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป ทางด้านบนมีฝาปิด ส่วนทางด้านล่างของถังติดหัวฉีดพ่นละอองน้ำเพื่อให้ปั๊มน้ำของถังน้ำ (water tank) สูบน้ำมาฉีดพ่น โดยอากาศภายนอกจะไหลเข้าทางด้านล่างของถังซึ่งเจาะเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 5 x 14.5 ตารางเซนติเมตร ปิดด้วยแผ่นกรองอากาศ ภายในถังเพิ่มความชื้นติดแผ่นกั้นพลาสติกเพื่อให้ระยะเวลาสัมผัสของอากาศกับละอองน้ำนานขึ้น ดังภาพที่ 6 ในถังเพิ่มความชื้นละอองน้ำซึ่งถูกฉีดพ่นจะตกลงสู่ทางด้านล่างของถังเพิ่มความชื้นแล้วไหลลงถังน้ำเพื่อหมุนเวียนน้ำมาใช้ใหม่ อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นแล้วจะไหลออกทางด้านบนของถังเพิ่มความชื้นโดยมีหัวเซนเซอร์วัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ช่องทางออกก่อนเข้าถังหมักแบบแพคเบด

3.3 พัดลมดูดอากาศ (air suction blower)

พัดลมดูดอากาศซึ่งสามารถควบคุมอัตราความเร็วอากาศได้ ถูกติดตั้งและเชื่อมต่อกับช่องทางออกด้านบนของฝาปิดถังหมัก เพื่อดูดอากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นมาแล้วให้เข้าทางด้านล่างของถังหมักแล้วระบายออกทางด้านบนของถังหมัก

3.4 เครื่องมือวัด

เครื่องมือวัดที่ติดตั้งเพื่อวัดตัวแปรต่างๆ มีดังนี้

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

3.4.2 เครื่องประกอบวัดความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศของบริษัท ETT สามารถวัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศได้ตั้งแต่ช่วง 0-100 เปอร์เซ็นต์ และช่วงอุณหภูมิอากาศ 0-100 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการวัดเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศตรงทางออกของถังเพิ่มความชื้น

3.4.3 เครื่องวัดอุณหภูมิแบบเก็บข้อมูล (multilog datalogger ของ Fourier system รุ่น DB-526, Isarael) พร้อมหัวเซนเซอร์ (thermocouple) สามารถวัดอุณหภูมิได้ในช่วง –25 ถึง 110 องศาเซลเซียส ทำการวัดอุณหภูมิในเนื้อวัสดุหมักหรือเบดตรงกลางรัศมีทางด้านบนของชั้นวัสดุหมัก เพราะเป็นตำแหน่งที่อุณหภูมิของวัสดุหมักมีค่ามากกว่าที่ตำแหน่งอื่นๆ (Sangsurasak and Mitchell, 1995)

4. <u>อุปกรณ์วิเคราะห์ต่างๆ</u>

4.1 ตู้เขี่ยเชื้อ

4.2 เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture analyzer) รุ่น AMB 50 ของบริษัท Adam Equipment ประเทศอังกฤษ

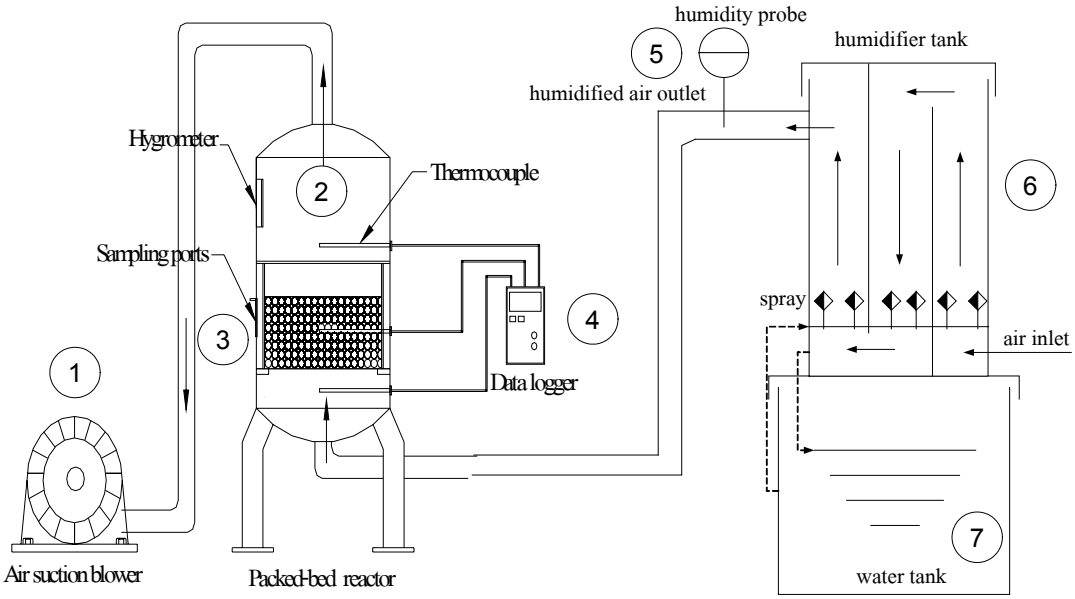
4.3 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Anthekie Advanced ของบริษัท Secomam ประเทศฝรั่งเศส

4.4 อ่างน้ำอุ่น (water bath) ควบคุมอุณหภูมิน้ำที่ 40 องศาเซลเซียส รุ่น SBD 50-cold ยี่ห้อ Heto ของบริษัท Scientific promotion ประเทศไทย

4.5 เครื่องชั่ง รุ่น LM6100 ของบริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

4.6 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 420A ยี่ห้อ Orion ประเทศสหรัฐอเมริกา

ระบบการหมักแบบแห้งในถังแพคเบด แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ระบบการหมักในถังหมักแบบแพคเบด (1) พัดลมดูดอากาศ (2) ถังหมักแบบแพคเบด (3) ชั้นเบด (4) เครื่องวัดอุณหภูมิแบบเก็บข้อมูล (5) เครื่องประกอบวัดความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิของอากาศ (6) ถังเพิ่มความชื้น และ (7) ถังน้ำ

วิธีการ

ในงานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คือ การหาวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยทำการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ส่วนที่สอง คือ การขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. การศึกษาหาวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองโดยใช้วัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ และวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชั่งวัสดุหมักในแต่ละสัดส่วนลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวนฟลาสก์ละ 20 กรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง นำมาปรับความชื้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากฟลาสก์ด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีกชั้นหนึ่ง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้เขี่ยเชื้อ จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *A. oryzae* จำนวน 0.06 กรัม (คิดเป็น 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) ซึ่งผสมกับแป้งสาลี 2 กรัม (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง) คลุกเคล้าให้เข้ากับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ นำฟลาสก์จำนวน 11 ฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตู้บ่ม (incubator) ทำการหมักเป็นเวลานาน 120 ชั่วโมงหรือ 5 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุกๆ 12 ชั่วโมงโดยนำฟลาสก์ออกจากตู้บ่ม 1 ฟลาสก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส และความชื้นของวัสดุหมัก

2. การศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด

2.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักต่อการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด โดยใช้วัสดุหมักผสมที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้า นำมาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้เขี่ยเชื้อ จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *A. oryzae* จำนวน 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแป้งสาลี

จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง คลุกเคล้าให้เข้ากับวัสดุหมัก นำวัสดุหมักจัดเรียงในเบดซึ่งสูง 10 เซนติเมตร มีแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นให้ภายในเบดแบ่งออกเป็น 6 ช่องเท่าๆกัน นำเบดมาตั้งไว้ในถังหมัก ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย เมื่อระยะเวลาการหมักครบ 12 ชั่วโมง ทำการให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาทีจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก คือ 5 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส ปริมาณกลูโคซามีน ความชื้นของวัสดุหมัก พีเอช นอกจากนี้ทำการวัดตัวแปรต่างๆด้วยเครื่องมือวัด คือ อุณหภูมิในเบด อุณหภูมิของอากาศชื้นขาเข้า และเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้น

2.2 ผลของระยะเวลาเริ่มต้นในการเปิดลมที่มีต่อการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.1 แต่ให้อากาศเมื่อทำการหมักไปแล้ว 24 ชั่วโมง โดยทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบดด้วยสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้านำมาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักที่เหมาะสม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้เขี่ยเชื้อ จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา *A. oryzae* จำนวน 0.3 เปอร์เซ็นต์กับแป้งสาลีจำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง คลุกเคล้าให้เข้ากับวัสดุหมัก นำวัสดุหมักจัดเรียงในเบดซึ่งสูง 10 เซนติเมตร มีแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นให้ภายในเบดแบ่งออกเป็น 6 ช่องเท่าๆกัน นำเบดมาตั้งไว้ในถังหมัก ปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อย เมื่อระยะเวลาการหมักครบ 24 ชั่วโมง ทำการให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาทีจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก คือ 5 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส ปริมาณกลูโคซามีน ความชื้นของวัสดุหมัก พีเอช นอกจากนี้ทำการวัดตัวแปรต่างๆด้วยเครื่องมือวัด คือ อุณหภูมิในเบด อุณหภูมิของอากาศชื้นขาเข้า และเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้น

3. <u>การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์</u>

3.1 การสกัดเอนไซม์ (มณีรัตน์, 2542)

3.1.1 การเตรียมสารเคมีในการสกัดเอนไซม์

ก. สารละลาย 0.2 M acetic acid เตรียมโดยการผสมกรด CH_3COOH 2.9 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลาย 0.2 M sodium acetate เตรียมโดยการละลาย CH_3COONa 1.65 กรัมหรือ $CH_3COONa.3H_2O$ 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

3.1.2 วิธีสกัดเอนไซม์

ก. ชั่งวัสดุหมักจำนวน 10 กรัมแห้ง (เมื่อวิเคราะห์ความชื้นได้จึงคำนวณกลับเป็นน้ำหนักแห้งได้) มาใส่ไว้ในฟลาสก์

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

ค. นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

3.2 ค่ากิจกรรมโปรติเอส (มณีรัตน์, 2542)

3.2.1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

ก. สารละลาย 0.1 N NaOH เตรียมโดยละลาย NaOH จำนวน 0.4 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปริมาตรเป็น 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 $NaH_2PO_4.2H_2O$ จำนวน 3.12 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ง. สารละลาย 0.2 M dibasic sodium phosphate เตรียมโดยละลาย $Na_2HPO_4.2H_2O$ 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 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 trichloroacetia acid (TCA) เตรียมโดยละลาย trichloroacetia acid จำนวน 6.54 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ซ. สารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 เตรียมโดยละลาย Na_2CO_3 จำนวน 4.24 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ฌ. สารละลาย folin reagent เตรียมได้โดยผสมสารละลาย folin กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปใช้ทันที

3.2.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

ก. นำสารละลายเคซีนที่เตรียมได้แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ข. ใส่น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ลงไปในหลอดทดลองที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดออกจากวัสดุหมักที่ผ่านการหมักที่ชั่วโมงต่างๆ จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์

ค. เติมสารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่นาทีที่ 0 ส่วนหลอดอื่นๆ เติมสารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

ง. นาทีที่ 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 Na_2CO_3 ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

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

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

3.2.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

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

ข. ดูดสารละลาย L-tyrosine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดทดลองด้วยอัตราส่วนดังตารางที่ 8

ค. เติมสารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

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

จ. นาทีที่ 10 นำหลอดทดลองที่ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 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

ช. จากกราฟมาตรฐานสามารถสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากวัสดุหมักที่ชั่วโมงต่างๆ จึงทราบค่ากิจกรรมโปรติเอสได้ ค่ากิจกรรมโปรติเอสกำหนดให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมโปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้สาร L-tyrosine ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับ L-tyrosine 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลาย L-tyrosine ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ปริมาณสารละลาย L-tyrosine (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine (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

4. <u>การวิเคราะห์ตัวแปรต่างๆ</u>

4.1 ความชื้นของวัสดุหมัก

นำวัสดุหมักที่ผ่านการหมักมาทำการวิเคราะห์ความชื้นทันทีด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น (moisture analyzer) โดยต้องคลุกเคล้าวัสดุหมักให้เข้ากันดีก่อน ชั่งวัสดุหมักอย่างน้อย 2 กรัม กดปุ่มให้เครื่องวิเคราะห์ความชื้นทำการวิเคราะห์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที จึงแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นออกมา

4.2 ค่าพีเอช (Han and Anderson, 1975)

นำตัวอย่างวัสดุหมักที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน มาจำนวน 1 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง วัดด้วยเครื่องวัดพีเอช

4.3 ปริมาณกลูโคซามีน (Cochran and Vercellotti, 1978)

4.3.1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ก. สารละลาย 1.25 M Na_2CO_3 เตรียมโดยละลาย Na_2CO_3 จำนวน 6.625 กรัม กับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลาย acetyl acetone reagent 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยผสมสารละลาย acetyl acetone จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 1.25 M Na_2CO_3 จำนวน 48 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

ค. สารละลาย Ehrlich reagent เตรียมโดยละลาย para-dimethylamino benzalde hyde จำนวน 1.6 กรัมในส่วนผสมของสารละลาย HCl conc. จำนวน 30 มิลลิลิตรและสารละลาย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์จำนวน 30 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน

ง. สารละลาย NaOH 30 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลาย NaOH จำนวน 30 กรัม กับน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร

จ. สารละลาย HCl conc. (37 เปอร์เซ็นต์)

ฉ. สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride

1. stock solution เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลาย gluco samine hydrochloride จำนวน 5 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. working solution เตรียมโดยนำสารละลาย stock solution ที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

4.3.2 การเตรียมวัสดุหมักวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ก. นำวัสดุหมักที่ผ่านการหมักที่ชั่วโมงต่างๆ อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน มาบดละเอียดแล้วชั่งมาจำนวน 0.5 กรัม ลงในบีกเกอร์

ข. เติมสารละลาย HCl conc. จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

ค. จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใสจำนวน 2 มิลลิลิตรมาเติมในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตรไว้แล้ว

ง. นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

จ. นำมาปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH 30 เปอร์เซ็นต์

ฉ. นำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จะได้ส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ก. ใส่สารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

ข. เติมสารละลาย acetyl acetone reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลองแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที

ค. เติมสารละลาย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร

ง. เติมสารละลาย Ehrlich reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

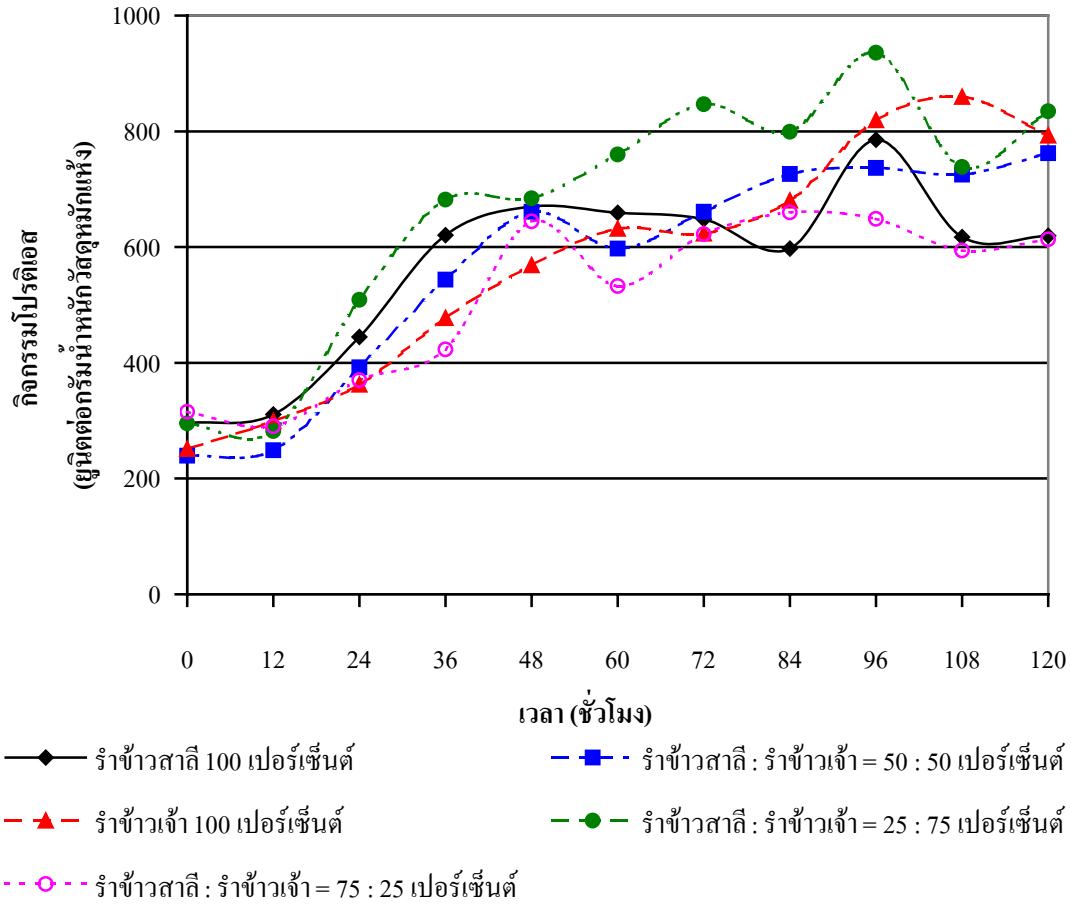
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาหาวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับห้องปฏิบัติการ

ค่ากิจกรรมโปรติเอสเมื่อใช้วัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ แสดงได้ดังภาพที่ 7 พบว่า ค่ากิจกรรมโปรติเอสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักเนื่องจากในช่วงต้นของการหมัก ราสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งได้ง่ายกว่าจึงยังไม่เร่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสแต่จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสในช่วงท้ายของการหมัก

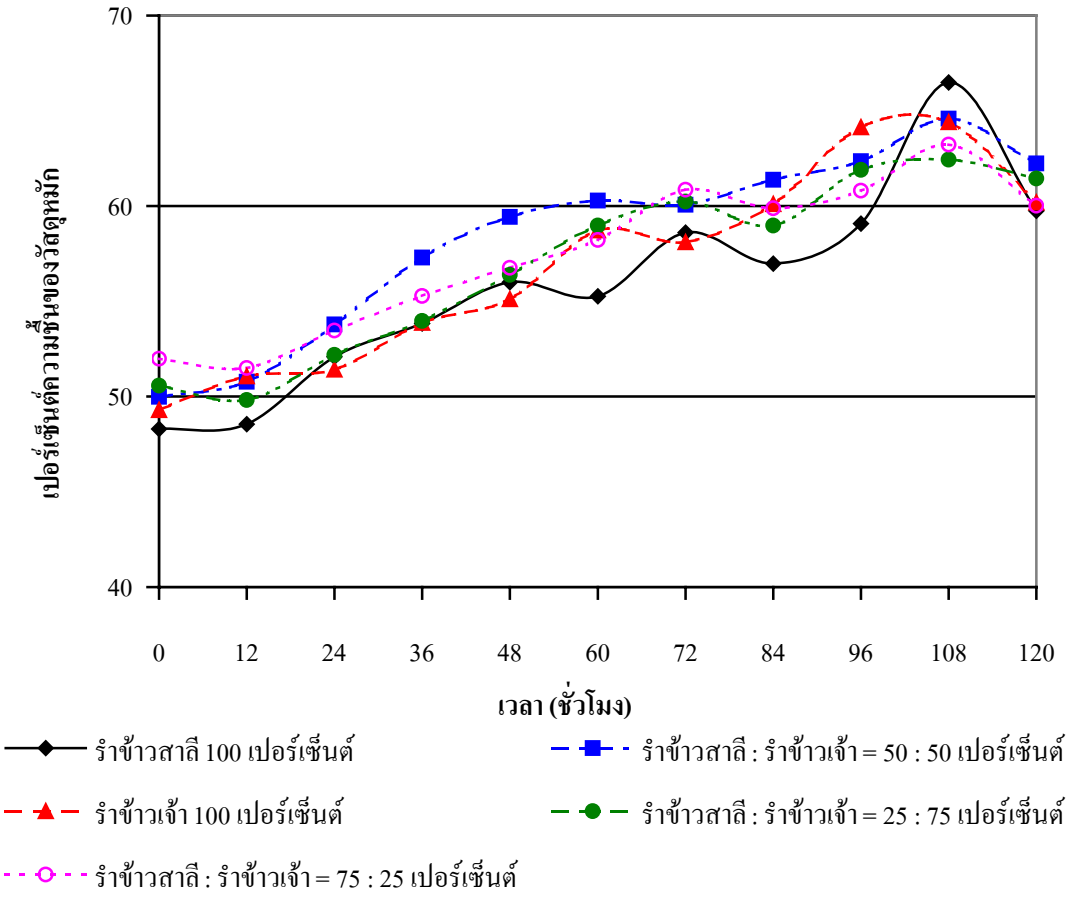
เพื่อเป็นการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของราจึงควรเลือกวัสดุหมักที่มีโปรตีนหรือแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยปริมาณไนโตรเจนในรำข้าวสาลีที่ใช้ในการทดลองได้เท่ากับ 2.95 เปอร์เซ็นต์หรือคิดเป็นโปรตีน 16.82 เปอร์เซ็นต์ (นำเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนคูณกับ 5.7) (อรอนงค์, 2540) ส่วนรำข้าวเจ้ามีปริมาณไนโตรเจนประมาณ 2.36 เปอร์เซ็นต์หรือมีโปรตีน 13.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการทดลองพบว่าในช่วงเวลาการหมักตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมโปรติเอสเมื่อใช้รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก มีค่าสูงกว่ารำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นในช่วงท้ายจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมักค่ากิจกรรมโปรติเอสของรำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์สูงกว่ารำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์เล็กน้อย

แม้ว่าการหมักด้วยรำข้าวเจ้าให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสดีกว่ารำข้าวสาลีเล็กน้อย แต่ในการขยายขนาดการหมักในถังหมักแบบแพคเบดถ้าใช้รำข้าวเจ้าเป็นวัสดุหมักจะเกิดปัญหาในเรื่องการระบายความร้อนเพราะรำข้าวเจ้าเมื่อผ่านการปรับความชื้นจะมีลักษณะจับตัวเป็นก้อน ทำให้อากาศระบายได้ยาก จึงต้องนำรำข้าวสาลีมาผสมในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ รำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยให้รำข้าวเจ้าลดการจับตัวเป็นก้อนเพราะรำข้าวสาลีมีลักษณะร่วน ไม่จับตัวเป็นก้อนเมื่อทำการปรับความชื้น พบว่า เมื่อใช้รำข้าวสาลีผสมกับรำข้าวเจ้าในอัตราส่วน 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุดในบรรดาวัสดุหมักทั้งหมด คือ 936.00 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 96



ภาพที่ 7 กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆเป็นวัสดุหมัก เมื่อความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อใช้วัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ ปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ วัดความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 8 พบว่า ความชื้นในวัสดุหมักมีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ ปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึ่มของรา แสดงว่ารามีการเจริญบนวัสดุหมักได้ น้ำบางส่วนได้ระเหยออกจากวัสดุหมักเป็นหยดน้ำเกาะอยู่ที่ผิวด้านในของฟลาสก์ ก่อนทำการวัดความชื้นของวัสดุหมักจะต้องคลุกเคล้าวัสดุหมักให้ผสมกันทั่วก่อน ทำให้น้ำที่เกาะอยู่ที่ผิวฟลาสก์ผสมกับวัสดุหมักด้วย เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักจึงเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมักในช่วงหลังของการหมักมีค่าสูงกว่าในช่วงต้นของการหมักประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์



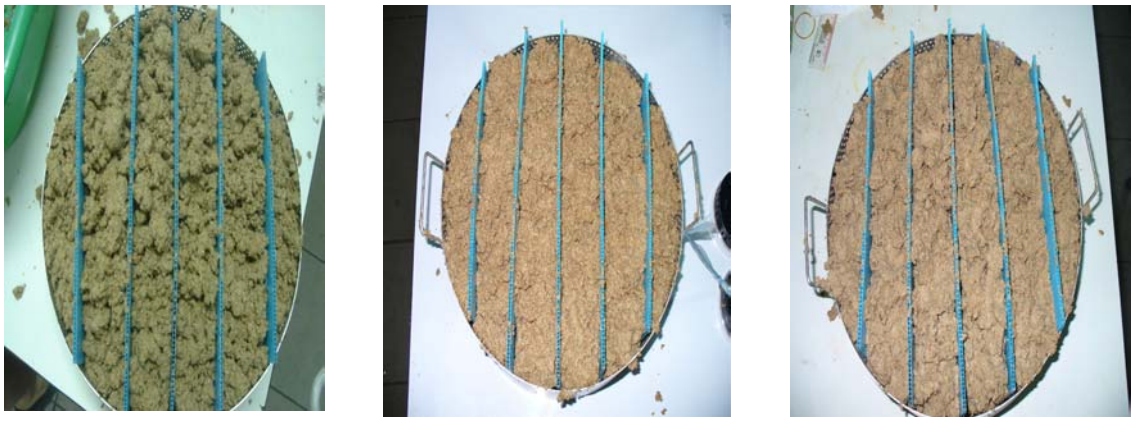
ภาพที่ 8 ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆเป็นวัสดุหมัก เมื่อความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองในส่วนนี้ สรุปได้ว่าควรเลือกวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ เพราะเป็นสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมเพื่อศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบดต่อไป

2. <u>การศึกษาการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด</u>

2.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักต่อการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

การทดลองส่วนนี้เลือกวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ นำมาขยายขนาดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด ทำการศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักโดยปรับค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ใส่ต้นเชื้อรา *A.oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์และแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ คลุกเคล้าให้เข้ากัน นำมาใส่ในชั้นเบดซึ่งสูง 10 เซนติเมตร บรรจุวัสดุหมักได้ประมาณ 2.3-2.4 กิโลกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ในชั้นเบดมีแผ่นพลาสติก 5 แผ่นกั้นวัสดุหมักดังภาพที่ 9 ใส่วัสดุหมักให้เต็มชั้นเบดจากนั้นนำไปวางไว้ในถังแพคเบด มีการให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นเพื่อระบายความร้อนด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาที โดยทำการให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากการหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก



(ก) (ข) (ค)

<u>ภาพที่ 9</u> ลักษณะของวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ในเบดที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ (ก) ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) ความชื้น 55 เปอร์เซ็นต์ และ (ค) ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการทดลองหาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ในถังหมักแบบแพคเบดที่ความชื้น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแนวโน้มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของราเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักเนื่องจากราเร่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสเมื่อแหล่งอาหารคาร์บอนเริ่มน้อยลง ดังแสดงในภาพที่ 10 ค่ากิจกรรมโปรติเอสที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคซามีนที่เพิ่มขึ้นด้วยดังแสดงในภาพที่ 11 โดยกลูโคซามีนเป็นสารที่พบในผนังเซลล์ของราซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญของรา ดังนั้นปริมาณกลูโคซามีนจึงสามารถบ่งชี้การเจริญของราได้

จากภาพที่ 10 พบว่าในช่วงต้นของการหมักค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าใกล้เคียงกันจนถึงช่วงหลังของการหมักที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากัน คือ 435.45 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งและสูงกว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ คือ 382.92 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ส่วนปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มสูงขึ้นเหมือนกับค่ากิจกรรมโปรติเอส ดังภาพที่ 11 โดยในช่วงท้ายของการหมักปริมาณกลูโคซามีนที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากกว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าที่ 50 เปอร์เซ็นต์มาก ทั้งนี้อาจเป็นผลของอุณหภูมิอากาศชื้นที่เข้ามาระบายความร้อนมีอุณหภูมิต่ำลงเพราะสภาพอากาศภายนอกถังหมักเย็น ดังแสดงในภาพที่ 12 ทำให้อากาศเย็นที่เข้าถังหมักระบายความร้อนได้ดี ราจึงเจริญได้ดี ปริมาณกลูโคซามีนจึงสูง อย่างไรก็ตามผลของอุณหภูมิอากาศขาเข้าที่ต่ำนี้อาจไม่มีมีผลมากในการลดอุณหภูมิของเบด เพราะจากภาพที่ 13 จะเห็นว่าอุณหภูมิของเบดที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกัน

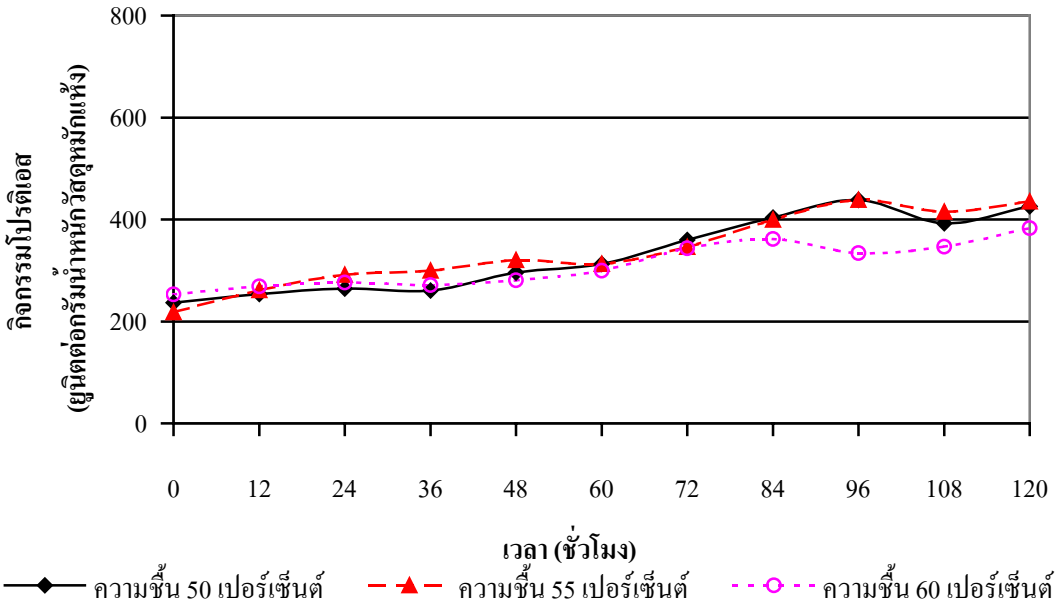
จากภาพที่ 12 แสดงอุณหภูมิของอากาศชื้นที่เข้ามาระบายความร้อน ซึ่งพบว่าการทดลองที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ มีอุณหภูมิของอากาศชื้นใกล้เคียงกันแต่ที่ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ ราเจริญได้ดีกว่าทำให้ไม่มีปัจจัยของอุณหภูมิอากาศชื้นมาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุหมักที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นก้อนมากกว่าที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การระบายความร้อนและอากาศถ่ายเทไม่สะดวก มีผลให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสต่ำกว่า ซึ่งที่ความชื้น 55 เปอร์เซ็นต์จะมีลักษณะเป็นก้อนเหมือนกันแต่น้อยกว่าที่ 60 เปอร์เซ็นต์ ต่ยังสรุปไม่ได้ว่าเป็นความชื้นที่เหมาะสมหรือไม่ เพราะค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะอากาศชื้นที่เข้ามาระบายความร้อนมีอุณหภูมิต่ำลง ทำให้การระบายความร้อนดีกว่า ราจึงเจริญได้ดี ค่ากิจกรรมโปรติเอสจึงสูงตามด้วย และยังพบว่าอุณหภูมิของอากาศชื้น

ขาเข้ามีค่าแกว่งขึ้นลงเป็นช่วงๆตามการเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาของวันซึ่งอุณหภูมิมีค่าสูงในตอนกลางวันและลดต่ำลงในตอนกลางคืน

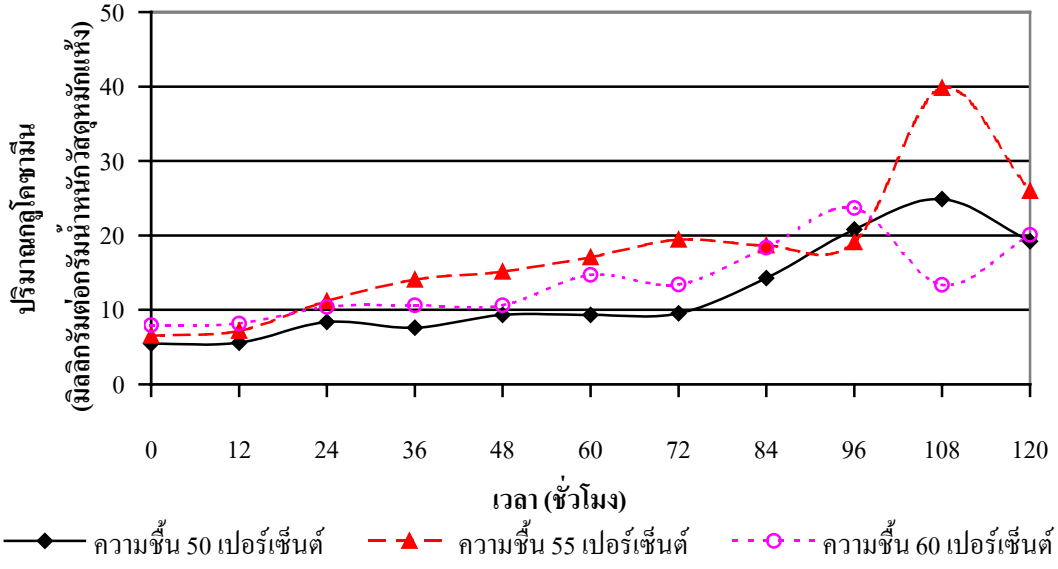
อุณหภูมิในเบดมีค่าลดต่ำลงในช่วงแรกของการหมักดังแสดงในภาพที่ 13 เนื่องจากวัสดุหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนยังอุ่น ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกอุณหภูมิในเบดจึงค่อยๆลดลงมา จากนั้นในขณะที่ราเริ่มมีการเจริญจะเห็นว่าอุณหภูมิในเบดจะสูงกว่าอากาศขาเข้าเล็กน้อย และอุณหภูมิในเบดเริ่มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 12 ทำการให้อากาศชื้นโดยการเปิดพัดลมเพื่อระบายความร้อนไม่ให้อุณหภูมิในเบดสูงเกินไปเพราะอาจทำให้ราหยุดการเจริญได้ อุณหภูมิในเบดจึงเริ่มตกลงเพราะอากาศชื้นระบายความร้อนที่สะสมอยู่ในชั้นเบด การให้อากาศนอกจากเป็นการลดอุณหภูมิในเบดแล้วยังเป็นการนำออกซิเจนเข้าสู่ชั้นเบดและลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากถังหมัก ราจึงเจริญได้ดี มีผลให้มีความร้อนเกิดขึ้นในชั้นเบดมาก อุณหภูมิในเบดจึงยังคงอยู่ในระดับสูงและแกว่งขึ้นลงตามอุณหภูมิของอากาศชื้นที่เข้ามาระบายความร้อนซึ่งเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาในแต่ละวัน

การหมักในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการหมักในฟลาสก์ซึ่งเป็นระบบปิด ความชื้นวัสดุหมักมีค่าเพิ่มมากขึ้นดังแสดงในภาพที่ 8 แต่การหมักในถังหมักแบบแพคเบดมีการระบายความร้อนด้วยการให้อากาศชื้นทำให้ความชื้นในวัสดุหมักมีค่าลดลงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14 การใช้ถังเพิ่มความชื้นเพื่อให้อากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงในช่วง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 15 ไม่สามารถชดเชยการสูญเสียความชื้นในเนื้อวัสดุหมักได้ คาดว่ามีน้ำบางส่วนที่เกิดจากการเจริญของราระเหยไปพร้อมกับอากาศที่ระบายออก การทดลองที่ความชื้นเริ่มต้น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้นในวัสดุหมักลดลงตามระยะเวลาการหมักเช่นเดียวกัน

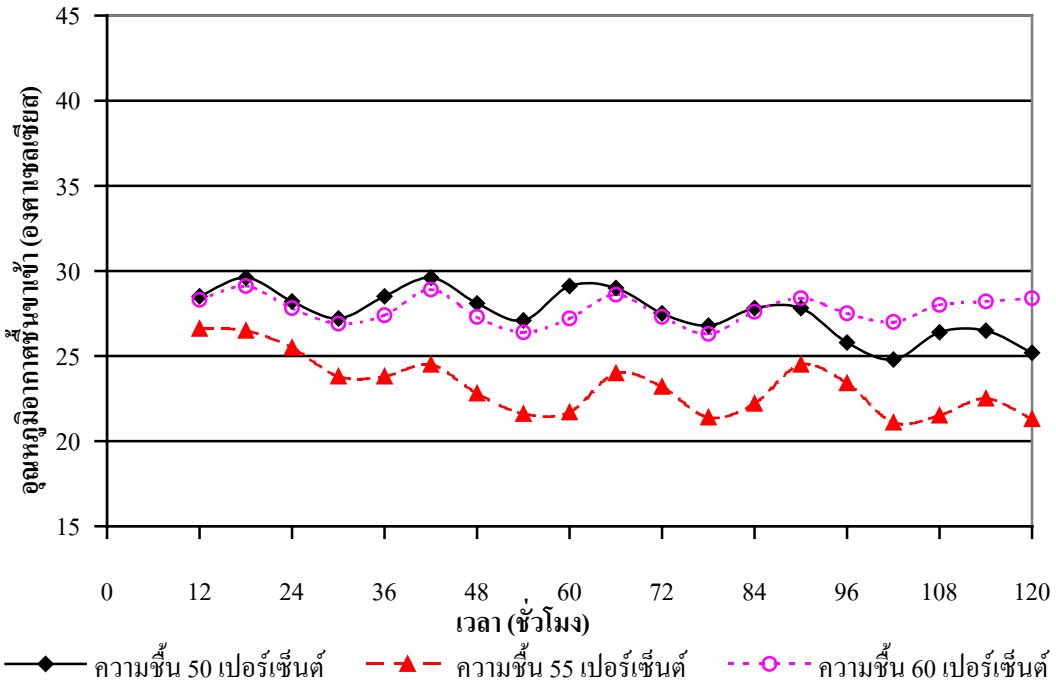
ค่าพีเอชที่วิเคราะห์ได้แสดงดังภาพที่ 16 ค่าพีเอชเริ่มต้นของวัสดุหมักอยู่ที่ประมาณ 5.5 เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วง 5-7 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเกิดจากราผลิตกรดอินทรีย์จากการสลายโมเลกุลขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กออกมา มีผลให้ค่าพีเอชลดลง ขณะที่การสลายโปรตีนทำให้เกิดแอมโมเนียออกมาเมื่อรวมกับความชื้นทำให้เป็นไฮดรอกไซด์อิออน ค่าพีเอชจึงค่อนข้างคงที่



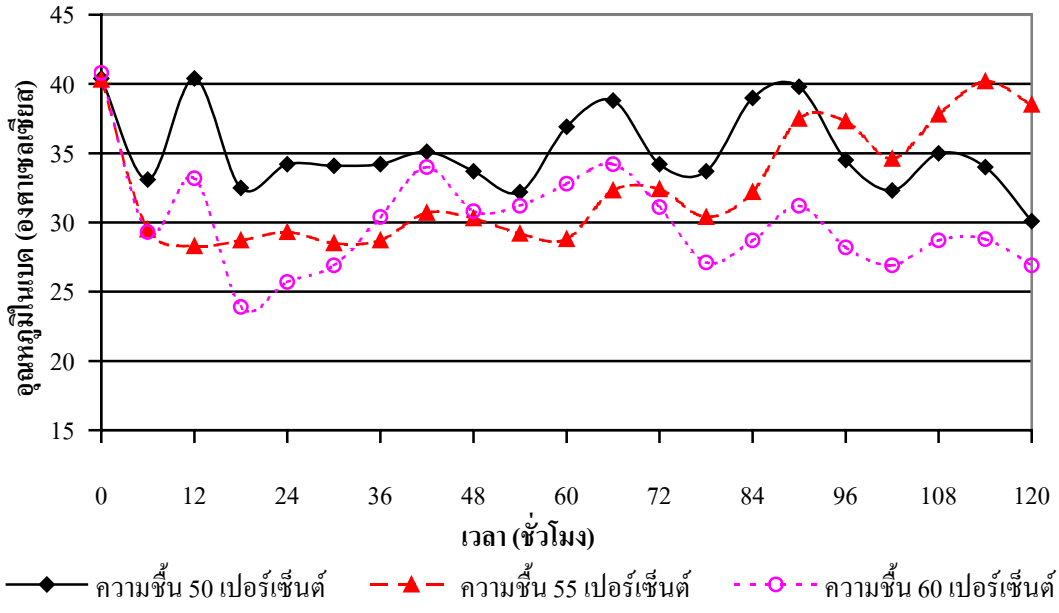
ภาพที่ 10 กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



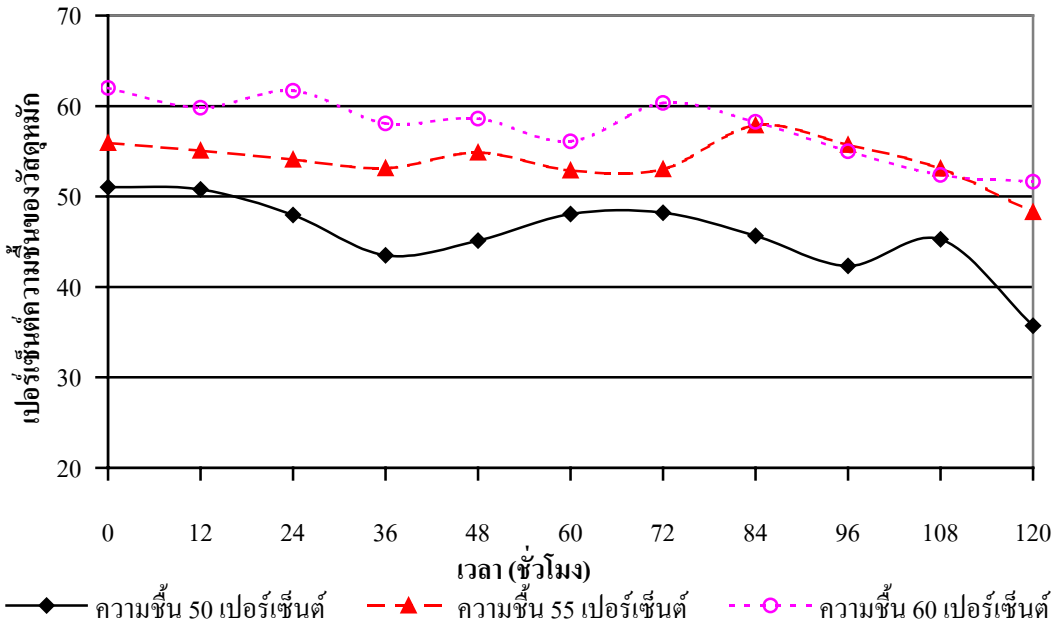
ภาพที่ 11 ปริมาณกลูโคซามีนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



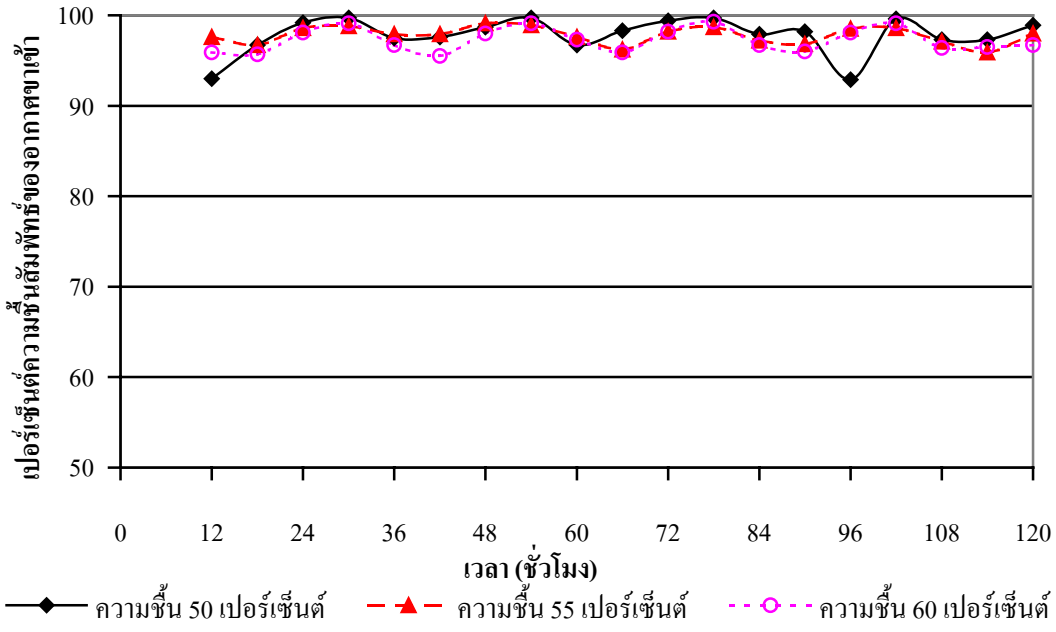
ภาพที่ 12 อุณหภูมิของอากาศชั้นขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



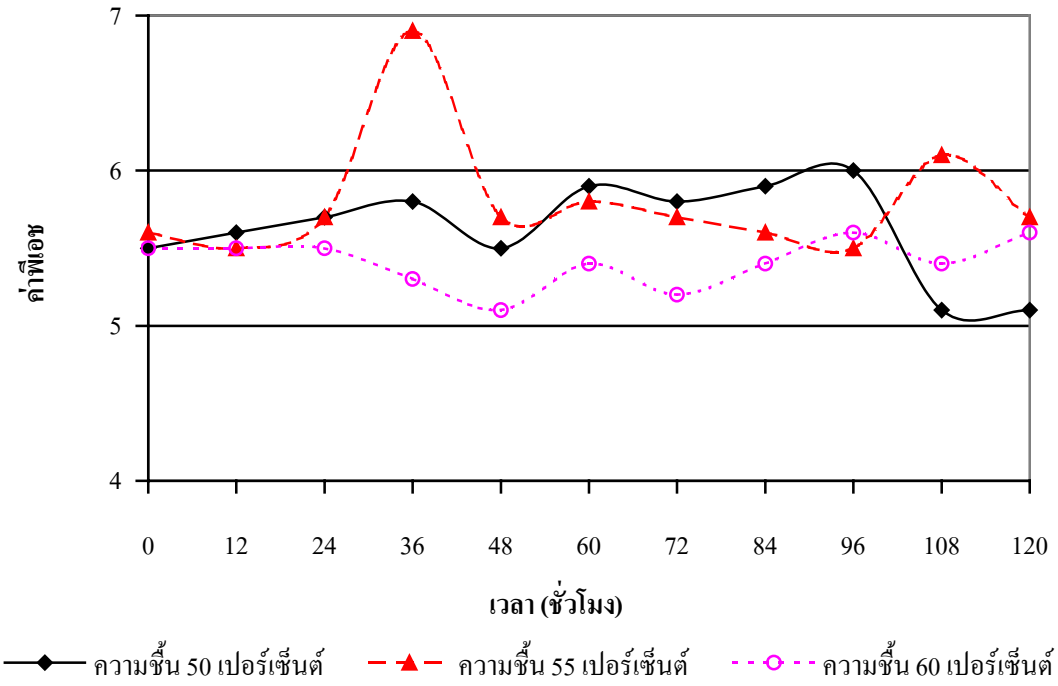
ภาพที่ 13 อุณหภูมิในเบดที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



ภาพที่ 14 ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



ภาพที่ 15 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก



ภาพที่ 16 ค่าพีเอชที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ เมื่อแปรค่าความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก

จากการทดลองในส่วนนี้ สรุปได้ว่า ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นความชื้นที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่สามารถสรุปได้ระหว่างความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นใดผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่ากัน จึงเลือกทั้ง 2 ค่ามาทำการทดลองในส่วนต่อไป

2.2 ผลของระยะเวลาเริ่มต้นในการให้อากาศที่มีต่อการหมักในถังหมักแบบแพคเบด

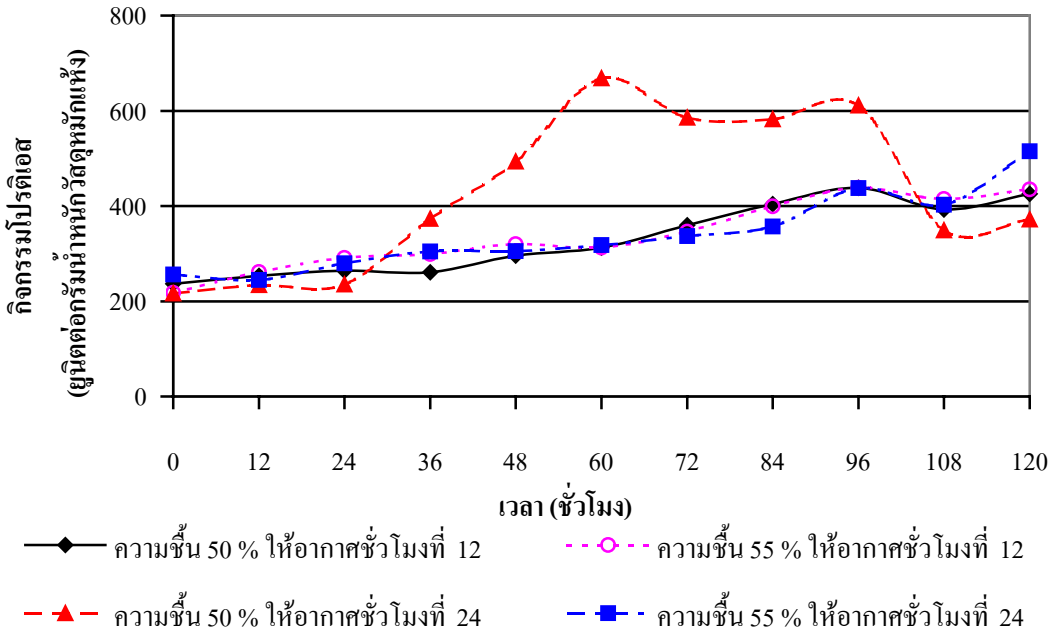
การทดลองในส่วนนี้ใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ เติมต้นเชื้อรา 0.3 เปอร์เซ็นต์และแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาใส่ในชั้นเบดซึ่งสูง 10 เซนติเมตร บรรจุวัสดุหมักได้ประมาณ 2.3-2.4 กิโลกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ในชั้นเบดมีแผ่นพลาสติกกั้น 5 แผ่น ใส่วัสดุหมักให้เต็มเบดจากนั้นนำไปวางในถังแพคเบด มีการให้อากาศชื้นเพื่อระบายความร้อนด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาที โดยเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมักจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ซึ่งการให้อากาศช้ากว่าการทดลองที่ 2.1 ที่เริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากการหมัก มีข้อสมมติฐานว่าการให้อากาศเร็วไป อาจทำให้ความชื้นในวัสดุหมักลดลงเร็ว ราอาจเจริญได้น้อยลง ทำให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้น้อยลง

ผลของการเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบดที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์แสดงได้ดังภาพที่ 17 พบว่า ในการทดลองที่ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ เริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงกว่าสภาวะอื่นอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงการหมักที่ 36-96 ซึ่งแนวโน้มค่ากิจกรรมโปรติเอสเหมือนกับปริมาณกลูโคซามีนที่มีค่ามากกว่าในสภาวะอื่นดังแสดงในภาพที่ 18 ในชั่วโมงการหมักที่ 36-72 เนื่องจากในสภาวะที่ราเจริญได้ดี ปริมาณกลูโคซามีนจึงมาก ทำให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงตามด้วย มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเป็น 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 60 ส่วนภาพที่ 19 แสดงอุณหภูมิของอากาศขาเข้า

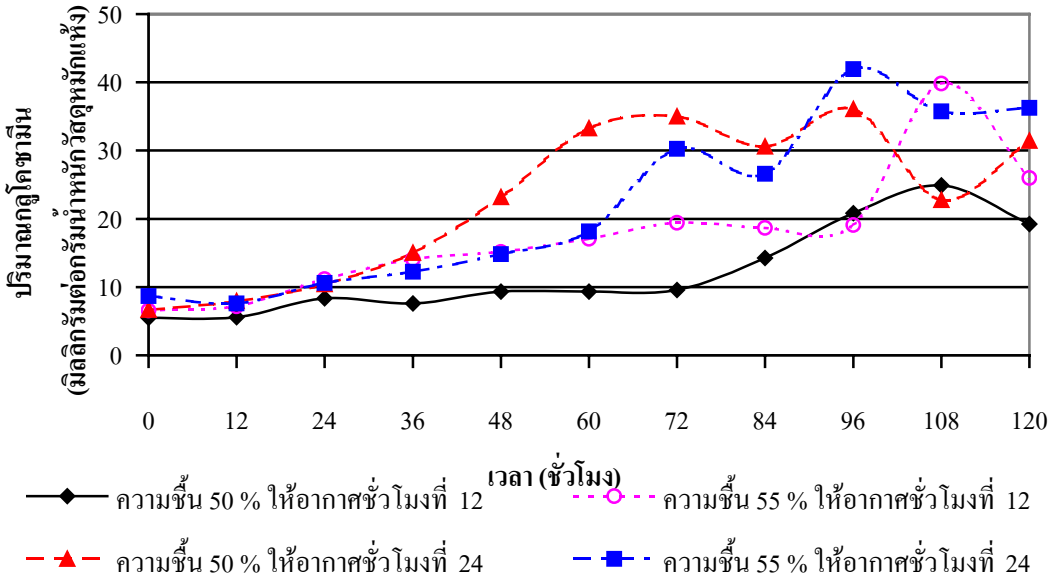
จากภาพที่ 20 แสดงอุณหภูมิในเบดของการทดลองที่เริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมัก พบว่า แนวโน้มเหมือนกับการทดลองในส่วนที่แล้ว คือ ช่วงแรกมีอุณหภูมิลดลงเนื่องจากวัสดุหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนยังอุ่นกว่าสภาวะแวดล้อม ต่อมาเมื่อรามีการเจริญเกิดการคายความร้อน อุณหภูมิในเบดจึงสูงขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 เมื่อเริ่มให้อากาศชื้นอุณหภูมิในเบดจึงเริ่มลดลงลง เพราะความร้อนในเบดถูกระบายออก จากนั้นอุณหภูมิในเบดจะอยู่ในระดับสูงเนื่องจากความร้อนที่ราสร้างขึ้น และมีค่าแกว่งขึ้นลงตามอุณหภูมิของอากาศชื้นซึ่งเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาในแต่ละวัน

จากภาพที่ 21 แสดงความชื้นของวัสดุหมัก พบว่า ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์ เริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 ในช่วงต้นของการหมักความชื้นของวัสดุหมักลดลงไม่มาก จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงท้ายของการหมัก เพราะราเจริญได้ดีตามปริมาณกลูโคซามีนที่เพิ่มขึ้นดังภาพที่ 18 น้ำบางส่วนที่เกิดจากกระบวนการเจริญของราจึงระเหยไปพร้อมกับอากาศที่ระบายออก ทำให้ความชื้นในวัสดุหมักลดลง ส่วนที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 55 เปอร์เซ็นต์ เริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 ความชื้นของวัสดุหมักมีค่าค่อยๆลดลง และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงท้ายของการหมักตามปริมาณกลูโคซามีนที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงหลังของการหมักดังภาพที่ 18 เช่นกัน

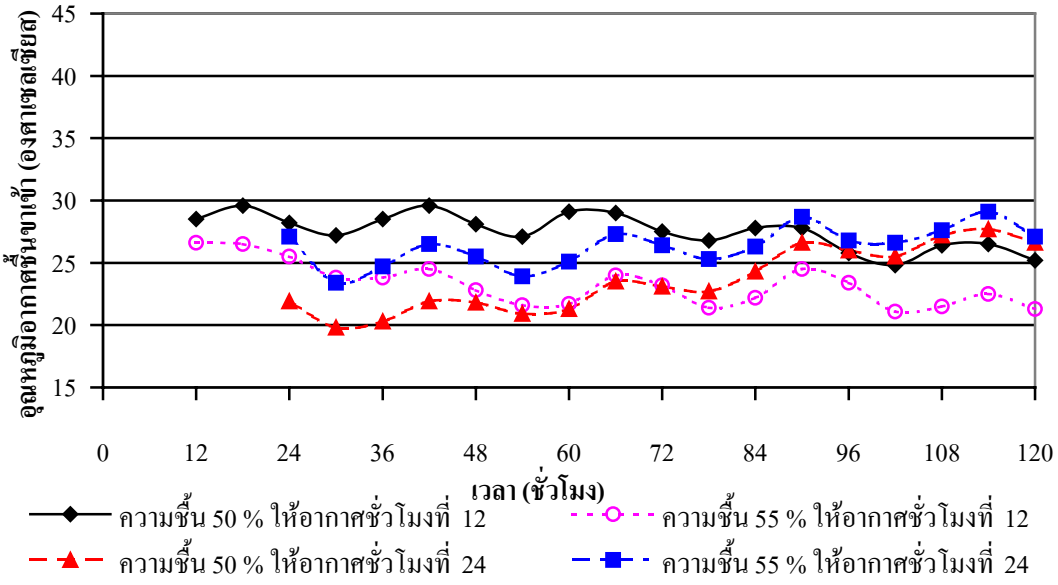
ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้น แสดงได้ดังจากภาพที่ 22 ซึ่งทุกสภาวะการทดลองเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพันธ์ของอากาศยังคงมีค่าสูงอยู่ในช่วง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าพีเอชของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ แสดงได้ดังภาพที่ 23 ซึ่งทุกสภาวะการทดลองมีค่าพีเอชของวัสดุหมักเริ่มต้นประมาณ 5.5 ค่าพีเอชมีค่าสูงขึ้นในช่วง 5-7



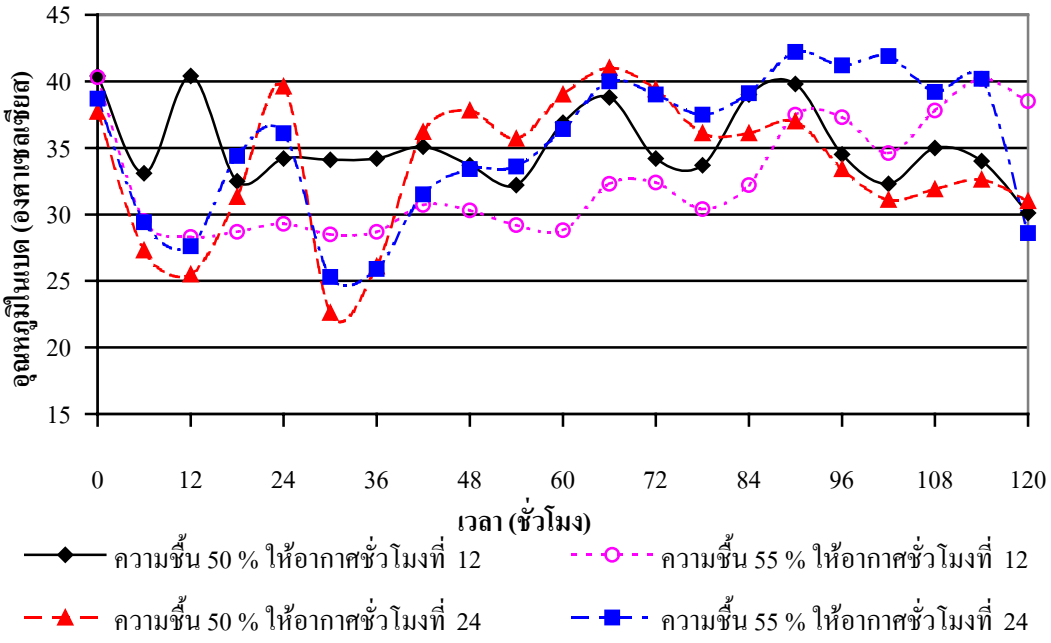
ภาพที่ 17 กิจกรรมโปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



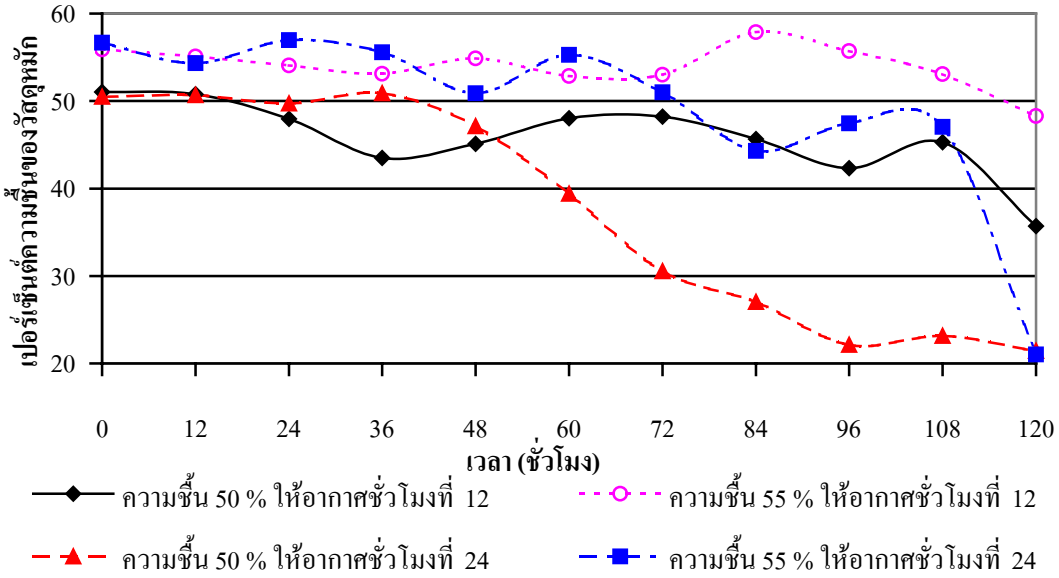
ภาพที่ 18 ปริมาณกลูโคซามีนที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



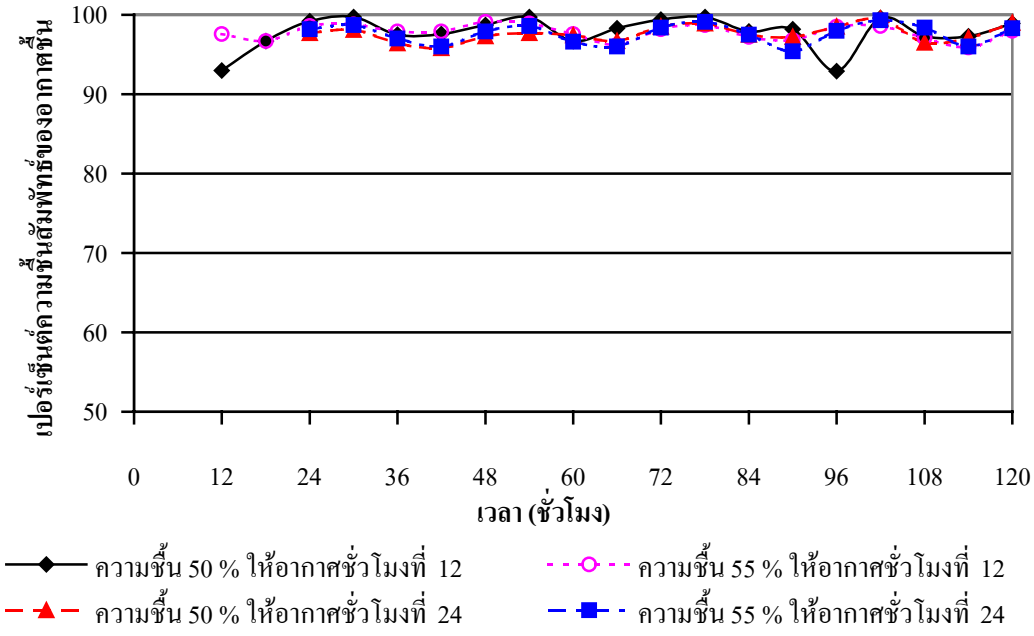
ภาพที่ 19 อุณหภูมิของอากาศชั้นขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



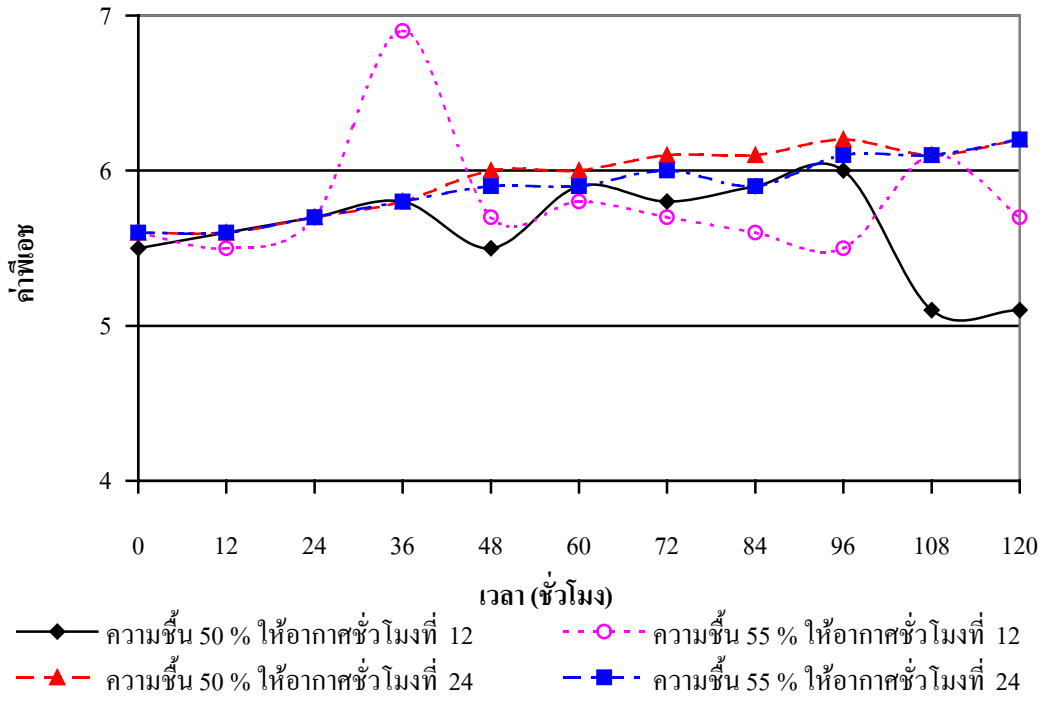
ภาพที่ 20 อุณหภูมิในเบดที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



ภาพที่ 21 ความชื้นของวัสดุหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



ภาพที่ 22 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศขาเข้าที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก



ภาพที่ 23 ค่าพีเอชที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก และเริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ของการหมัก

จากการทดลองในส่วนนี้ สรุปได้ว่า การหมักในถังแพคเบดเมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นวัสดุหมักเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ เริ่มให้อากาศในชั่วโมงที่ 24 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุดเป็น 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 60 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด

การหมักในระดับห้องปฏิบัติการหรือทำการหมักในฟลาสก์มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 936.00 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ซึ่งมากกว่าการหมักในถังหมักแบบแพคเบดที่มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง เพราะการหมักในฟลาสก์สามารถควบคุมอุณหภูมิในตู้บ่มให้อยู่ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียสตลอดเวลา

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วยต้นเชื้อรา *Aspergillus oryzae* โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คือ การหาวัสดุหมักที่เหมาะสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ส่วนที่สองเป็นการขยายขนาดการผลิตโดยทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด สามารถสรุปได้ดังนี้

1. จากการทดลองโดยนำรำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25, 50:50 และ 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาทำการหมักด้วยต้นเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยมีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 936.00 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 96 จึงเลือกวัสดุหมักสัดส่วนนี้มาทำการขยายการผลิตในถังหมักแบบแพคเบดต่อไป

2. การขยายขนาดการผลิตในถังหมักแบบแพคเบด ทำการศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักและระยะเวลาในการเริ่มให้อากาศชื้นเพื่อระบายความร้อนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังนี้

เมื่อนำวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาทำการหมักด้วยต้นเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในถังหมักแบบแพคเบด โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50, 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากการหมักด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาทีจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก พบว่า เมื่อความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากัน คือ 435.45 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง

เมื่อนำวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ มาทำการหมักด้วยต้นเชื้อรา *A. oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ผสมกับแป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมัก

แห้งในถังหมักแบบแพคเบด โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์และเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมักด้วยอัตราเร็วอากาศ 0.1 เมตรต่อวินาทีจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมโปรติเอสกับการทดลองเมื่อเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากการหมักที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 เปอร์เซ็นต์และเริ่มให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากการหมัก มีค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุด คือ 668.53 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 60 จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักแบบแพคเบด

ข้อเสนอแนะ

1. การขยายขนาดการหมักในถังหมักแบบแพคเบดมักพบปัญหาในการระบายความร้อน ซึ่งแก้ปัญหาโดยให้อากาศที่ผ่านถังเพิ่มความชื้นมาระบายความร้อนในถังแพคเบด แต่ก็ยังทำให้ความชื้นของวัสดุหมักลดลงแม้ว่าอากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงก็ตาม ส่งผลต่อการเจริญของรา การให้อากาศในงานวิจัยนี้ทำการให้อากาศตั้งแต่เวลาที่กำหนดจนสิ้นสุดการหมัก ทำให้สูญเสียความชื้นบนวัสดุหมักมาก ดังนั้นถ้ามีระบบควบคุมการให้อากาศช่วงระยะเวลาสั้นๆ ช่วงหนึ่งให้เพียงพอต่อการควบคุมอุณหภูมิภายในเบดไม่ให้สูงเกินที่กำหนด น่าจะเป็นการลดการสูญเสียความชื้นบนวัสดุหมักได้มากทางหนึ่ง

2. เนื่องจากวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าเมื่อผ่านการปรับความชื้นแล้ว ลักษณะของวัสดุหมักยังมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อนและแน่น ทำให้การถ่ายเทความร้อนไม่ดีเท่าที่ควร การแก้ปัญหาทำได้โดยอาจปรับเปลี่ยนรูปแบบการวางตัวของวัสดุหมักในชั้นเบด หรือหาวัสดุหมักชนิดอื่นๆที่เหมาะสมมาผสมเพื่อลดการจับตัวกันเป็นก้อนแน่นของรำข้าวเจ้า

3. ปริมาณราและแป้งที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้ในสัดส่วนของการผลิตโคจิ ซึ่งยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมเมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การปรับเปลี่ยนปริมาณราและแป้งทำให้รูปแบบอุณหภูมิในเบดเปลี่ยนไป ดังนั้นควรศึกษาผลของการเริ่มให้อากาศชื้นระบายความร้อนเพราะอาจต้องปรับเวลาในการเริ่มให้อากาศให้เร็วขึ้นหรือช้าลงตามอุณหภูมิในเบดเพื่อไม่ให้สูงเกินกว่าที่ควบคุมไว้ หรืออาจนำระบบควบคุมการให้อากาศชื้นมาใช้เพื่อช่วยอำนวยความสะดวกในการศึกษา นอกจากนี้อาจทำการเติมยูเรียหรือสารอาหารอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อช่วยกระตุ้นให้ราผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เพิ่มมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2534. **จุลชีวอุตสาหกรรม.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 309 น.

จุฬารัตน์ ครองแถว. 2547. **การผลิตต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* โดยวิธีการหมักแบบแห้งในถังแพคเบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. **อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลัง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ สุวรรณวินิจ และปรีชา สุวรรณวินิจ. 2547. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

นิลวรรณ เพชระบูรณิน. 2548. **พลังแห่งเอนไซม์บำบัด.** สำนักพิมพ์บริษัท พิมพ์ดีการพิมพ์ จำกัด. กรุงเทพฯ. 219 น.

ประสงค์ คุณานุวัฒน์ชัยเดช และคณะ. 2526. **ตำราชีวเคมี เล่ม 1.** โครงการตำรา กองทุนมหิดล มูลนิธิคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 444 น.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 442 น.

พวงพร โชติกไกร. 2546. **จุลชีววิทยาของอาหารและนม.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 331 น.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. **เอนไซม์.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 344 น.

พิบูลย์ มงคลสุข. 2541. **เชื้อราวิทยา.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 168 น.

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2525. **ราวิทยาเบื้องต้น.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 250 น.

เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2548. รายงานความก้าวหน้า เรื่อง **การพัฒนาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการหมักแบบแห้งในระดับอุตสาหกรรมด้วยถังแพคเบด.** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และมณีรัตน์ ติรนันทกุล. 2541. การทดลองศึกษาการหมักถั่วเหลืองในถังแพคเบด, น.209-217. ใน**การประชุมวิชาการทางวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8.** ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ไพโรจน์ วิริยจารี และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2534. **ปฏิบัติการอุตสาหกรรมการหมัก.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 79 น.

มณีรัตน์ ติรนันทกุล. 2542. **การศึกษาทดลองหมักถั่วเหลืองแบบอาหารแข็งในระบบแพคเบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พงษ์ประวัติ พิมพการัง. 2546. **การควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติแบบคำนวณตัวแปรในถังแพคเบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. **เทคโนโลยีชีวภาพ.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 163 น.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 209 น.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. **ราวิทยาเบื้องต้น.** สำนักพิมพ์จามจุรีโปรดักท์. กรุงเทพฯ. 351 น.

เรืองลักขณา จามิกรณ์. 2545. **ชีวเคมี 2.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 338 น.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ. 250 น.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 251 น.

สุนันทา ภิญญาวัธน์. 2544. **ชีวเคมี 1.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 241 น.

สุนันทา ภัญญาวัธน์. 2547. **ชีวเคมี 2.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 428 น.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2545. **จุลชีววิทยา.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 640 น.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2545. **เทคโนโลยีการหมัก.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 393 น.

สุภาภรณ์ พิศพันธ์. 2545. **การสร้างแบบจำลองการผลิตเอนไซม์และการจำลองระบบการหมักถั่วเหลืองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2540. **ข้าวสาลี: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 290 น.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. **ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 366 น.

อรพิน ภูมิภมร. 2523. **เอกสารประกอบการสอนวิชา วทอ.461 ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหมัก.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 234 น.

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. **Process Biochemistry.** 36: 1059-1068.

Anwar A. and Saleemuddin M. 1998. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology.** 64: 175-183.

Ashley V.M. et al. 1999. Evaluating strategies of overcomeing overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal.** 3: 141-150.

Biesebeke R.T. et al. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Research.** 2: 245-248.

Cochran T.W. and J.R. Vercellotti. 1978. Hexosamine biosynthesis of fungi as a reliable index of fungal biomass accumulation in liquid and solid media. **Carbohydrate Resource.** 61: 529-533.

Francis F. et al. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α-amylase by *Aspergillus oryzae.* **Biochemical Engineering Journal.** 15: 107-115.

Gervais P. and P. Molin. 2003. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** 13: 85-101.

Ghildyal, N.P. et al. 1994. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentation: Effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology.** 31: 253-257.

Han Y.W. and A.W. Anderson. 1975. Semisolid fermentation of rey grass straw. **Apply Microbial.** 30: 930-934.

Helmut Uhlig. 1998. **Industrial Enzymes and their Application.** 1st edition. John Wiley & Sons.Inc., p. 146-179.

Hesseltine, C.W. 1972. Solid-state fermentation. **Biotechnology Bioengineering.** 14: 517-532.

Mitchell D.A. et al. 1999. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Chemistry.** 35: 167-168.

Ogawa A. et al. 1995. Production of neutral protease by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* IAM2704. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 80: 35-40.

Pankey A. 2003. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** 13: 81-84.

Raghavarao K.S.M.S. et al. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.** 13: 127-135.

Rahardjo Y.S.P. et al. 2005. Effect of low oxygen concentrations on growth and α-amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. **Biomolecular Engineeering.** 21: 163-172.

Reed G. 1975. **Enzyme in Food Processing. 2nd ed.** Academic Press, Inc., New York and London. 572 p.

Sandhya C. et al. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry.** 40: 2689-2694.

Sangsurasak P. and D.A. Mitchell. 1995. The investigation of transient multi dimensional heat transfer in solid-state fermentation. **The Chemical Engineering Journal.** 60: 199-204.

Santos M.M.d. et al. 2004. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes?. **Bioresource Technology.** 93: 261-268.

Shuler M.L. and Kargi F. 2002**. Bioprocess Engineering.** 2nd edition. Prentice-Hall, Inc. 553 p.

Wang L. et al. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentation. **Biotechnology Advances.** 23: 115-129.

Wang R., R.C.S. Law and C. Webb. 2005. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochemistry.** 40: 214-227.

Yokotsuka T. 1960. Aroma and flavor of Japanese soy sauce. **Advanced Food Resource.** 10: 75-134.

Yong F.M. and B.J.B. Wood. 1974. Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. **Advanced Application Microbial.** 17: 157-194.

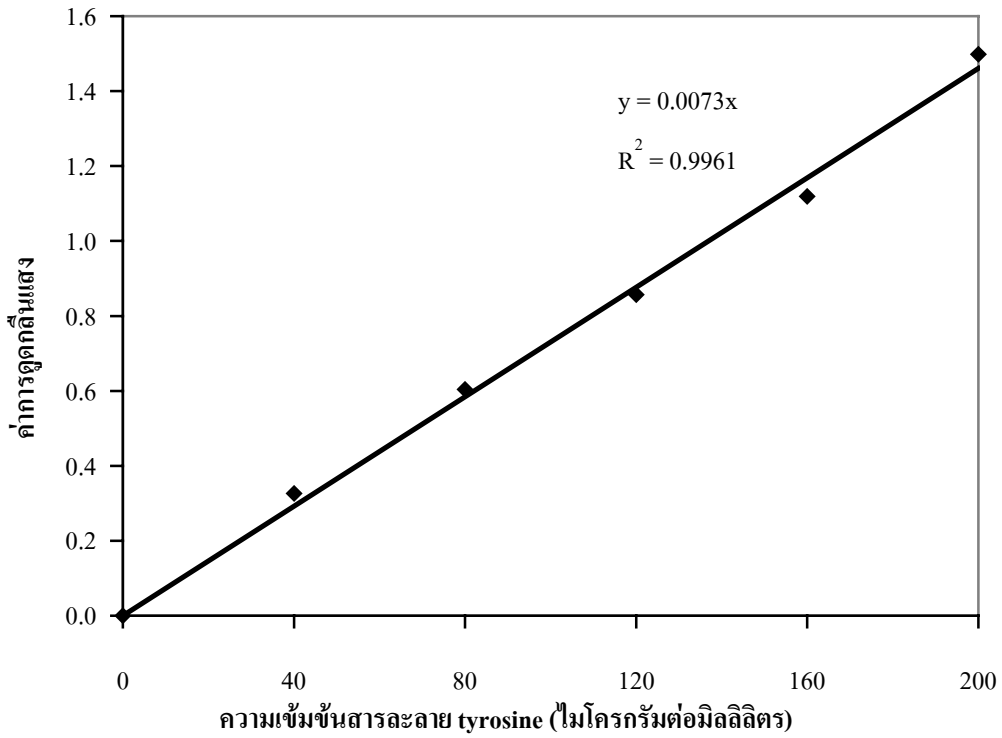
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
กราฟมาตรฐาน

1. <u>กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอส</u>

<u>ตารางผนวกที่ ก1</u> ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0.000
40	0.326
80	0.604
120	0.857
160	1.119
200	1.498

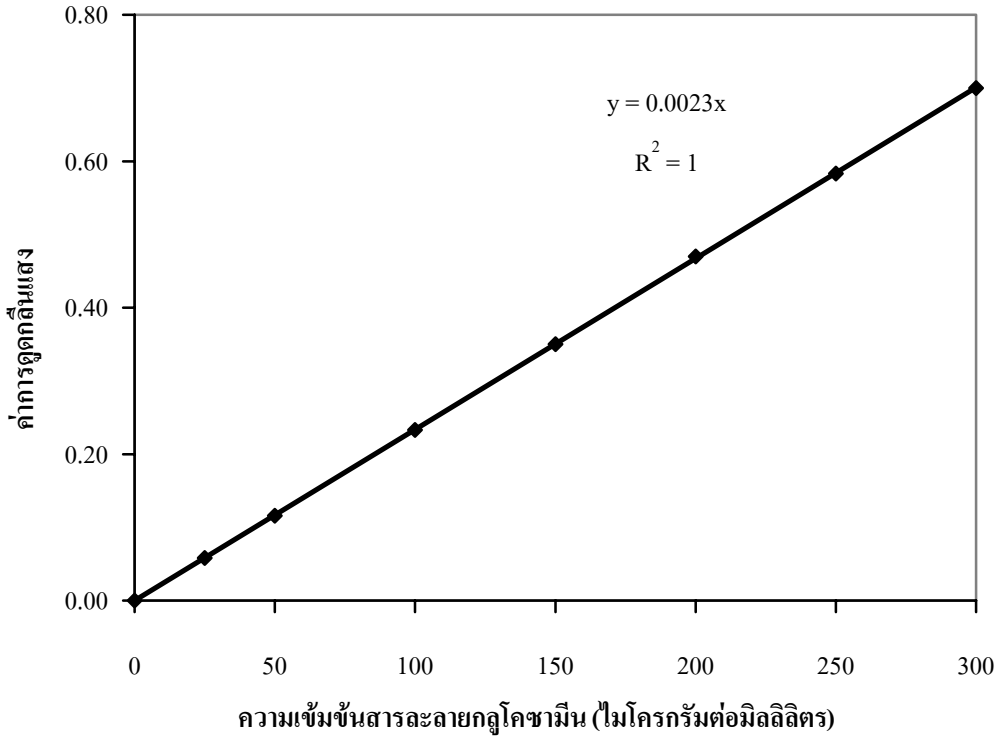


<u>ภาพผนวกที่ ก1</u> กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

2. <u>กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน</u>

<u>ตารางผนวกที่ ก2</u> ค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0.000
25	0.058
50	0.116
100	0.233
150	0.350
200	0.470
250	0.583
300	0.700



<u>ภาพผนวกที่ ก2</u> กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

ภาคผนวก ข
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	239.15	352.96	296.06
12	269.39	351.86	310.63
24	481.05	407.93	444.49
36	583.31	657.53	620.42
48	667.98	671.28	669.63
60	656.98	661.93	659.46
72	680.07	616.85	648.46
84	568.47	626.74	597.61
96	678.42	892.29	785.36
108	627.84	606.40	617.12
120	581.66	656.98	619.32

ตารางผนวกที่ ข2 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	47.14	49.48	48.31
12	47.12	49.90	48.56
24	50.66	53.49	52.08
36	52.36	55.32	53.84
48	53.64	58.35	56.00
60	53.00	57.52	55.26
72	57.26	59.96	58.61
84	55.31	58.64	56.98
96	57.74	60.40	59.07
108	61.92	71.03	66.48
120	58.54	60.94	59.74

ตารางผนวกที่ ข3 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	177.58	324.92	251.25
12	223.76	374.95	299.36
24	245.75	478.30	362.03
36	402.44	551.97	477.21
48	464.56	672.38	568.47
60	648.73	614.65	631.69
72	638.84	607.50	623.17
84	639.39	720.76	680.08
96	842.26	796.07	819.17
108	786.73	932.42	859.58
120	776.28	809.27	792.78

ตารางผนวกที่ ข4 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้รำข้าวเจ้า 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	50.19	48.39	49.29
12	49.96	52.15	51.06
24	51.47	51.36	51.42
36	54.58	53.15	53.87
48	57.28	52.94	55.11
60	58.86	58.57	58.72
72	59.59	56.61	58.10
84	59.50	60.70	60.10
96	68.25	60.00	64.13
108	64.37	64.44	64.41
120	62.84	57.53	60.19

ตารางผนวกที่ ข5 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	271.04	359.55	315.30
12	235.85	345.26	290.56
24	290.83	449.17	370.00
36	343.06	503.04	423.05
48	717.46	571.22	644.34
60	420.03	645.44	532.74
72	649.28	595.41	622.35
84	709.76	610.25	660.01
96	700.41	597.06	648.74
108	669.08	518.99	594.04
120	658.08	568.47	613.28

ตารางผนวกที่ ข6 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	51.76	52.22	51.99
12	50.50	52.47	51.49
24	52.39	54.52	53.46
36	53.63	56.91	55.27
48	54.52	58.97	56.75
60	56.99	59.44	58.22
72	59.65	62.07	60.86
84	57.53	62.24	59.89
96	60.16	61.45	60.81
108	62.97	63.47	63.22
120	56.43	63.58	60.01

ตารางผนวกที่ ข7 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 50:50 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	237.50	241.90	239.70
12	253.45	244.10	248.78
24	418.38	365.60	391.99
36	586.06	500.85	543.46
48	686.12	636.09	661.11
60	572.32	622.35	597.34
72	673.47	648.18	660.83
84	730.65	721.3	725.98
96	823.01	650.38	736.70
108	714.16	736.15	725.16
120	843.41	681.17	762.29

ตารางผนวกที่ ข8 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 50:50 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	49.71	50.27	49.99
12	50.02	51.51	50.77
24	52.92	54.64	53.78
36	55.93	58.67	57.30
48	59.18	59.67	59.43
60	60.24	60.33	60.29
72	60.27	59.84	60.06
84	60.98	61.78	61.38
96	62.67	62.02	62.35
108	65.50	63.67	64.59
120	59.72	64.76	62.24

ตารางผนวกที่ ข9 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	316.12	274.89	295.51
12	282.03	282.03	282.03
24	548.13	470.06	509.10
36	753.74	609.70	681.72
48	758.69	609.70	684.20
60	830.16	689.42	759.79
72	827.96	865.35	846.66
84	784.53	813.67	799.10
96	908.78	963.21	936.00
108	580.56	896.68	738.62
120	683.92	985.20	834.56

ตารางผนวกที่ ข10 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในฟลาสก์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	51.76	49.38	50.57
12	50.50	49.12	49.81
24	52.39	51.99	52.19
36	53.63	54.29	53.96
48	54.52	58.25	56.39
60	56.99	60.94	58.97
72	59.65	60.80	60.23
84	57.53	60.40	58.97
96	60.16	63.64	61.90
108	62.97	61.88	62.43
120	56.43	66.45	61.44

ตารางผนวกที่ ข11 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	236.68
12	253.45
24	264.17
36	260.59
48	296.05
60	312.82
72	359.83
84	403.81
96	438.45
108	392.54
120	425.53

ตารางผนวกที่ ข12 ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	5.47
12	5.58
24	8.37
36	7.62
48	9.34
60	9.34
72	9.55
84	14.27
96	20.82
108	24.89
120	19.21

ตารางผนวกที่ ข13 อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
12	28.5	72	27.5
18	29.6	78	26.8
24	28.2	84	27.8
30	27.2	90	27.8
36	28.5	96	25.8
42	29.6	102	24.8
48	28.1	108	26.4
54	27.1	114	26.5
60	29.1	120	25.2
66	29.0		

ตารางผนวกที่ ข14 อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0	40.4	66	38.8
6	33.1	72	34.2
12	40.4	78	33.7
18	32.5	84	39.0
24	34.2	90	39.8
30	34.1	96	34.5
36	34.2	102	32.3
42	35.1	108	35.0
48	33.7	114	34.0
54	32.2	120	30.1
60	36.9		

ตารางผนวกที่ ข15 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก
0	51.03
12	50.77
24	47.96
36	43.50
48	45.12
60	48.05
72	48.20
84	45.66
96	42.32
108	45.27
120	35.70

ตารางผนวกที่ ข16 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า	ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า
12	93.0	72	99.4
18	96.7	78	99.7
24	99.2	84	97.9
30	99.7	90	98.2
36	97.5	96	92.9
42	97.6	102	99.6
48	98.7	108	97.3
54	99.7	114	97.3
60	96.7	120	98.9
66	98.3		

ตารางผนวกที่ ข17 ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช
0	5.5
12	5.6
24	5.7
36	5.8
48	5.5
60	5.9
72	5.8
84	5.9
96	6.0
108	5.1
120	5.1

ตารางผนวกที่ ข18 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	217.71
12	261.42
24	291.11
36	299.35
48	319.97
60	312.55
72	346.08
84	399.14
96	438.45
108	415.08
120	435.15

ตารางผนวกที่ ข19 ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	6.55
12	7.19
24	11.16
36	14.06
48	15.13
60	17.06
72	19.42
84	18.67
96	19.10
108	39.81
120	25.97

ตารางผนวกที่ ข20 อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
12	26.6	72	23.2
18	26.5	78	21.4
24	25.5	84	22.2
30	23.8	90	24.5
36	23.8	96	23.4
42	24.5	102	21.1
48	22.8	108	21.5
54	21.6	114	22.5
60	21.7	120	21.3
66	24.0		

ตารางผนวกที่ ข21 อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0	40.3	66	32.3
6	29.5	72	32.4
12	28.3	78	30.4
18	28.7	84	32.2
24	29.3	90	37.5
30	28.5	96	37.3
36	28.7	102	34.6
42	30.7	108	37.8
48	30.3	114	40.2
54	29.2	120	38.5
60	28.8		

ตารางผนวกที่ ข22 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก
0	55.90
12	55.08
24	54.08
36	53.11
48	54.86
60	52.86
72	53.01
84	57.86
96	55.70
108	53.08
120	48.28

ตารางผนวกที่ ข23 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า	ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า
12	97.6	72	98.2
18	96.7	78	98.7
24	98.6	84	97.2
30	98.8	90	96.8
36	97.9	96	98.5
42	97.9	102	98.6
48	99.1	108	97.1
54	98.9	114	95.9
60	97.6	120	98.0
66	96.2		

ตารางผนวกที่ ข24 ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช
0	5.6
12	5.5
24	5.7
36	6.9
48	5.7
60	5.8
72	5.7
84	5.6
96	5.5
108	6.1
120	5.7

ตารางผนวกที่ ข25 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	252.90
12	268.84
24	276.26
36	271.04
48	280.66
60	299.63
72	343.33
84	361.48
96	334.26
108	346.36
120	382.92

ตารางผนวกที่ ข26 ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	7.94
12	8.15
24	10.41
36	10.62
48	10.62
60	14.70
72	13.41
84	18.35
96	23.71
108	13.39
120	20.06

ตารางผนวกที่ ข27 อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
12	28.3	72	27.3
18	29.1	78	26.3
24	27.8	84	27.6
30	26.9	90	28.4
36	27.4	96	27.5
42	28.9	102	27.0
48	27.3	108	28.0
54	26.4	114	28.2
60	27.2	120	28.4
66	28.6		

ตารางผนวกที่ ข28 อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0	40.8	66	34.2
6	29.3	72	31.1
12	33.2	78	27.1
18	23.9	84	28.7
24	25.7	90	31.2
30	26.9	96	28.2
36	30.4	102	26.9
42	34.0	108	28.7
48	30.8	114	28.8
54	31.2	120	26.9
60	32.8		

ตารางผนวกที่ ข29 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก
0	62.01
12	59.82
24	61.68
36	58.08
48	58.61
60	56.08
72	60.33
84	58.24
96	55.00
108	52.38
120	51.65

ตารางผนวกที่ ข30 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า	ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า
12	95.9	72	98.2
18	95.7	78	99.3
24	98.1	84	96.7
30	99.1	90	96.0
36	96.7	96	98.1
42	95.5	102	99.1
48	98.0	108	96.4
54	99.1	114	96.5
60	97.3	120	96.7
66	95.9		

ตารางผนวกที่ ข31 ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 60 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช
0	5.5
12	5.5
24	5.5
36	5.3
48	5.1
60	5.4
72	5.2
84	5.4
96	5.6
108	5.4
120	5.6

ตารางผนวกที่ ข32 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	216.34
12	233.65
24	235.30
36	373.30
48	493.70
60	668.53
72	585.24
84	582.21
96	610.80
108	348.83
120	371.92

ตารางผนวกที่ ข33 ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	6.65
12	7.94
24	10.41
36	15.02
48	23.18
60	33.26
72	34.98
84	30.58
96	36.05
108	22.75
120	31.44

ตารางผนวกที่ ข34 อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
24	21.9	78	22.7
30	19.8	84	24.3
36	20.3	90	26.6
42	21.9	96	26.0
48	21.8	102	25.5
54	20.9	108	27.2
60	21.3	114	27.7
66	23.5	120	26.6
72	23.1		

ตารางผนวกที่ ข35 อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0	37.7	66	41.0
6	27.3	72	39.4
12	25.5	78	36.1
18	31.3	84	36.1
24	39.6	90	37.0
30	22.6	96	33.4
36	26.1	102	31.1
42	36.2	108	31.9
48	37.8	114	32.6
54	35.7	120	31.0
60	39.0		

ตารางผนวกที่ ข36 ความชื้นของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก
0	50.49
12	50.68
24	49.70
36	50.90
48	47.11
60	39.38
72	30.55
84	27.02
96	22.14
108	23.14
120	21.41

ตารางผนวกที่ ข37 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า	ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า
24	97.7	78	98.9
30	98.1	84	97.5
36	96.4	90	97.2
42	95.8	96	98.5
48	97.3	102	99.5
54	97.7	108	96.5
60	97.4	114	97.1
66	96.7	120	99.0
72	98.5		

ตารางผนวกที่ ข38 ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช
0	5.6
12	5.6
24	5.7
36	5.8
48	6.0
60	6.0
72	6.1
84	6.1
96	6.2
108	6.1
120	6.2

ตารางผนวกที่ ข39 กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีและรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	กิจกรรมโปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	256.47
12	244.38
24	279.56
36	304.85
48	305.13
60	317.77
72	336.74
84	357.08
96	437.90
108	402.99
120	514.86

ตารางผนวกที่ ข40 ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)
0	8.69
12	7.62
24	10.62
36	12.23
48	14.81
60	18.13
72	30.26
84	26.61
96	41.95
108	35.73
120	36.27

ตารางผนวกที่ ข41 อุณหภูมิของอากาศหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
24	27.1	78	25.3
30	23.4	84	26.3
36	24.7	90	28.7
42	26.5	96	26.8
48	25.5	102	26.6
54	23.9	108	27.6
60	25.1	114	29.1
66	27.3	120	27.1
72	26.4		

ตารางผนวกที่ ข42 อุณหภูมิในเบดโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0	38.7	66	40.0
6	29.4	72	39.0
12	27.6	78	37.5
18	34.4	84	39.1
24	36.1	90	42.2
30	25.3	96	41.2
36	25.9	102	41.9
42	31.5	108	39.2
48	33.4	114	40.2
54	33.6	120	28.6
60	36.4		

ตารางผนวกที่ ข43 ความชื้นของวัสดุหมักเมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	เปอร์เซ็นต์ความชื้นในวัสดุหมัก
0	56.66
12	54.34
24	56.97
36	55.59
48	50.87
60	55.28
72	50.99
84	44.31
96	47.43
108	47.04
120	21.04

ตารางผนวกที่ ข44 ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้าหลังผ่านถังเพิ่มความชื้นโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า	ชั่วโมงที่	% ความชื้นสัมพัทธ์ของลมขาเข้า
24	98.2	78	99.1
30	98.7	84	97.5
36	97.0	90	95.4
42	96.0	96	98.0
48	97.9	102	99.3
54	98.6	108	98.4
60	96.6	114	96.0
66	96.0	120	98.3
72	98.4		

ตารางผนวกที่ ข45 ค่าพีเอชของวัสดุหมักโดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อรำข้าวเจ้าเป็น 25:75 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ให้อากาศตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช
0	5.6
12	5.6
24	5.7
36	5.8
48	5.9
60	5.9
72	6.0
84	5.9
96	6.1
108	6.1
120	6.2