

ศึกษาการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักต่อสัณฐานวิทยา และการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *Aspergillus oryzae* U1521 ในการหมักแบบอาหารเหลว โดยเลี้ยงราในถังหมักขนาด 2000 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร (Complex medium) ซึ่งประกอบด้วย 1% defatted soybean 0.5% lactose 0.5% KH_2PO_4 และ 0.1% casitone ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30°ซ อัตราการให้อากาศ 1 vvm ไม่ควบคุม pH ตลอดจนการทดลอง ปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจน (O) และ ก๊าซไนโตรเจน (N) ในสัดส่วน O:N ที่ 0:100 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 ที่อัตราการกวนสูง (700 rpm) และอัตราการกวนต่ำ (250 rpm)

จากการเลี้ยง *Aspergillus oryzae* U1521 โดยปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักด้วยก๊าซผสมในสัดส่วน ต่างๆ พบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของราชนิดนี้ ซึ่งพบลักษณะการเจริญที่แตกต่าง ไปจากสภาพอากาศปกติทั่วไป (ราเจริญเป็นเส้นใยเพียงอย่างเดียว) โดยพบการเจริญเป็นเพลเลีย (เส้นใยพันกันเป็นก้อนกลม) ที่มีขนาดต่างๆ ทั้งที่อัตราการกวนสูง และอัตราการกวนต่ำที่มีการปรับ สภาพบรรยากาศ

ที่อัตราการกวนสูง (700 rpm) เมื่อใช้ก๊าซผสมของออกซิเจนต่อไนโตรเจน (O:N) ที่ 0:100 ไม่พบการ ออก และการเจริญของสปอร์รา เนื่องจาก *Aspergillus oryzae* U1521 ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ ในขณะที่การใช้ก๊าซผสมในสัดส่วนอื่นๆ (O:N ที่ 20:80 50:50 80:20 และ 100:0) รมีการเจริญ

ในลักษณะเป็นเส้นใยพันกันเป็นก้อนกลมที่เรียกว่า เพลเล็ท ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยเพลเล็ทส่วนใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่สุดภายใน 48 ชั่วโมง โดยได้เพลเล็ทขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 157.02 ± 45.07 106.87 ± 25.64 99.69 ± 15.90 และ 94.91 ± 18.24 μm ที่สัดส่วน O:N ที่ 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 ตามลำดับ ผลการตรวจวัดค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสพบค่ากิจกรรมเอ็นไซม์สูงสุดภายในเวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 2480.00 ± 73.32 4273.33 ± 20.00 3274.67 ± 24.44 และ 3091.67 ± 43.72 U/ml ที่การปรับสภาพบรรยากาศของ O:N เป็น 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักแห้งที่บรรยากาศ O:N เป็น 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 ได้ค่าน้ำหนักแห้งดังต่อไปนี้เท่ากับ 3.76 ± 0.07 3.77 ± 0.07 3.85 ± 0.08 และ 3.45 ± 0.14 g/L ตามลำดับ แสดงว่าการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสให้ได้ในปริมาณสูงไม่ได้ขึ้นกับน้ำหนักเซลล์ระหว่างการหมักเพียงอย่างเดียวแต่มีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น ความสม่ำเสมอของขนาดเพลเล็ทที่ได้ ซึ่งลักษณะการเจริญแบบเพลเล็ทที่มีขนาดใกล้เคียงกันอาจทำให้การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสสูงขึ้นได้

ที่อัตราการกวนต่ำ (250 rpm) เมื่อใช้ก๊าซผสมของออกซิเจนต่อไนโตรเจน(O:N) ที่ 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 รมีการเจริญเป็นเพลเล็ทภายใน 24 ชั่วโมง และได้เพลเล็ทที่มีขนาดใหญ่สุดภายใน 48 ชั่วโมงเหมือนที่รอบการกวนสูง โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเพลเล็ทในแต่ละสภาพบรรยากาศของออกซิเจนต่อไนโตรเจนที่ 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 319.69 ± 80.30 338.57 ± 98.67 322.12 ± 89.04 และ 328.73 ± 99.79 μm ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบค่าน้ำหนักแห้ง และการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส พบว่าไม่แตกต่างกันมาก โดยได้ค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดคือ 4158.33 ± 87.79 4283.33 ± 52.04 4200.00 ± 50.33 และ 4115.00 ± 57.73 U/ml และค่าน้ำหนักแห้ง คือ 3.80 ± 0.12 4.07 ± 0.09 4.19 ± 0.09 และ 4.25 ± 0.06 g/L ที่บรรยากาศ O:N เป็น 20:80 50:50 80:20 และ 100:0 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้เป็นค่าสูงสุดที่สามารถตรวจพบภายในเวลา 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกับที่รอบการกวนสูง และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งที่ได้กับกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ได้

สรุปได้ว่าการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักแบบอาหารเหลวมีผลต่อสัณฐานวิทยา และการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* U1521 พบการเจริญเป็นเพลเล็ททั้งอัตราการกวนสูง และอัตราการกวนต่ำ และสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเร็วขึ้นกว่าการหมักภายใต้สภาพบรรยากาศปกติ สันนิษฐานว่าการปรับสภาพบรรยากาศที่มีก๊าซออกซิเจนร่วมกับไนโตรเจนอาจเร่งให้เกิดเมตาโบลิซึมเร็วขึ้น และเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา และทำให้มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเร็วขึ้น

The effect of modified atmosphere on cellular morphology of fungus, *Aspergillus oryzae* U1521 and alkaline protease production was studied. The fungus was cultivated in a two litre fermenter containing 1500 ml complex medium, 1% defatted soybean, 0.5% lactose, 0.5% KH_2PO_4 and 0.1% casitone. The fermentation was operated at 30 °C, 1.0 vvm of air flow rate and non control pH at a high agitation speed (700 rpm) and a low agitation speed (250 rpm). The atmosphere in the fermenter was provided by gas mixtures between oxygen (O) and nitrogen (N) with a ratio of oxygen to nitrogen (O:N) at 0:100, 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0, during submerged fermentation.

The cultivation of *Aspergillus oryzae* U1521 in submerged fermentation by modified atmosphere affected on fungal morphology. The pellets were found at various sizes in distinctively normal air (which only mycelium form was found) under high and low agitation speeds.

Under high agitation speed (700 rpm), it was found that the fungal spores could not germinate and develop growth in the only nitrogen atmosphere without oxygen supply (O:N = 0:100). While under the other atmospheres of O:N (20:80, 50:50, 80:20 and 100:0), the fungal spores of *A. oryzae* could germinate and develop to the pellets form after 24 hours inoculation. The largest diameters of fungal pellets were found at 48 hours. These were 157.02 ± 45.07 , 106.87 ± 25.64 , 99.69 ± 15.90 and

94.91±18.24 µm corresponding with the highest alkaline protease of 2480, 4273, 3275 and 3092 U/ml at the ratio of O:N at 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0, respectively. The maximum dry weight of 3.76±0.07, 3.77±0.07, 3.85±0.08 and 3.45±0.14 g/L which were obtained at the ratio of O:N = 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0, respectively did not relate to the highest alkaline protease at 48 hours. This indicated that maximum alkaline protease production is dependent on other factors, not only the dry cell weight. However it might be related to the uniformity of pellet size that might create more alkaline protease than the un-uniformity pellet.

Under low agitation speed (250 rpm), the pellets were also formed after 24 hour inoculation at the atmosphere of O:N at 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0. The largest diameter pellets were found at 48 hours. These are 319.69±80.30 338.57±98.67 322.12±89.04 and 328.73±99.79 µm, corresponding with the maximum alkaline protease of 4158 4283 4200 and 4115 U/ml at the ratio of O:N at 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0, respectively. The maximum dry weight under low agitation speed with different modified atmosphere at 48 hours was not much different. These are 3.80±0.12, 4.07±0.09, 4.19±0.09 and 4.25±0.06 g/L at the ratio of O:N at 20:80, 50:50, 80:20 and 100:0, respectively. No relationship between the maximum dry weight and the highest alkaline protease was found.

It can be concluded that the modified atmosphere affected on morphology and alkaline protease production of *Aspergillus oryzae* U1521 in submerged fermentation. The pellets were obtained under both high and low agitation speeds. Moreover the maximum alkaline protease is obtained in a shorter period of time at 48 hours under modified atmosphere, than under the conventional atmosphere. It is thought that the modified atmosphere of oxygen and nitrogen may increase cell metabolism and induce morphological change, then alkaline protease is rapidly produced.