

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษาการขยายขนาดกระบวนการหมัก *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย Fibrin โดยกระบวนการหมักแบบแข็งโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF)

Scaling-up process for production of fibrinolytic enzymes of *Bacillus subtilis* by solid state fermentation with the mathematical model of the dimensionless design factor (DDF)

### คณะผู้วิจัย

1. นาง จันทร์จิรา อยู่คง จงแจ้งกลาง
2. นาย พนิต กิจสุบรรณ
3. นาย ชานนท์ สัตยารมณ

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ประจำปี 2554

## คณะผู้วิจัย

### หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาษาไทย	นาง จันทรีจิรา อยู่คง จงแจ้งกลาง
ภาษาอังกฤษ	Mrs. Chungeera Youkong Jongjangklang
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย	40 %

### คณะผู้วิจัย

ภาษาไทย	นาย พนิต กิจสุบรรณ
ภาษาอังกฤษ	Mr. Panit Kitsubun
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย	30 %

ภาษาไทย	นาย ชานนท์ สัตยารมณ
ภาษาอังกฤษ	Mr. Chanon Sattayarom
สัดส่วนที่ทำงานวิจัย	30 %

## หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัย

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)  
83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150  
โทร.02-4707563-4 , โทรสาร.02-4523455

## บทคัดย่อ

การศึกษาการขยายขนาดกระบวนการหมัก *Bacillus subtilis* K-C3 เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟบริโนไลติก ด้วยกระบวนการหมักแบบแข็งโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) โดยมีการควบคุมอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนถังใน 2 สภาวะ สภาวะแรกควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่ 4.1 m<sup>3</sup>/h และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual เพื่อคำนวณหา temperature heat peak สภาวะที่สองควบคุมอัตราการให้อากาศ ให้คงที่ 12.8 m<sup>3</sup>/h โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF และอัตราการหมุนถังคงที่ที่ 7.5rpm จากการศึกษาพบว่าการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF มีผลอย่างชัดเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไฟบริโนไลติกเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งสองสภาวะที่ใช้ทดลอง โดยในสภาวะแรกพบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟบริโนไลติกสูงสุดเท่ากับ 1,336 unit/ g dry substrate ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 42 h ในขณะที่อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและค่า Rate of heat generation เท่ากับ 45.2 °C และ 1,081,738 J/h ตามลำดับ ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 6.75 h สภาวะที่สองซึ่งหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟบริโนไลติกสูงสุดเท่ากับ 2,243 unit/ g dry substrate ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 36 h อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและค่า Rate of heat generation เท่ากับ 38.1 °C และ 1,058,974 J/h ตามลำดับ ที่เวลาการหมัก 16.75 h จากการศึกษาสภาวะการหมักพบว่า การควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF และอัตราการหมุนถังที่สามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไฟบริโนไลติกให้สูงเพิ่มขึ้นประมาณ 900 unit/ g dry substrate เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการทดลองในสภาวะควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF เป็นเครื่องมือที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ในกระบวนการหมักแบบแข็ง นอกจากนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวแปรที่มีผลต่อค่าความร้อน เช่น คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการหมุนถังและลักษณะธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจเพิ่มการทำงานของเซลล์ที่ส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการผลิตเอนไซม์ไฟบริโนไลติก

### คำสำคัญ

เอนไซม์ไฟบริโนไลติก / บาซิลลัส ซับทิลิส / กระบวนการหมักแบบแข็ง / การขยายขนาดการผลิต

## Abstract

In this study, a scaling-up process for production of fibrinolytic enzymes of *Bacillus subtilis* K-C3 by solid state fermentation was optimized by using a mathematical model of the dimensionless design factor (DDF). The fermentation conditions were controlled by through an aeration rate and rotation speed. The first operating condition was constantly controlled at an aeration rate of 4.1 m<sup>3</sup>/h. The rotational speed was manually controlled using temperature heat peak calculation. The second condition was constantly controlled at an aeration rate of 12.8 m<sup>3</sup>/h which was obtained from the dimensionless design factor equation. The rotational speed was constantly maintained at 7.5 rph. The fibrinolytic enzyme activity was studied distinctively at different quantity when compared both conditions. The fibrinolytic activity of the first condition was 1,336 unit /g dry substrate after being cultivated for 42 h. The maximum temperature and rate of heat generation were found at 45.2°C and 1,081,738 J/h after 6.75 h, respectively. The second condition which was optimized by using dimensionless design factor equation produced the fibrinolytic enzyme activity after 36 h inoculation, at 2,243 unit/g dry substrate. The maximum temperature and rate of heat generation were 38.1°C and 1,058,974 J/ h at 16.75 h, respectively. This can be concluded that the fibrinolytic enzyme activity under the controlled condition of aeration rate using DDF and the constant controlled rotational speed higher was enhanced approximately 900 unit/g dry substrate when compared with the constantly controlled aeration rate and manually controlled rotational speed. The results suggested that the DDF model is a useful tool for improvement of enzyme in solid state fermentation. Moreover, the study of parameters affecting heat generation rate such as the property of substrate or culture medium, rotational speed and physical property of microbial strain were required. It is thought these factors may increase cell metabolism, thus resulting in the increase of fibrinolytic enzyme production.

### keywords

Fibrinolytic enzyme / *Bacillus subtilis* / solid state fermentation / scale up

## สารบัญ

		หน้า
สารบัญเรื่อง		i
สารบัญตาราง		iii
สารบัญรูป		iv
<b>บทที่ 1</b>	<b>บทนำ</b>	1
	1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ	1
	1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
	1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	9
	1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
	1.5 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป	11
	1.6 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	12
	1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	14
<b>บทที่ 2</b>	<b>วิธีดำเนินการวิจัย</b>	15
	2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์	15
	2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	15
	2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	15
	2.4 โปรแกรม	16
	2.5 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร	16
	2.6 คำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF)	19
	2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟบริโนไลติก (Fibrinolytic activity assay)	19
	2.8 ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต	19
	2.9 ความชื้น	19
	2.10 ค่า pH	19
<b>บทที่ 3</b>	<b>ผลการทดลองและวิจารณ์ผล</b>	20
	3.1 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศที่	20
	3.2 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ครั้งที่ 1	24

	3.3 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ครั้งที่ 2	27
<b>บทที่ 4</b>	<b>สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b>	<b>32</b>
	4.1 สรุปผลการทดลอง	32
	4.2 ข้อเสนอแนะ	32
<b>เอกสารอ้างอิง</b>		<b>33</b>
<b>ภาคผนวก</b>		<b>35</b>

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1-1	ผลิตภัณฑ์ Nattokinase ที่จำหน่ายในท้องตลาด	7
ตารางที่ 2-1	แสดงการคำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF) ในถังหมัก แบบหมุน 200 ลิตร (Manual)	23
ตารางที่ 2-2	แสดงการคำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF) ในถังหมัก แบบหมุน 200 ลิตร (constant flow rate of dry air)	30

## สารบัญรูป

รูปที่ 2-1	โคโลนีเชื้อ <i>B. subtilis</i> K-C3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง	17
รูปที่ 2-2	โคโลนีเชื้อ <i>B. subtilis</i> K-C3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง	17
รูปที่ 2-3	หัวเชื้อ <i>B. subtilis</i> K-C3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง	17
รูปที่ 2-4	ถังหมักแบบหมุน (Rotating Drum Bioreactor) ขนาด 200 ลิตร	18
รูปที่ 3-1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ <i>B. subtilis</i> K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก	20
รูปที่ 3-2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก	21
รูปที่ 3-3	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก	21
รูปที่ 3-4	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ <i>B. subtilis</i> K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก	24
รูปที่ 3-5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก	25
รูปที่ 3-6	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก	25
รูปที่ 3-7	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ <i>B. subtilis</i> K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก	27
รูปที่ 3-8	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH กับระยะเวลาการหมัก	28
รูปที่ 3-9	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก	28

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ

##### 1.1.1 Fibrinolytic enzymes และ Nattokinase

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์นัตโตะไคเนสประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 หน่วยและมีขนาดโมเลกุล 27.7 kDa ในปัจจุบันได้มีการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลของเอนไซม์ดังกล่าวอย่างละเอียด โดยมีการทำโมเดลถึงรูปแบบโมเลกุลสามมิติของเอนไซม์ดังกล่าว (Zheng *et al.*, 2005) ซึ่งพบว่าโมเลกุลเอนไซม์ดังกล่าวไม่พบ disulfide bond แต่พบ hydrogen-bond หลายตำแหน่ง และพบถึงตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการรับโปรตอนในสภาพต่าง (Thomas *et al.*, 1985) ซึ่งอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้พบว่า *B. subtilis* สร้าง alkaline protease และจะสามารถสร้างเอนไซม์นัตโตะไคเนสได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง

ในปัจจุบันนั้นได้มีผลิตภัณฑ์เอนไซม์นัตโตะไคเนสในหลากหลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นยาฉีด ซึ่งต้องการการผลิตที่มีขั้นตอนการ purify สูง ซึ่งมักจะใช้เชื้อที่ผ่านการตัดแต่งทางพันธุกรรม ตัวอย่างเช่น Peng *et al.* (2004) ซึ่งได้ตัดต่อยีนของ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งพบว่าผลิตเอนไซม์ที่เรียกว่า douche fibrinolytic enzyme (Peng *et al.*, 2002) ใวกับ *B. subtilis* ซึ่งเจริญเติบโตได้เร็วกว่าและเลี้ยงง่ายกว่า

อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์ที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมนั้นยังคงเป็นข้อถกเถียงถึงความเหมาะสมในการใช้ โดยเฉพาะเมื่อจะนำมาใช้เป็นอาหารเสริมมนุษย์ที่รับประทาน ในประเด็นดังกล่าวนั้นจะพบได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลุ่ม fibrinolytic มาใช้ในการผลิตอาหารเสริมมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาพบได้ว่าการปรับปรุงอาหารและกรรมวิธีการเลี้ยงก็สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2005) ที่ใช้ระบบการทดลองทางสถิติในการออกแบบอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Bacillus natto* NLSSE โดยอาหารที่ใช้ นั้นประกอบด้วย soy peptone, calcium chloride และ yeast extract เป็นองค์ประกอบสำคัญในอัตราส่วน 8.28, 0.64 และ 0.74 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจะสามารถให้ระดับกิจกรรมเอนไซม์นัตโตะไคเนสที่สูงถึง  $1,300 \pm 60$  Fibrinolytic Units (FU)/ml ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่ควรจะได้รับในแต่ละวันที่ระบุไว้ในอาหารเสริมจำพวกนัตโตะไคเนสที่วางจำหน่ายในท้องตลาดที่จะแนะนำที่ 2,000 FU ต่อวัน หรือการศึกษาของ Deepak *et al.* (2008) ที่หาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. subtilis* โดยใช้เทคนิค response surface method เพื่อจะออกแบบอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงที่ pH 7.5 โดยออกแบบอาหารโดยใช้ Glucose, Peptone, CaCl<sub>2</sub> และ MgSO<sub>4</sub> และพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:5.5:0.2:0.5 % W/V และสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงถึง 3,194.24 FU/ml

### 1.1.2 การหมักแบบแข็ง

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง หมายถึง กระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ให้เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งชื้น เช่น เมล็ดถั่วเหลือง รำข้าว หรือกากมันสำปะหลัง เป็นต้น โดยการหมักจะอยู่ในสภาวะที่ปราศจากน้ำอิสระ (Mitchell and Lonsane, 1992) แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การหมักแบบอาหารแข็งเป็นการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ การผลิตเอนไซม์ การผลิตเอทานอล และการผลิตโคจิ เป็นต้น การหมักแบบอาหารแข็งสามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ประหยัดพลังงาน สามารถลดปัญหาการบำบัดน้ำเสียหลังการหมักได้ดี การหมักแบบอาหารแข็งมีลักษณะคล้ายกับสภาวะธรรมชาติสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและได้ผลผลิตสูง

ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมนั้น ถังหมักจัดเป็นอุปกรณ์หนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เนื่องจากต้องทำหน้าที่รักษาภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณอากาศให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด นอกจากนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนในระหว่างการหมักจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งถังหมักที่นิยมใช้ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในระดับอุตสาหกรรม แบ่งออกเป็น 5 ชนิดด้วยกัน คือ

ถังหมักแบบถาด

ถังหมักแบบแพคเบด

ถังหมักแบบหมุน

ถังหมักแบบมีใบกวน

และถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์

ซึ่งคณะผู้วิจัยได้พัฒนากระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้ถังหมักแบบหมุน เพื่อผลิตหัวอาหารสัตว์ที่มีเอนไซม์ amylase และ protease สูง พบว่าถังหมักแบบหมุนสามารถใช้เลี้ยงราได้เป็นอย่างดี โดยถังหมักแบบหมุนมีข้อได้เปรียบกว่าระบบอื่นคือ ง่ายในการทำงาน การควบคุมความชื้นและอุณหภูมิของอาหารทำได้ง่าย เนื่องจากมีการหมุนของถังและสามารถฉีดน้ำสู่อาหารในถังหมักได้อย่างทั่วถึงตลอดเวลา ใช้แรงงานน้อย สามารถป้องกันการปนเปื้อนได้ง่าย ใช้พื้นที่ในการทำงานน้อย ลดต้นทุนการผลิตและสามารถขยายขนาดได้ง่าย

### 1.1.3 Dimensionless Design Factor (DDF)

ในส่วนของการขยายขนาดถังหมักแบบหมุนนั้น ได้มีความพยายามที่จะตั้งทฤษฎีเกี่ยวกับการขยายขนาดด้วยการนำสมการทางคณิตศาสตร์ซึ่งใช้อธิบายกระบวนการทางเทอโมไดนามิกส์มาประยุกต์ และใช้ dimensionless numbers ต่างๆเข้ามาช่วยอธิบายกระบวนการทางเทอโมไดนามิกส์หลักๆซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการหมัก โดย Hardin *et al.* (2000) ได้พัฒนากลุ่มของสมการที่

ใช้อธิบายการเกิดสมดุลของพลังงานภายในถังหมัก และได้คิดค้นตัวแปรที่เรียกว่า Dimensionless Design Factor (DDF) ไว้สำหรับการออกแบบถังหมักแบบหมุน

โดย Hardin *et al.* (2000) ได้คำนวณค่า DDF จากค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

$$DDF = \frac{R_q}{F_a C_p (T_B - T_{IN}) + F_a (C_{OUT} - C_{IN}) \lambda + h_A (T_B - T_{SURR})}$$

เมื่อ

- $R_q$  = Rate of heat generation (J/h)
- $F_a$  = Flow rate of dry air ( $m^3 h^{-1}$ )
- $C_p$  = Thermal capacity of air (J/kg•K)
- $T_B$  = Temperature of sub ( $^{\circ}C$ )
- $T_{IN}$  = Entry temperature of air into reactor ( $^{\circ}C$ )
- $T_{SURR}$  = Temperature of ambient air ( $^{\circ}C$ )
- $C_{OUT}$  = Water content of air exiting reactor (kg H<sub>2</sub>O/kg dry air)
- $C_{IN}$  = Water content of air entering reactor (kg H<sub>2</sub>O/kg dry air)
- $h_A$  = Overall heat transfer coefficient from drum to surrounding air (J/kg•h)
- $\lambda$  = Latent heat of vaporization of water (J/kg water)

DDF เป็นสมการที่บอกถึงความร้อนที่เกิดขึ้นภายในระบบแปรผันตรงกับการถ่ายเทความร้อนออกจากระบบ โดยสมการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับตัวแปรที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลความร้อน ความชื้น และอัตราเร็วของอากาศ ดังนั้นสมการดังกล่าวจึงได้ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมสภาวะการหมักภายในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร เนื่องจากโดยปกติกระบวนการหมักดังกล่าวมักมีความร้อนสูงเกิดขึ้น และสะสมอยู่ในถังหมัก การถ่ายเทความร้อนเกิดขึ้นได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นสมการดังกล่าวจึงสามารถช่วยในการควบคุมความร้อนและยังสามารถเป็นเครื่องมือในการคาดคะเนความร้อนที่จะเกิดขึ้นในระบบการหมักได้อีกด้วย

ในส่วน of คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการถ่ายเทมวลความร้อน โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200, 600 และ 5000

ลิตรเพื่อศึกษาหาอัตราการใช้อากาศที่เหมาะสมต่อการถ่ายเทความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักและเพื่อควบคุมปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ Amylase และ Protease ของเชื้อ *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* พบว่าเชื้อ *A. niger* สามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Amylase และ Acid protease ที่สูงเป็นที่น่าพอใจทั้งในถังหมักแบบหมุนขนาด 200, 600 และ 5,000 ลิตร ซึ่งผลการทดลองใน *A. oryzae* ก็ให้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Amylase และ Alkali protease ที่สูงเช่นเดียวกันทั้งในถังหมักแบบหมุนขนาด 200, 600 และ 5,000 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ไม่มีการประยุกต์ใช้ Dimensionless Design Factors ซึ่งผลการทดลองสามสรุปได้ว่าสามารถควบคุมปริมาณความร้อนที่จะเกิดขึ้นในระบบให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และลดระยะเวลาในการหมัก ส่งผลทำให้สามารถเก็บผลผลิตได้เร็วขึ้น

## 1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหัวใจและหลอดเลือดติดต้นเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ในปัจจุบันทั่วโลก จากรายงานสถานการณ์ความรุนแรงของโรคหัวใจและหลอดเลือดทั่วโลก พบว่าประชากรเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดจำนวน 14 ล้านคนในปี 2533 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วจำนวน 5 ล้านคน และในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาอีกจำนวน 9 ล้านคน และในปี 2563 ข้างหน้าสถานการณ์ดังกล่าวข้างต้นนี้มีแนวโน้มที่จะเพิ่มความรุนแรงสูง ขึ้นเป็นลำดับ จาก 14 ล้านคน ในปี 2533 เป็น 25 ล้านคน ในปี 2563 ซึ่งจะจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วจำนวน 6 ล้านคน และในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาอีกจำนวน 19 ล้านคน (Global burden of Disease; Lancet :1996)

สำหรับประเทศไทยแล้วนั้น อัตราการเสียชีวิตจากกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดจะติดอันดับ 1 ใน 3 มาโดยตลอด ซึ่งที่สำคัญได้แก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจล้มเหลว โรคหลอดเลือดสมอง โดยในปี 2545 นั้นมีผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นจำนวน 32,903 คน และเพิ่มสูงขึ้น เป็นจำนวน 40,092 คน ในปี 2546 สำหรับผู้ป่วยจากโรคหัวใจขาดเลือดในปี 2545 มีจำนวน 77,323 คน และเพิ่มสูงขึ้นเป็นจำนวน 92,733 ในปี 2546 นอกจากนี้ยัง พบว่า จำนวนผู้ป่วยจากโรคหัวใจและหลอดเลือดที่เข้ารับบริการในแผนกผู้ป่วยนอกเพิ่ม สูงขึ้นมากกว่า 3 เท่า ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยที่เข้ารับบริการในแผนกผู้ป่วยในเพิ่มสูงขึ้น มากกว่า 7-17 เท่า เมื่อพิจารณาถึงความพิการในประชากรผู้สูงอายุนั้นจะพบว่า มีสาเหตุมาจากโรคหลอดเลือดสมอง (อัมพฤกษ์ อัมพาต) เป็นอันดับหนึ่ง และจากหลักฐานการศึกษาที่มีอยู่ยืนยันว่าขนาดของปัญหาที่ขยายใหญ่ขึ้นเป็นลำดับนั้น พบว่าแนวโน้มผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดจะมีอายุน้อยลง สาเหตุเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงในวิถีชีวิตประจำวันที่พัฒนาค่านิยมในการบริโภคเพิ่มสิ่ง อำนวยความสะดวกในชีวิตประจำวันเป็นชีวิตสังคมเมืองมากขึ้น นำไปสู่การเพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดมากขึ้นด้วย เช่น ขาดการออกกำลังกาย มีชีวิตนั่งๆนอนๆ และมีการเคลื่อนไหวร่างกายน้อยลง รวมทั้งปัญหาการบริโภคเกิน รับประทานผักและผลไม้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ จากการสำรวจพฤติกรรมการออกกำลังกายของสำนักงานสถิติแห่งชาติ พ.ศ. 2547 (NSO) พบว่า ประชากรอายุ 15 ปีขึ้นไป มีพฤติกรรมการออกกำลังกายในระหว่าง 1 เดือนก่อนการสัมภาษณ์มีจำนวนน้อยมากคิดเป็นร้อยละ 29.10 เมื่อพิจารณาถึงพฤติกรรมการบริโภคผักของคนไทยจากการศึกษาของศูนย์ข้อมูลโรคไม่ติดต่อ สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค ในโครงการระบบเฝ้าระวังพฤติกรรมเสี่ยงโรคไม่ติดต่อและการบาดเจ็บ BRFSS (Behavioral Risk Factors Surveillance System) ปี 2547 ของประชากรอายุ 15 ปี ขึ้นไป ใน 41 จังหวัด บริโภคผักอย่างเพียงพอ (> 5 หน่วยมาตรฐานต่อวัน) มีจำนวนน้อยมาก คิดเป็นร้อยละ 12.24 จังหวัดที่บริโภคผักน้อยที่สุด คือ พัทลุง มหาสารคาม และตรัง คิดเป็นร้อยละ 2.37, 4.19 และ 4.48 ตามลำดับ (www.thaiheartclinic.com, 2551)

ซึ่งเนื่องมาจากวิถีชีวิตที่เปลี่ยน ไปนั้นจึงทำให้ต้องหาวิธีการป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งในปัจจุบันนั้นประชาชนเริ่มมีความตื่นตัวเกี่ยวกับการรักษา

สุขภาพของตนเองมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากการเกิดขึ้นของฟิคนเนสเซ็นเตอร์ต่างๆ จำนวนมาก หรือ การรวมกลุ่มกันออกกำลังกายตามพื้นที่สาธารณะต่างๆ นอกจากนั้น ประชาชนยังจับจ่ายใช้สอยเพื่อซื้ออาหารเสริมสุขภาพกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งสำหรับโรคหลอดเลือดนั้น สินค้าที่เป็นที่นิยมคือ เอนไซม์กลุ่มไฟบริโนไลติก (Fibrinolytic enzymes) หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่ากลุ่มเอนไซม์ นัตโตโคไคนเนส (Nattokinase)

เอนไซม์นัตโตโคไคนเนสนั้นในเบื้องต้นถูกสกัดจากถั่วเน่าญี่ปุ่น (Natto) ซึ่งเรียกกันว่า Subtilisin NAT ซึ่งนัตโตโคไคนเนสเป็นเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส (Serine protease) ซึ่งจากการทดลองโดย Fujita *et al.* (1993, 1995a, 1995b) พบว่ามีความสามารถในการย่อย Fibrin สูง แต่ในความเป็นจริงแล้ว subtilisin NAT ไม่ใช่เอนไซม์ตัวเดียวที่มีความสามารถในการย่อย fibrin ได้ ดังเช่นที่พบได้ในถั่วหมักแบบจีนที่เรียกว่า douchi (Peng *et al.*, 2003) และพบเอนไซม์ที่เรียกชื่อว่า subtilisin DFE ซึ่งมีความสามารถในการย่อย thrombi ได้ในร่างกายมนุษย์และไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เม็ดเลือด จึงเหมาะที่จะใช้เป็นการลดการตีบตันในเส้นเลือด และนอกจากนี้ยังพบกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย fibrin ในอาหารอีกหลายหลากและมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถพบเอนไซม์กลุ่มดังกล่าวได้ในอาหารหมักชนิดอื่นๆ รวมไปถึงถั่วหมักหรือถั่วเน่าแบบพื้นเมืองของประเทศไทยด้วย โดยเชื่อที่ถูกใช้ในกระบวนการหมักถั่วดังกล่าว ซึ่งถูกนำไปเชื่อมโยงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว คือ *Bacillus subtilis* นั้นเอง ดังนั้น การรับประทานอาหารตระกูลถั่วหมักจาก *B. subtilis* และเชื้ออื่นๆ เป็นประจำจะสามารถช่วยป้องกันอาการตีบตันของหลอดเลือดได้ (Suzuki *et al.*, 2003a, 2003b) อย่างไรก็ตาม ปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวในสารสกัดจากถั่วหมักจะให้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงกว่าในถั่วเน่าทั่วไปถึง 50 เท่าตัว จึงเหมาะสำหรับคนที่ไม่ชอบในรสชาติหรือกลิ่นของถั่วหมัก

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มียาอาหารเสริมจำพวกนัตโตโคไคนเนสวางจำหน่ายแต่อย่างใด ทั้งๆ ที่อาหารเสริมกลุ่มดังกล่าวเป็นที่แพร่หลายแล้วโดยเฉพาะในทวีปอเมริกา ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 1-1 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในลักษณะของเอนไซม์ดังกล่าวในท้องตลาด อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นได้ว่าจะเป็นอาหารเสริมที่ใช้รับประทานเป็นส่วนใหญ่ โดยจะมีราคาขายแตกต่างกันตั้งแต่ 15 – 80 USD ขึ้นอยู่กับยี่ห้อและปริมาณแคปซูล แต่จะให้กิจกรรมเอนไซม์กลุ่มไฟบริโนไลติกที่ 2,000 FU ต่อแคปซูลเป็นส่วนใหญ่

ตารางที่ 1-1 ผลิตภัณฑ์ Nattokinase ที่จำหน่ายในท้องตลาด

Brand	Milligram per capsule	FU per capsule	Number of capsules	Price (USD)
Doctor's best	100	2000	30	27.99
Nattozyme	100	1000	60	19.95 - 41.00
Source Naturals NSK-SD	100	-	60	25.49 - 49.90
NOW	100	2000	60	15.99 - 29.99
Wobenzym USA	-	1500	120	19.95 - 37.67
Neprinol SEBkinase - AFD	150	-	-	80
Allergy Research	50	-	90	28.47 – 40.99
Vesta	100	-	90	25.19
Medica	100	-	90	20.78 – 25.98

เนื่องจากทางกลุ่มวิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นและพบว่าใน BCC มี *B. subtilis* ที่เป็นเชื้อปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) ที่สร้าง fibrinolytic enzyme ที่มี specific fibrinolytic activity ได้ในระดับสูงเทียบเท่าหรือดีกว่าผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด จากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการภายใต้โครงการ “การศึกษากายภาพขนาดกระบวนกรหมัก *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย Fibrin โดยกระบวนกรหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวและแบบแข็ง” (แหล่งทุนศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) ได้ผลปริมาณกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 3,225 unit ต่อกรัมผลิตภัณฑ์แห้ง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L โดยใช้หัวเหลืองซีกบดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 52.66 % และเติมหัวเชื้อ 5 % (v/w) หมุนด้วยความเร็วรอบคงที่ 0.2 rpm ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอัตราการให้อากาศที่  $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$  และ 0.7 m/s ตามลำดับ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic สูงสุดเท่ากับ 1,480 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการหมักในถังหมักขนาด 200 ลิตรให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ที่ต่ำกว่าการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงควรทำการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อการขยายขนาดกระบวนกรหมัก *B. subtilis* เพื่อผลิตอาหารเสริมที่มีเอนไซม์ fibrinolytic สูง โดยกระบวนกรหมักแบบแข็งโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless

Design Factors (DDF) ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร ต่อไป ซึ่งจะเป็นการสร้างเทคโนโลยีการผลิตอาหารเสริมด้วยต้นทุนที่มีในประเทศและลดการนำเข้าอาหารเสริมจากต่างประเทศที่มีราคาแพง

### 1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาการขยายขนาดกระบวนการผลิตเอนไซม์กลุ่ม Fibrinolytic ด้วยเชื้อ *B. subtilis* ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยใช้เทคโนโลยีภายในประเทศซึ่งเน้นความเป็นไปได้ในการผลิตสารดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรม

#### 1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขยายขนาดการผลิตเอนไซม์กลุ่ม Fibrinolytic โดยกระบวนการหมักแบบแข็งในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตรโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ช่วยในการควบคุมถังหมัก

### 1.5 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร

การเตรียมหัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ปริมาตร 700 mL เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ทำการหมักครั้งนี้ นำถั่วเหลืองบดมาปรับความชื้นประมาณ 50 % แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ใส่ถั่วเหลืองบดลงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ปริมาณ 5 % (v/w) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คลุกหัวเชื้อให้ทั่ว หมุนด้วยความเร็วที่เหมาะสม ควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าที่  $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$  และควบคุมอัตราการให้อากาศ ทำการหมักเป็นเวลา 42-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH

โดยทำการทดลองในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนดัง ดังนี้

1. ควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่และอัตราการหมุนถึง โดยวิธี Manual ตามความเหมาะสม เพื่อคำนวณหา temperature heat peak (ซึ่งใช้ในการคำนวณใน DDF)

2. ควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) และอัตราการหมุนถึงคงที่

## 1.6 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคหัวใจและหลอดเลือดตีบตันเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นๆ ในปัจจุบันทั่วโลก สำหรับประเทศไทยแล้วนั้น อัตราการเสียชีวิตจากกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดจะติดอันดับ 1 ใน 3 มาโดยตลอด ซึ่งที่สำคัญได้แก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคหัวใจล้มเหลว โรคหลอดเลือดสมอง ซึ่งเนื่องมาจากวิถีชีวิตที่เปลี่ยนไปนั้นจึงทำให้ต้องหาวิธีการป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินหัวใจและหลอดเลือด ทางกลุ่มวิจัยจึงเล็งเห็นถึงความเป็นไปได้ในการศึกษาวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ในการผลิตเอนไซม์กลุ่มไฟบริโนไลติก (Fibrinolytic enzymes) หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า กลุ่มเอนไซม์นัตโตะไคเนส (Nattokinase) ซึ่งได้รับการยอมรับโดยทั่วไปถึงศักยภาพในการช่วยป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดตีบตัน เนื่องจากความสามารถในการย่อย thrombi โดยจะเลือกใช้เชื้อที่ได้รับการเชื่อกันว่าปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) คือ *B. subtilis* โดยจะศึกษากรรมวิธีการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจากกระบวนการหมักแบบแข็งเป็นหลักและศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เนื่องจากการหมักแบบแข็งเป็นการหมักที่มีต้นทุนต่ำ และในปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักแบบแข็งมากขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำอาหารที่หมักเสร็จไปเป็นอาหารเสริมโดยตรงโดยไม่ต้องผ่านกรรมวิธีการแยกเอนไซม์ อีกทั้งเชื้อ *B. subtilis* ที่ใช้ยังเป็นเชื้อที่สกัดมาจากอาหารมนุษย์และเป็นเชื้อปลอดภัย (GRAS) จึงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารเสริมโดยตรงได้ ซึ่งในโครงการนี้จะทำการขยายขนาดการผลิตในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตรและจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อครั้งละประมาณ 10 - 20 กิโลกรัม ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพของกลุ่มวิจัยพบว่าถังหมักแบบหมุนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการเลี้ยงจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากถังหมักแบบหมุนมีระบบควบคุมอุณหภูมิ และการระบายอากาศที่ดี จึงทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์สูง

สำหรับสภาวะการเลี้ยงนั้นจะอ้างอิงจากผลการทดลองในโครงการ“การศึกษากายขยายขนาดกระบวนการหมัก *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อย Fibrin โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวและแบบแข็ง” ซึ่งสามารถนำผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อโดยกระบวนการหมักแบบแข็งในระดับห้องปฏิบัติการมาประยุกต์ใช้ในการหมักในถังหมักแบบหมุนได้ดี โดยใช้ถั่วเหลืองบดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความชื้นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 50 % และควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 37 °C นอกจากนี้จะทำการศึกษากายขยายขนาดการผลิตโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ช่วยในการควบคุมถังหมักเพื่อควบคุมการถ่ายเทความร้อน เปรียบเทียบกับการควบคุมถังหมักแบบปกติที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะออกมาในรูปแบบของอาหารเสริมในรูปแบบแข็ง โดยยังไม่ผ่านการสกัดเอนไซม์ออกมา สามารถนำไปทำเป็นรูปแบบผงและบรรจุในแคปซูลขายเป็นอาหารเสริม

ได้เลยเป็นต้น นอกจากนั้นหากจำเป็นต้องทำการสกัดสารดังกล่าวก็จะพบได้ว่าจะมีต้นทุนการผลิต  
ที่สูงขึ้น

## 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 เทคโนโลยีการผลิตอาหารเสริมที่มีกิจกรรมของ Fibrinolytic เอ็นไซม์สูงในระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้ถังหมักแบบหมุน

1.7.2 ทราบถึงความเป็นไปได้ในเชิงธุรกิจของการผลิต Fibrinolytic เอ็นไซม์โดยใช้เทคโนโลยีในประเทศ

## บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

1. *Bacillus subtilis* K-C3 จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

### 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth (NB): Himedia Laboratories. Pvt. Ltd., India
2. Nutrient Agar (NA): Himedia Laboratories. Pvt. Ltd., India
3. ถั่วเหลืองซีก (Peeled-Split Soy Bean): บริษัท อุตสาหกรรมอาหารไทย (1964) จำกัด

### 2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ถังหมักแบบหมุน (Rotary Drum Reactor) ขนาด 200 ลิตร: สถาบันพัฒนาและฝึกอบรม โรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave): HVE-25/50, Hirayama, Japan
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer): DR 2500 HACH Odyssey, Rhys Scientific Ltd., UK
4. Laminar flow: Holten LaminAir Type S-2010 1.5, Heto-Holten A/S, Denmark
5. เครื่องวัดความเร็วลม (Anemometer): Spec Scientific 850070, Spec Scientific Ltd., US
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (High Speed Refrigerated Centrifuge): Sigma, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance): CP 224S, Sartorius Ag Gottingen, Germany
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance): CP 3202S, Sartorius Ag Gottingen, Germany
9. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven): Venticell, Medcenter Einrichtungen GmbH, Germany
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (Incubator): KBF 115, Binder, Germany
11. เครื่องบด: Type SM 2000/750 Upm, Retsch GmbH & Co. KG, Germany
12. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ Type I & II: UPW 12+Genpure UV/UF, TKA, Germany
13. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath): WB 29, Memmert GmbH & Co KG, Germany
14. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer): VTX-3000L, LMS Co. Ltd., Japan

15. เตาไมโครเวฟ (Microwave Oven) : SHARP, Thailand

## 2.4 โปรแกรม

1. โปรแกรม LabVIEW 8.5: National Instruments Corporation, US

## 2.5 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร

การเตรียมหัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 (ดังรูป 2-1, 2-2 และ 2-3) โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ปริมาตร 1.86 L เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

ทำการหมักดังนี้ นำถั่วเหลืองซีกที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบด (ความชื้นประมาณ 7%) 20 kg มาปรับความชื้นด้วยน้ำประปาให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ใส่ถั่วเหลืองบดลงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L (ดังรูป 2-4, ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 95-100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ปริมาตร 1.86 L (5 % (v/w), จำนวนจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับความชื้นแล้ว) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คลุกหัวเชื้อให้ทั่ว ควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  (โดยใช้โปรแกรม LabVIEW 8.5 เป็นตัว monitoring ของค่าอุณหภูมิต่างๆในถังหมัก) ทำการหมักเป็นเวลา 42-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH โดยมีการควบคุมอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนถังใน 2 สภาวะ ดังนี้

1. ควบคุมอัตราการให้อากาศที่คงที่  $4.1 \text{ m}^3/\text{h}$  (อัตราต่ำสุดของ Blower ที่สามารถทำงานได้) และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual เพื่อค้นหา temperature heat peak (ซึ่งใช้ในการคำนวณใน DDF ต่อไป)

2. ควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ให้คงที่ที่  $12.8 \text{ m}^3/\text{h}$  และอัตราการหมุนถังคงที่ (7.5 rpm)



รูปที่ 2-1 โคโลนีเชื้อ *B. subtilis* K-C3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง



รูปที่ 2-2 โคโลนีเชื้อ *B. subtilis* K-C3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง



รูปที่ 2-3 หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่อุณหภูมิ 37 °C อายุ 18 ชั่วโมง



รูปที่ 2-4 ถังหมักแบบหมุน (Rotating Drum Bioreactor) ขนาด 200 ลิตร

## 2.6 คำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF)

Hardin *et al.* (2000) ได้คำนวณค่า DDF จากค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

$$DDF = \frac{R_q}{F_a C_p (T_B - T_{IN}) + F_a (C_{OUT} - C_{IN}) \lambda + h_A (T_B - T_{SURR})}$$

เมื่อ

- $R_q$  = Rate of heat generation (J/h)
- $F_a$  = Flow rate of dry air ( $m^3 h^{-1}$ )
- $C_p$  = Thermal capacity of air (J/kg•K)
- $T_B$  = Temperature of sub ( $^{\circ}C$ )
- $T_{IN}$  = Entry temperature of air into reactor ( $^{\circ}C$ )
- $T_{SURR}$  = Temperature of ambient air ( $^{\circ}C$ )
- $C_{OUT}$  = Water content of air exiting reactor (kg H<sub>2</sub>O/kg dry air)
- $C_{IN}$  = Water content of air entering reactor (kg H<sub>2</sub>O/kg dry air)
- $h_A$  = Overall heat transfer coefficient from drum to surrounding air (J/kg•h)
- $\lambda$  = Latent heat of vaporization of water (J/kg water)

## 2.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟบริโนไลติก (Fibrinolytic activity assay)

ดัดแปลงจาก Anson (1938) ตามภาคผนวก

## 2.8 ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต

ตามภาคผนวก

## 2.9 ความชื้น

ตามภาคผนวก

## 2.10 ค่า pH

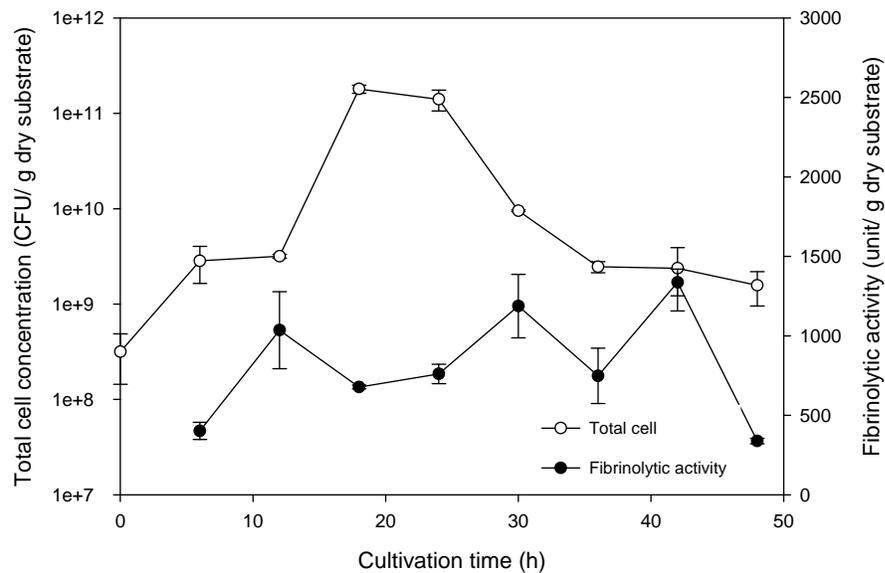
ตามภาคผนวก

### บทที่ 3

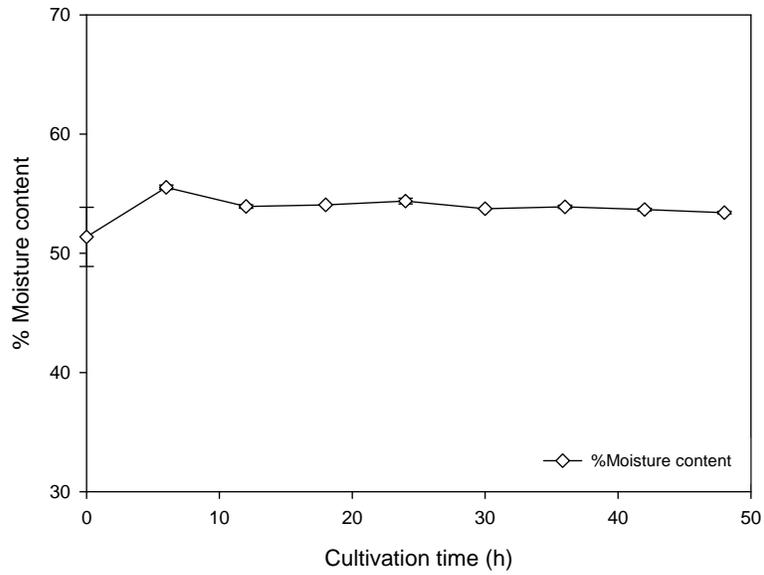
#### ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

##### 3.1 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศที่

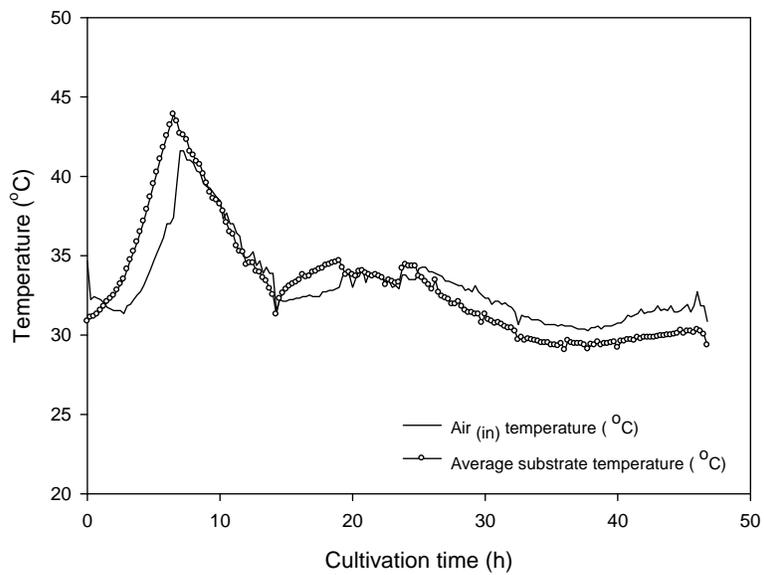
ทำการหมักโดยการนำตัวเหลืองมาปรับความชื้นด้วยน้ำประปาให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ใส่ตัวเหลืองบดลงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ปริมาตร 5 % (v/w) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คลุกหัวเชื้อให้ทั่วควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  ทำการหมักเป็นเวลา 42-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต และความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีการควบคุมอัตราการให้อากาศที่คงที่  $4.1 \text{ m}^3/\text{h}$  (อัตราต่ำสุดของ Blower ที่สามารถทำงานได้) และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมเพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Manual เพื่อคำนวณหา temperature heat peak (ซึ่งใช้ในการคำนวณใน DDF ต่อไป) ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3-1 ถึง 3-3



รูปที่ 3-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก

การหมักในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร ด้วยการควบคุมอัตราการให้อากาศที่พบว่า ความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเท่ากับ  $3.16 \times 10^8$  CFU/ g dry substrate จนมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดที่ 18 ชั่วโมง เท่ากับ  $1.80 \times 10^{11}$  CFU/ g dry substrate แล้วลดลงเหลือเท่ากับ  $1.57 \times 10^9$  CFU/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-1) กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแล้วลดลงหลังเวลาการหมักที่ 42 ชั่วโมง โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,336 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 42 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 3-1)

ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงไม่มากนัก โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (ที่เวลาการหมักที่ 6 ชั่วโมง) มีค่าความชื้นเท่ากับ 55.53 % และค่าความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 53.41 % ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-2)

จากการสังเกตทางกายภาพ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ ถ้วยเหลืองบด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแล้วมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % มีลักษณะร่วนไม่จับกันแน่น หลุดจากการใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ลงไปแล้วจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความร่วนซุยลดลงและจับตัวกันเป็นก้อนแน่นมากขึ้น (การหมักถังหมักที่ความเร็วรอบที่สูงขึ้นก็ยิ่งทำให้อาหารจับตัวเป็นก้อนกลมรีใหญ่ขึ้น) รวมทั้งมีความเหนียวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

อุณหภูมิอากาศขาเข้าอยู่ในช่วง  $30.3 - 41.6$  °C โดยอุณหภูมิอากาศขาเข้าตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ  $33.2$  °C ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง  $29.1 - 43.9$  °C โดยอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ  $33.1$  °C และอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ  $45.2$  °C ที่เวลาการหมัก 6.75 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 3-3)

จากค่าอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (เท่ากับ  $45.2$  °C) ที่วัดได้จากการทดลองสามารถนำไปคำนวณค่า Rate of heat generation ของการทดลองนี้ด้วยสมการ DDF ได้เท่ากับ 1,081,738 J/h ซึ่งค่า Rate of heat generation สามารถนำไปใช้ในการคำนวณค่าอัตราการให้อากาศ (Flow rate of dry air) ที่เหมาะสม (หมายถึง DDF มีค่าประมาณ 1.0) เพื่อใช้ในการควบคุมอัตราการให้อากาศของการทดลองครั้งต่อไป โดยที่กำหนดให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Temperature of substrate) มีค่าเท่ากับ  $37$  °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* K-C3 การคำนวณโดยใช้สมการ DDF แสดงในตารางที่ 2-1

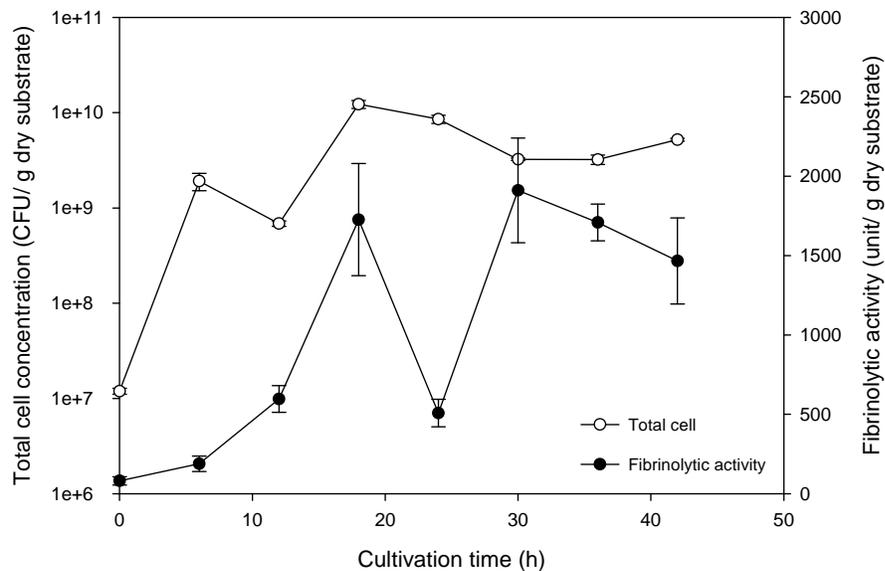
ตารางที่ 2-1 แสดงการคำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF) ในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร (Manual)

Calculation of Dimensionless Design Factor (DDF)		Experiment (Manual)	Calculated Value
$R_q$	rate of heat generation (J/h)	1,081,738	1,081,738
$F_a$	flow rate of dry air ( $m^3 h^{-1}$ )	4.1	12.8
$C_p$	thermal capacity of air (J/kg•K)	1,005	1,005
$T_B$	temperature of sub ( $^{\circ}C$ )	45.2	37
$T_{IN}$	entry temperature of air into reactor ( $^{\circ}C$ )	33.2	33.2
$T_{SURR}$	temperature of ambient air ( $^{\circ}C$ )	29	29
$C_{OUT}$	water content of air exiting reactor (kg $H_2O$ /kg dry air)	0.06588032	0.04383074
$C_{IN}$	water content of air entering reactor (kg $H_2O$ /kg dry air)	0.01978451	0.01978451
$h_A$	overall heat transfer coefficient from drum to surrounding air (J/kg•h)	35,357.625	35,357.625
$\lambda$	latent heat of vaporization of water (J/kg water)	2,431,300	2,431,300
<b>DDF</b>	<b>Dimensionless Design Factor (Must be approx. 1.00)</b>	<b>1.000</b>	<b>1.002</b>
hcon	convective heat transfer coefficient (J/m <sup>2</sup> K h)	18,000	18,000
D	Diameter of reactor (m)	0.5	0.5
L	Length of reactor (m)	1	1
r	Radias of reactor (m)	0.25	0.25
r	radias of air tube (m), stainless steel Ø 12 cm.	0.06	0.06

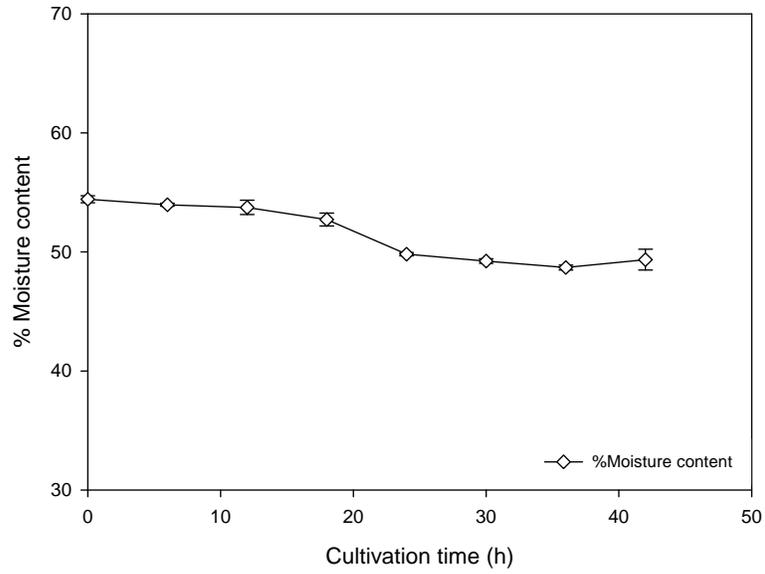
จากตารางที่ 2-1 สามารถคำนวณค่าอัตราการให้อากาศ (Flow rate of dry air) ที่เหมาะสม (DDF มีค่าประมาณ 1.002) ได้ค่าประมาณ 12.8  $m^3/h$  โดยที่ Rate of heat generation มีค่าเท่ากับ 1,081,738 J/h และกำหนดให้ Temperature of substrate มีค่าเท่ากับ 37  $^{\circ}C$  ทั้งนี้จะนำค่าอัตราการให้อากาศที่คำนวณได้จากการทดลองครั้งนี้ไปใช้ควบคุมอัตราการให้อากาศของการทดลองครั้งต่อไป

### 3.2 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ครั้งที่ 1

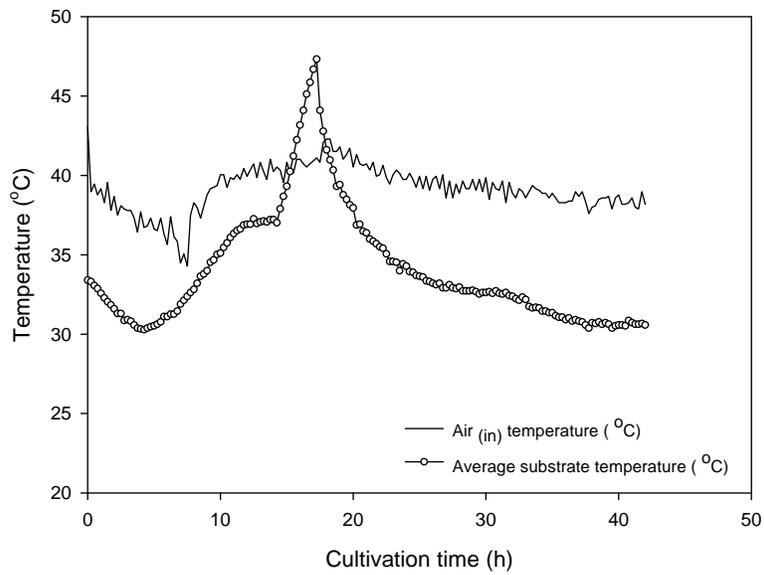
ทำการหมักโดยการนำตัวเหลืองมาปรับความชื้นด้วยน้ำประปาให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ใส่ตัวเหลืองบดลงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ปริมาตร 5 % (v/w) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คลุกหัวเชื้อให้ทั่วควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  ทำการหมักเป็นเวลา 42-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตและค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีการควบคุมอัตราการให้อากาศที่คงที่  $12.8 \text{ m}^3/\text{h}$  และอัตราการหมุนถังที่  $7.5 \text{ rpm}$  ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3-4 ถึง 3-6



รูปที่ 3-4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-6 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก

การหมักในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) พบว่าความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเท่ากับ  $1.19 \times 10^7$  CFU/ g dry substrate จนมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดที่ 18 ชั่วโมงเท่ากับ  $1.23 \times 10^{10}$  CFU/ g dry substrate แล้วลดลงเหลือเท่ากับ  $5.21 \times 10^9$  CFU/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-4) กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งเวลาการหมักที่ชั่วโมงที่ 18 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1,726 unit/ g dry substrate แล้วลดลงเหลือ 508 unit/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,911 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 30 ชั่วโมง แล้วลดลงเหลือ 1,466 unit/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 42 (ดังรูปที่ 3-4)

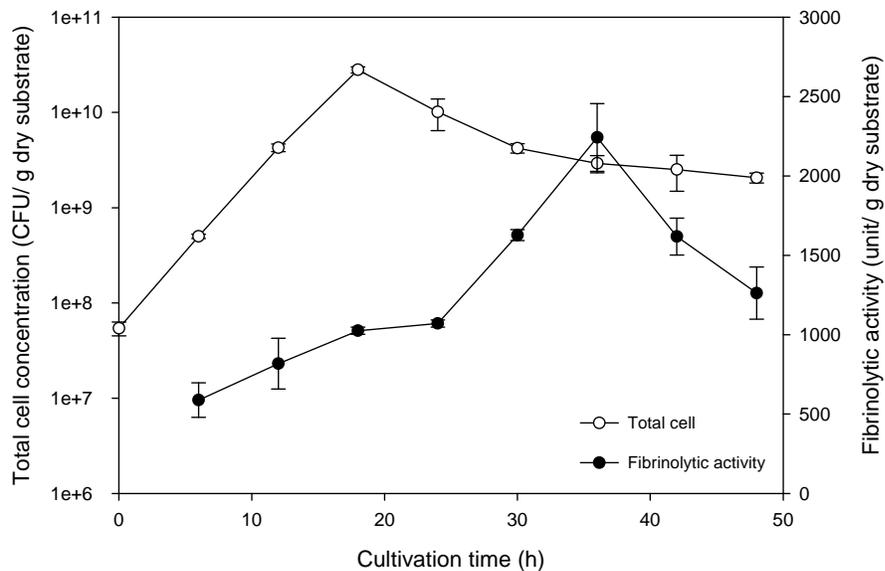
ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มลดลงโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นมีค่าความชื้นเท่ากับ 54.43 % และค่าความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 49.35 % ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-5)

จากการสังเกตทางกายภาพ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ ถ้วยเหลืองบดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแล้วมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % มีลักษณะร่วนไม่จับกันแน่น หลักจากการใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ลงไปแล้วจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความร่วนซุยลดลงและมีความเหนียวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

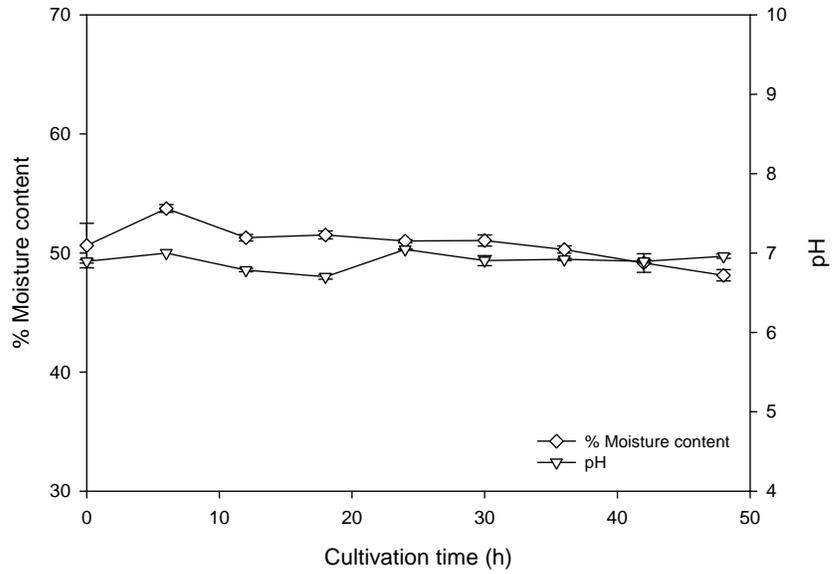
อุณหภูมิอากาศเข้าอยู่ในช่วง 34.3 – 43.1 °C โดยอุณหภูมิอากาศเข้าตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 39.2 °C ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 30.3 – 47.3 °C โดยอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ 34.1 °C และอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ 48.1 °C ที่เวลาการหมัก 17.25 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 3-6) ทั้งนี้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้นในช่วงระหว่างเวลาการหมัก 8-17.25 ชั่วโมง อาจเป็นผลมาจากการควบคุมการหมุนถังในอัตราที่ต่ำทำได้ไม่ดีพอจึงทำให้เกิดการสะสมของความร้อน ซึ่งความร้อนสะสมที่เกิดขึ้นในช่วงเวลานี้อาจมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ลดลงจากเดิมที่ชั่วโมงที่ 18 คือ 1,726 unit/ g dry substrate เหลือเท่ากับ 508 unit/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 24 ทั้งนี้ด้วยสาเหตุความร้อนมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพไปบางส่วนได้

### 3.3 การหมักในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) ครั้งที่ 2

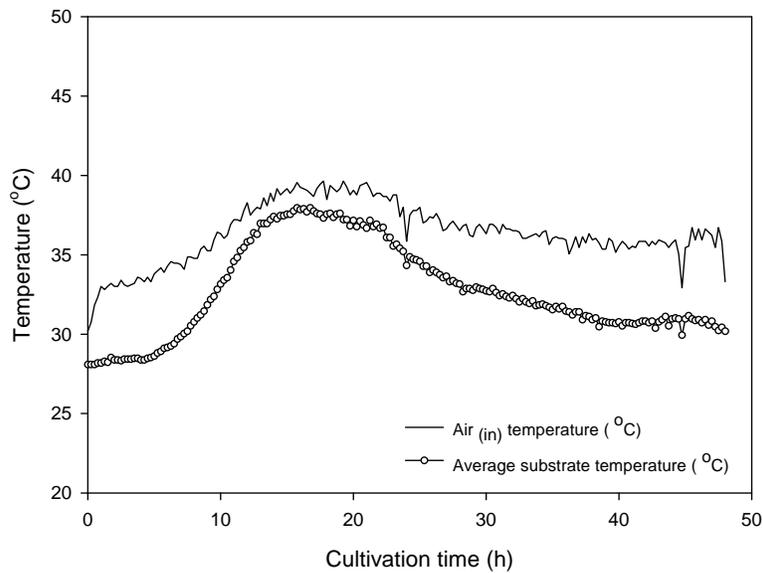
ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งด้วยสถานะเดียวกันกับครั้งที่ 1 ซึ่งทำการหมักโดยการนำถั่วเหลืองมาปรับความชื้นด้วยน้ำประปาให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % แล้วนำไปมาเชื้อด้วยไอน้ำ ใส่ถั่วเหลืองบดลงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L จากนั้นจึงใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ปริมาตร 5 % (v/w) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คลุกหัวเชื้อให้ทั่ว ควบคุมอุณหภูมิอากาศเข้าที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  ทำการหมักเป็นเวลา 42-48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic ความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH โดยมีการควบคุมอัตราการให้อากาศที่คงที่  $12.8 \text{ m}^3/\text{h}$  และอัตราการหมุนถังหมักที่  $7.5 \text{ rpm}$  ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3-7 ถึง 3-9



รูปที่ 3-7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH กับระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3-9 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ย กับระยะเวลาการหมัก

การหมักในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยการควบคุมอัตราการให้อากาศด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) พบว่าความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเท่ากับ  $5.41 \times 10^7$  CFU/ g dry substrate จนมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดที่ 18 ชั่วโมงเท่ากับ  $2.81 \times 10^{10}$  CFU/ g dry substrate แล้วลดลงเหลือเท่ากับ  $2.06 \times 10^9$  CFU/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-7) กิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2,243 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 36 ชั่วโมง แล้วลดลงเหลือ 1,262 unit/ g dry substrate ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-7)

ค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มลดลงโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น (ที่เวลาการหมักที่ 6 ชั่วโมง) มีค่าความชื้นเท่ากับ 53.74 % และค่าความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 48.13 % ที่ชั่วโมงที่ 48 (ดังรูปที่ 3-8)

จากการสังเกตทางกายภาพ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ คือ ถ้วยเหลืองบดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแล้วมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 % มีลักษณะร่วนไม่จับกันแน่น หลุดจากการใส่หัวเชื้อ *B. subtilis* K-C3 ลงไปแล้วจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความร่วนซุยลดลงและมีความเหนียวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

อุณหภูมิอากาศขาเข้าอยู่ในช่วง  $30.2 - 39.7$  °C โดยอุณหภูมิอากาศขาเข้าตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ  $36.4$  °C ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง  $28.1 - 37.9$  °C โดยอุณหภูมิเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองเฉลี่ยเท่ากับ  $32.7$  °C และอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ  $38.1$  °C ที่เวลาการหมัก 16.75 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 3-8)

จากผลการทดลองเปรียบเทียบกับแบบจำลอง DDF พบว่า อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ  $38.1$  °C ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Temperature of substrate) ที่กำหนดให้มีค่าเท่ากับ  $37$  °C ในการคำนวณโดยใช้สมการ DDF ถึงแม้ว่าอุณหภูมิอากาศขาเข้า (entry temperature of air into reactor,  $T_N$ ) จะมีค่าสูงขึ้นจากเดิมที่คำนวณไว้ คือ  $33.2$  °C เป็น  $36.4$  °C และสามารถคำนวณค่า Rate of heat generation มีค่าเท่ากับ 1,058,974 J/h การคำนวณโดยใช้สมการ DDF แสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 แสดงการคำนวณค่า Dimensionless Design Factors (DDF) ในถังหมักแบบหมุน 200 ลิตร (constant flow rate of dry air)

Calculation of Dimensionless Design Factor (DDF)		Calculated Value	Experiment (constant $F_a$ )
$R_q$	rate of heat generation (J/h)	1,081,738	1,058,974
$F_a$	flow rate of dry air ( $m^3 h^{-1}$ )	12.8	12.8
$C_p$	thermal capacity of air (J/kg•K)	1,005	1,005
$T_B$	temperature of sub ( $^{\circ}C$ )	37	38.1
$T_{IN}$	entry temperature of air into reactor ( $^{\circ}C$ )	33.2	36.4
$T_{SURR}$	temperature of ambient air ( $^{\circ}C$ )	29	29
$C_{OUT}$	water content of air exiting reactor (kg $H_2O$ /kg dry air)	0.04383074	0.04636167
$C_{IN}$	water content of air entering reactor (kg $H_2O$ /kg dry air)	0.01978451	0.02337529
$h_A$	overall heat transfer coefficient from drum to surrounding air (J/kg•h)	35,357.625	35,357.625
$\lambda$	latent heat of vaporization of water (J/kg water)	2,431,300	2,431,300
<b>DDF</b>	<b>Dimensionless Design Factor (Must be approx. 1.00)</b>	<b>1.002</b>	<b>1.000</b>
hcon	convective heat transfer coefficient (J/m <sup>2</sup> K h)	18,000	18,000
D	Diameter of reactor (m)	0.5	0.5
L	Length of reactor (m)	1	1
r	Radius of reactor (m)	0.25	0.25
r	radius of air tube (m), stainless steel Ø 12 cm.	0.06	0.06

เมื่อเปรียบเทียบผลของกิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic พบว่าการทดลองในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) และอัตราการหมุนถังกึ่งที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการทดลองในสภาวะควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual ประมาณ 900 unit/ g dry substrate ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดของการทดลองในสภาวะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF และสภาวะควบคุมอัตราการให้อากาศโดยวิธี Manual มีค่าเท่ากับ 2,243 unit/ g dry substrate และ 1,336 unit/ g dry substrate ตามลำดับ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF สามารถช่วยระบายความร้อนออกจากถังหมักได้ดีกว่าการควบคุมอัตราการให้อากาศโดยวิธี Manual ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามในแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ DDF ยังไม่ได้รวมตัวแปรที่มีผลต่อค่าความร้อน อาทิ เช่น

- 1.) คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Substrate): ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป เช่น ถั่วเหลืองบดที่มีความชื้นมากกว่า 20 % จะมีลักษณะเหนียวสามารถจับตัวกันเป็นก้อนได้ง่าย ทำให้ระบายความร้อนออกได้ช้าเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกากถั่วเหลืองและ/หรือรำข้าว
- 2.) การหมุนถัง: การหมุนถังที่อัตราเร็วสูงย่อมระบายความร้อนได้ดีกว่าการหมุนถังอัตราเร็วต่ำ แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่สามารถจับตัวกันเป็นก้อน โดนแน่น
- 3.) ลักษณะธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เพาะเลี้ยง: เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ Solid state fermentation ที่แตกต่างกันออกไป เช่น

- เชื้อรา *Beauveria bassiana* จะสามารถเจริญและสร้าง conidia ได้ดีในสภาวะนิ่ง (static condition) การหมุนถังจะทำให้เส้นใยแตกและสร้าง conidia ได้ลดลง แต่การไม่หมุนถังหมักจะทำให้ความร้อนสะสมเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจทำให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 55 °C ในระยะเวลาอันสั้นและส่งผลให้อัตราการงอก conidia ลดลงประมาณ 80 %

- เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์ Amylase และ Protease ได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะร่วน/ฟูร่วน โดยอัตราเร็วของการหมุนถังไม่มีผลมากนักต่อการเจริญของเชื้อ

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 4.1 สรุปผลการทดลอง

1.) การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* K C-3 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L โดยใช้ถั่วเหลืองบดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 51.38 % และเติมหัวเชื้อ 5 % (v/w) หมุนถังด้วยอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอัตราการให้อากาศที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  และ  $4.1 \text{ m}^3/\text{h}$  ตามลำดับ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic สูงสุดเท่ากับ 1,336 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 42 ชั่วโมง อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ  $45.2^{\circ}\text{C}$  ที่เวลาการหมัก 6.75 ชั่วโมง และค่า Rate of heat generation เท่ากับ 1,081,738 J/h

2.) การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* K C-3 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L โดยใช้ถั่วเหลืองบดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 50.63 % และเติมหัวเชื้อ 5 % (v/w) หมุนถังด้วยอัตราการหมุนถังคงที่ที่ 7.5 rph ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอัตราการให้อากาศที่  $37 \pm 4^{\circ}\text{C}$  และ  $12.8 \text{ m}^3/\text{h}$  ตามลำดับ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic สูงสุดเท่ากับ 2,243 unit/ g dry substrate ที่เวลาการหมัก 36 ชั่วโมง อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (temperature heat peak) เท่ากับ  $38.1^{\circ}\text{C}$  ที่เวลาการหมัก 16.75 ชั่วโมง และค่า Rate of heat generation เท่ากับ 1,058,974 J/h

3.) ในสถานะที่มีการควบคุมอัตราการให้อากาศโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Dimensionless Design Factors (DDF) และอัตราการหมุนถังคงที่ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำการทดลองในสถานะควบคุมอัตราการให้อากาศคงที่และอัตราการหมุนถังตามความเหมาะสมด้วยวิธี Manual ประมาณ 900 unit/ g dry substrate

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

- 1.) ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวแปรที่มีผลต่อค่าความร้อน เช่น คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตราการหมุนถังและลักษณะธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์
- 2.) ควรขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ในถังหมักแบบหมุนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

Anson, M. L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cethepsin with haemoglobin. *J Gen Physiol.*, 22, 79-89.

Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Venkatesh Babu, S., Senthilkumar, S.R., Sangiliyandi, G., 2008. Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99, 8170-8174.

Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., Nishimuro, S., 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197, 1340–1347.

Fujita, M., Ito, Y., Hong, K., Nishimuro, S., 1995a. Characterization of nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis* 9, 157–164. Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K., Nishimuro, S., 1995b. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 18, 1194–1196.

Global burden of Disease; *The Lancet* :1996

Hardin, M.T., Mitchell, D.A., Howes, T., 2000. Approach to Designing Rotating Drum Bioreactors for Solid-State Fermentation on the Basis of Dimensionless Design Factors, *Biotechnology and Bioengineering*, 67, 274-282.

Liu, J., Xing, J., Chang, T., Maa, Z., Liu, H., 2005. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process Biochemistry*, 40, 2757–2762.

Mitchell, D.A. and B.K. Lonsane, 1992. Definition, Characteristics and Potential. In: *Solid Substrate Cultivation*, Doelle, H.W., D.A Mitchell and C.E. Rolz, (Eds.). Elsevier science publishers Ltd., England, ISBN: 1-85166-879-9, pp: 1-28.

Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R.H., Zhang, Y.Z., 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 45-52.

Peng, Y., Yang, X.J., Xiao, L., Zhang, Y.Z., 2004. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 155, 167-173.

Peng, Y., Zhang, Y.Z., 2002. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme-producing strain DC-4 from Chinese douchi and primary analysis of the enzyme property, *High Technol. Lett.*, 12, 30–33.

Suzuki, Y., Kondo, K., Matsumoto, Y., Zhao, B.Q., Otsuguro, K., Maeda, T., Tsukamoto, Y., Urano, T., Umemura, K., 2003a. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sciences*, 73, 1289-1298.

Suzuki, Y., Kondo, K., Ichise, H., Tsukamoto, Y., Urano, T., Umemura, K., 2003b. Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening. *Nutrition*, 19, 261-264.

[www.thaiheartclinic.com](http://www.thaiheartclinic.com) เมื่อวันที่ 4 กันยายน 2551

Zheng, Z.L., Zuo, Z.Y., Liu, Z.G., Tsai, K.C., Liu, A.F., Zou, G.L., 2005. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto*: A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, 373-380.

## ภาคผนวก

**1. การเตรียมสารเคมี****1.1) สารละลาย Fibrinogen (0.6%(w/v) Fibrinogen ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0)**

ชั่ง fibrinogen จำนวน 0.6 g ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 กวนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วย 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ใน volumetric flask เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C

**1.2) สารละลาย Thrombin (200 NIH U thrombin ใน 0.85%(w/v) NaCl ปริมาตร 0.2 mL และ 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 3.8 mL)**

นำ 1,000 NIH U thrombin (9.43 mg solid, 106 NIH unit/ mg solid) มาละลายใน 0.85%(w/v) NaCl ปริมาตร 1 mL และเติม 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 19 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C

**1.3) 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0**

สารละลาย A : เตรียม 0.2 M Monobasic sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; M=156.01) โดยละลาย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 7.80 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 mL ใน volumetric flask

สารละลาย B : เตรียม 0.2 M Dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; M=177.99) โดยละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 17.80 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 mL ใน volumetric flask

นำสารละลาย A ปริมาตร 195 mL ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 305 mL กวนให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

**1.4) 0.02 M Sodium phosphate buffer pH 7.2**

สารละลาย A : เตรียม 0.04 M Monobasic sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; M=156.01) โดยละลาย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 1.56 g ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 mL ใน volumetric flask

สารละลาย B : เตรียม 0.04 M Dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ;  $M=177.99$ ) โดยเปิดสารละลาย 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 100 mL มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 500 mL ใน volumetric flask

นำสารละลาย A ปริมาตร 140 mL ผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 360 mL กวนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 1.5) 0.85% (w/v) NaCl

ชั่ง NaCl จำนวน 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 mL ใน volumetric flask

#### 1.6) 10% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA)

ชั่ง TCA จำนวน 10 g ละลายในน้ำกลั่น กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 mL ใน volumetric flask

#### 1.7) Reagent A

##### Reagent A1 : 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ใน 0.1 N NaOH

เตรียม 0.1 N NaOH ( $M=40$ ) โดยละลาย NaOH จำนวน 4 g ในน้ำกลั่น กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL ใน volumetric flask

ชั่ง  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  จำนวน 20 g ละลายใน 0.1 N NaOH กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL ด้วย 0.1 N NaOH ใน volumetric flask

##### Reagent A2 : 0.5% (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน 1% (w/v) Sodium citrate

เตรียม 1% (w/v) sodium citrate โดยละลาย sodium citrate จำนวน 1 g ในน้ำกลั่น กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL ใน volumetric flask

ชั่ง  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 0.5 g ละลายใน 1% (w/v) sodium citrate กวจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วย 1% (w/v) sodium citrate ใน volumetric flask

เตรียม reagent A โดยนำ reagent A1 ปริมาตร 50 mL ผสมกับ reagent A2 ปริมาตร 1 mL โดยเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน

#### 1.8) Folin reagent

ผสม Folin-Ciocalte's phenol reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน

### 1.9) สารละลายมาตรฐาน 1 mM Tyrosine

ชั่ง Tyrosine ( $M=181.19$ ) จำนวน 0.0181 g ละลายในน้ำกลั่นและเติม 1 N HCl เล็กน้อย พร้อมทั้งกวนจน Tyrosine ละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 mL ใน volumetric flask เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

**2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟบริโนไลติก (Fibrinolytic activity assay)** (ดัดแปลงจาก Anson, 1938)

#### อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. Autopipette
3. เครื่องผสมสารละลาย (vortex)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. เครื่อง Spectrophotometer
6. ฟลasks ปริมาตร (volumetric flask)
7. เครื่อง Centrifuge

#### สารเคมี

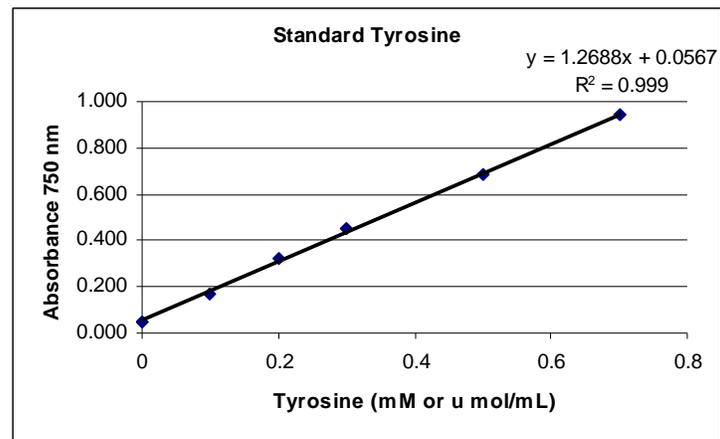
- 1) สารละลาย Fibrinogen (0.6%(w/v) Fibrinogen ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0)
- 2) สารละลาย Thrombin (200 NIH U thrombin ใน 0.85%(w/v) NaCl ปริมาตร 0.2 mL และ 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 3.8 mL)
- 3) 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0
- 4) 0.02 M Sodium phosphate buffer pH 7.2
- 5) 0.85% (w/v) NaCl
- 6) 10% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA)
- 7) Reagent A
- 8) Reagent B
- 9) สารละลายมาตรฐาน 1 mM Tyrosine

### วิธีวิเคราะห์

- 1) เติมสารละลาย fibrinogen ปริมาตร 125  $\mu$ L ลงในหลอดทดลอง
- 2) เติมสารละลาย thrombin ปริมาตร 5  $\mu$ L แล้วผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 3) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จนเกิดเป็น fibrin clot
- 4) เติม 0.20 M Sodium phosphate buffer pH 7.2 ปริมาตร 95  $\mu$ L
- 5) เติมสารละลายเอ็นไซม์ที่สกัดได้ (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) ปริมาตร 25  $\mu$ L ผสมให้เข้ากัน
- 6) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที
- 7) เติม 10% TCA ปริมาตร 250  $\mu$ L ผสมให้เข้ากัน
- 8) นำไปแช่เย็นทันที เป็นเวลา 10 นาที
- 9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 10) ปิเปตส่วนใสปริมาตร 100  $\mu$ L ใส่ลงในหลอดทดลอง
- 11) เติม reagent A ปริมาตร 1,000  $\mu$ L แล้วผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 12) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 13) เติม reagent B ปริมาตร 100  $\mu$ L ผสมให้เข้ากันทันที
- 14) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 15) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรด tyrosine จากกราฟมาตรฐาน
- 16) ทำกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโน tyrosine โดยเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้น 1 mM และทำการเตรียมดังแสดงในตารางแสดงความเข้มข้นของ tyrosine จากนั้นทำตามข้อ 10-15 คำนวณหาค่า slop ของกราฟมาตรฐาน
- 17) หลอด blank ให้ใช้น้ำกลั่นในการ set zero
- 18) หลอดควบคุม (ใช้เอ็นไซม์ตัวอย่างเดียวกัน) ให้ทำตามข้อ 1-3, 7, 4-6 และ 8-15 ตามลำดับ
- 19) คำนวณค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไฟบริโนไลติก

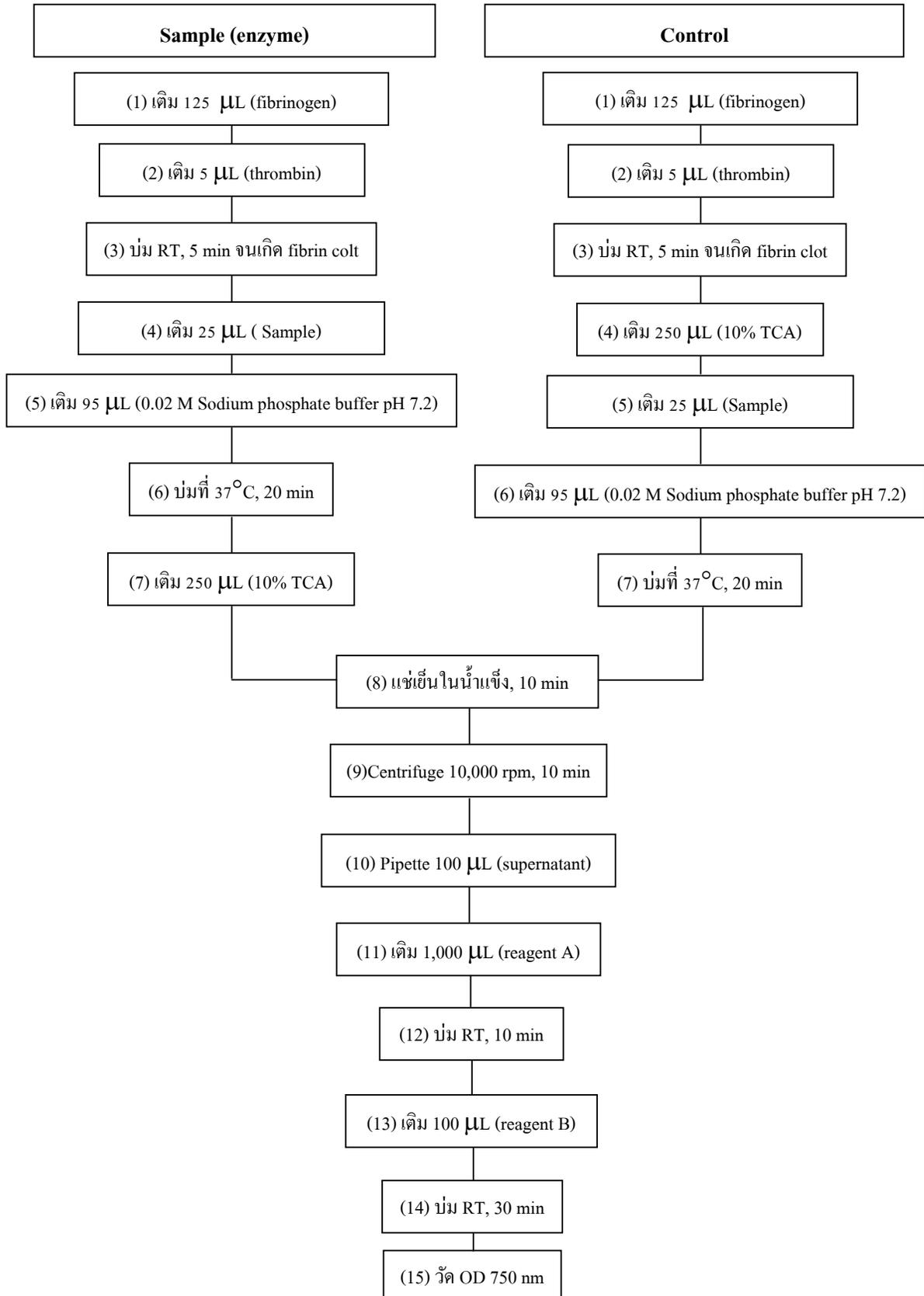
ตารางแสดงความเข้มข้นของ Tyrosine

ความเข้มข้น tyrosine (mM)	ปริมาตร tyrosine (1 mM) ( $\mu$ L)	ปริมาตรน้ำกลั่น ( $\mu$ L)
0	0	100
0.1	10	90
0.2	20	80
0.3	30	70
0.5	50	50
0.7	70	30
1	100	0



ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Tyrosine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm

### Fibrinolytic activity assay



**Standard Tyrosine**

(1) Pipette 100  $\mu\text{L}$  (Std. Tyrosine)

(2) តែង 1,000  $\mu\text{L}$  (reagent A)

(3) រំពឹង RT, 10 min

(4) តែង 100  $\mu\text{L}$  (reagent B)

(5) រំពឹង RT, 30 min

(6) វាស់ OD 750 nm

### การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Fibrinolytic

#### คำนิยามของ Fibrinolytic activity

1 unit ของ Fibrinolytic activity คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อย substrate คือ fibrin clot ให้เป็นกรดอะมิโน tyrosine ได้ 1 n mol ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

$$\text{Unit/mL} = \left( \frac{\Delta OD - \text{intercept}}{\text{slope}} \right) \times 0.5 \times 40 \times \left( \frac{1}{20} \right) \times 1000 \times \frac{1}{df}$$

เมื่อ

$\Delta OD$	=	ค่าผลต่างของ Absorbance ของหลอดตั้งอย่างกับหลอดควบคุม
Intercept	=	ค่า intercept ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Tyrosine (u mol/mL) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm
Slope	=	ค่า slope ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Tyrosine (u mol/mL) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm
0.5	=	ปริมาตรของสารทั้งหมดที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์, (mL) (25+5+25+95+250) $\mu\text{L}$ = 500 $\mu\text{L}$ = 0.5 mL
40	=	1000/25, (1/mL) โดยค่า 1000 คือ factor ที่ใช้เปลี่ยนหน่วย (1 mL = 1000 uL) และค่า 25 คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้, (uL)
20	=	เวลา, (min)
1000	=	factor ที่ใช้ในการเปลี่ยนหน่วยจาก u mol/mL เป็น n mol/mL
df	=	dilution factor

$$\text{Unit/g wet substrate} = (\text{Unit/mL}) \times (10/\text{wet sample})$$

เมื่อ

10	=	ปริมาตร buffer ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์, (mL)
wet sample	=	ปริมาณตัวอย่างเปียกที่ใช้, (g)

$$\text{Unit/g dry substrate} = (\text{Unit/g wet sample}) \times 100 / (100 - \% \text{MC})$$

เมื่อ

% MC	=	% ค่าความชื้น
------	---	---------------

### 3. การสกัดเอนไซม์

1. ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 2.00 g ใส่ลงในหลอด centrifuge
2. เติม 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ลงไป 10 mL
3. ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร(vortex)นาน 2 นาที
4. นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 °C
5. เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C เพื่อรักษาสภาพเอนไซม์ไว้ก่อนจะวิเคราะห์

### 4. การหาค่า % Moisture Content

1. ชั่งน้ำหนักกระทง บนเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างใส่กระทงประมาณ 2.0000 g
3. อบที่อุณหภูมิ 80 °C จนตัวอย่างแห้ง
4. นำกระทงและตัวอย่างที่อบแล้วทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator
5. ชั่งน้ำหนักกระทงและตัวอย่างหลังอบ
6. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นตามสูตร

$$\% \text{ Moisture content (\%MC)} = \frac{(\text{น.น. ตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น.น. ตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น.น. ตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

### 5. การวัดค่า pH

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 g จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 50 mL
2. ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร(vortex) นาน 2 นาที
3. ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนประมาณ 30 นาที
4. นำไปวัดค่า pH โดยจุ่มในส่วนใส บันทึกผล

### 6. การหาค่าความเข้มข้นเซลล์มีชีวิต (Viable cell count)

1. ชั่งตัวอย่าง 1 g ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 mL
2. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
3. ทำ ten fold dilution จนถึง  $10^{-7}$
4. นำ dilution ที่เหมาะสม มา spread plate ลงใน NA plate โดยใช้ตัวอย่าง 0.1 mL
5. นำ spreader ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มา spread บน NA plate จนแห้ง
6. นำ plate ไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. นับจำนวน colony ที่ได้ (อยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคลโลนี) แล้วแทนในสูตร

$$\text{CFU/g dry substrate} = \text{จำนวนโคลโลนี} \times (1/0.1) \times (1/\text{dilution factor}) \times 100 \times (1/(100-\%MC))$$

## 7. ข้อมูลการทดลอง

รูปที่ 3-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	Viable cell count	Fibrinolytic activity
	(CFU/ g wet substrate)	(units/ g dry substrate)
0	3.16E+08	-
6	2.84E+09	402
12	3.18E+09	1,036
18	1.80E+11	678
24	1.40E+11	761
30	9.51E+09	1,188
36	2.46E+09	748
42	2.37E+09	1,336
48	1.57E+09	339

รูปที่ 3-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	%Moisture
0	51.38
6	55.53
12	53.93
18	54.07
24	54.38
30	53.73
36	53.90
42	53.67
48	53.41

รูปที่ 3-3 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก

Time (h)	Air temp in ( °C)	Average Sub Tepm ( °C)
0	34.7	30.9
0.25	32.2	31.1
0.5	32.4	31.2
0.75	32.3	31.3
1	32.2	31.5
1.25	32.0	31.8
1.5	31.7	32.1
1.75	31.6	32.3
2	31.5	32.5
2.25	31.5	32.8
2.5	31.5	33.2
2.75	31.4	33.5
3	31.8	34.1
3.25	31.9	34.7
3.5	32.2	35.3
3.75	32.5	35.8
4	32.7	36.5
4.25	33.1	37.2
4.5	33.6	37.9
4.75	34.1	38.7
5	34.7	39.5
5.25	35.2	40.2
5.5	35.6	41.1
5.75	36.1	41.8
6	37.0	42.5
6.25	37.0	43.2
6.5	37.4	43.9

6.75	39.6	43.5
7	41.6	42.7
7.25	41.6	42.6
7.5	41.0	42.3
7.75	41.0	41.6
8	40.8	41.3
8.25	40.3	40.9
8.5	40.2	40.7
8.75	39.6	40.1
9	39.4	39.6
9.25	39.3	39.0
9.5	39.0	38.6
9.75	38.7	38.5
10	38.5	38.2
10.25	37.3	37.8
10.5	37.7	37.1
10.75	37.0	36.5
11	37.0	36.3
11.25	36.4	35.6
11.5	36.2	35.3
11.75	35.0	35.2
12	34.9	34.4
12.25	35.0	34.5
12.5	35.3	34.5
12.75	34.4	34.0
13	34.7	33.9
13.25	33.9	33.6
13.5	34.3	33.4
13.75	33.9	32.9
14	33.9	32.5
14.25	31.5	31.3

14.5	32.2	32.3
14.75	32.1	32.6
15	32.1	32.9
15.25	32.2	33.1
15.5	32.2	33.2
15.75	32.3	33.3
16	32.3	33.5
16.25	32.4	33.8
16.5	32.4	33.6
16.75	32.5	33.7
17	32.4	33.9
17.25	32.4	34.0
17.5	32.4	34.1
17.75	32.7	34.2
18	32.7	34.4
18.25	32.8	34.4
18.5	32.8	34.5
18.75	32.9	34.6
19	33.0	34.7
19.25	33.7	34.2
19.5	33.9	33.8
19.75	33.8	33.9
20	33.0	33.8
20.25	33.6	33.7
20.5	33.7	34.0
20.75	34.2	34.0
21	33.3	33.9
21.25	33.9	33.8
21.5	33.8	33.7
21.75	33.7	33.8
22	33.6	33.7

22.25	33.6	33.6
22.5	33.4	33.2
22.75	33.4	33.5
23	33.0	33.4
23.25	33.1	33.3
23.5	32.9	33.3
23.75	33.8	34.2
24	33.8	34.4
24.25	33.5	34.3
24.5	33.5	34.3
24.75	33.5	34.3
25	34.2	33.7
25.25	34.3	33.6
25.5	34.3	33.4
25.75	34.0	33.2
26	34.0	32.9
26.25	33.9	33.5
26.5	33.8	32.7
26.75	33.7	32.4
27	33.4	32.3
27.25	33.4	32.2
27.5	33.3	31.9
27.75	33.2	31.9
28	33.1	32.1
28.25	33.1	31.8
28.5	32.8	31.5
28.75	32.9	31.4
29	32.7	31.4
29.25	33.1	31.3
29.5	32.7	31.3
29.75	32.5	30.8

30	32.3	31.3
30.25	32.3	31.0
30.5	31.9	30.9
30.75	32.1	30.7
31	32.1	30.8
31.25	31.9	30.7
31.5	32.0	30.5
31.75	31.8	30.4
32	31.7	30.4
32.25	31.4	30.2
32.5	30.7	29.7
32.75	31.3	29.8
33	31.2	29.6
33.25	31.2	29.7
33.5	31.0	29.7
33.75	31.0	29.6
34	31.0	29.6
34.25	30.9	29.5
34.5	30.7	29.5
34.75	30.7	29.5
35	30.7	29.3
35.25	30.7	29.3
35.5	30.6	29.3
35.75	30.7	29.4
36	30.6	29.1
36.25	30.6	29.6
36.5	30.6	29.5
36.75	30.5	29.4
37	30.4	29.4
37.25	30.4	29.4
37.5	30.4	29.3

37.75	30.3	29.1
38	30.5	29.4
38.25	30.5	29.3
38.5	30.6	29.5
38.75	30.4	29.3
39	30.6	29.4
39.25	30.6	29.4
39.5	30.6	29.5
39.75	30.7	29.5
40	30.8	29.2
40.25	30.8	29.6
40.5	31.0	29.6
40.75	31.3	29.7
41	31.2	29.7
41.25	31.3	29.6
41.5	31.4	29.8
41.75	31.6	29.7
42	31.4	29.8
42.25	31.4	29.8
42.5	31.4	29.8
42.75	31.5	29.8
43	31.8	29.9
43.25	31.5	29.9
43.5	31.6	29.9
43.75	31.5	30.0
44	31.8	30.0
44.25	31.4	30.0
44.5	31.4	30.1
44.75	31.5	30.3
45	31.7	30.1
45.25	31.9	30.2

45.5	31.4	30.2
45.75	31.8	30.1
46	32.7	30.3
46.25	31.8	30.2
46.5	31.8	30.0
46.75	30.9	29.3
47	40.7	42.2
<b>Average=</b>	<b>33.2</b>	<b>33.1</b>
<b>Max=</b>	<b>41.6</b>	<b>43.9</b>
<b>Min=</b>	<b>30.3</b>	<b>29.1</b>

รูปที่ 3-4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	Viable cell count	Fibrinolytic activity
	(CFU/ g wet substrate)	(units/ g dry substrate)
0	1.19E+07	81
6	1.91E+09	188
12	6.85E+08	597
18	1.23E+10	1,726
24	8.57E+09	508
30	3.24E+09	1,911
36	3.22E+09	1,709
42	5.21E+09	1,466

รูปที่ 3-5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	%Moisture
0	54.43
6	53.96
12	53.74
18	52.72
24	49.81
30	49.23
36	48.69
42	49.35

รูปที่ 3-6 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก

Time (h)	Air temp in ( °C)	Average Sub Tepm ( °C)
0	43.1	33.4
0.25	39.0	33.3
0.5	39.5	33.1
0.75	38.8	32.9
1	39.2	32.6
1.25	38.3	32.3
1.5	39.6	32.0
1.75	37.8	31.8
2	38.7	31.6
2.25	37.5	31.3
2.5	38.1	31.3
2.75	37.9	30.9
3	37.8	30.9
3.25	37.8	30.8
3.5	37.3	30.6
3.75	36.4	30.4
4	37.7	30.3
4.25	36.7	30.3
4.5	36.8	30.4
4.75	37.3	30.5
5	36.6	30.5
5.25	36.5	30.6
5.5	37.3	30.8
5.75	36.3	31.1
6	35.6	31.1
6.25	37.4	31.3
6.5	36.1	31.3

6.75	35.8	31.4
7	34.5	31.9
7.25	35.1	32.1
7.5	34.3	32.4
7.75	37.5	32.6
8	38.3	32.8
8.25	38.0	33.2
8.5	37.3	33.6
8.75	38.1	33.8
9	38.8	34.0
9.25	39.2	34.5
9.5	39.3	34.7
9.75	39.4	35.0
10	40.0	35.1
10.25	40.0	35.5
10.5	39.3	35.7
10.75	39.8	36.1
11	39.8	36.3
11.25	40.0	36.5
11.5	39.8	36.6
11.75	40.4	36.9
12	39.9	36.9
12.25	40.3	36.9
12.5	40.7	37.3
12.75	39.8	37.0
13	40.8	37.1
13.25	40.2	37.1
13.5	39.8	37.1
13.75	41.0	37.2
14	40.2	37.2
14.25	40.5	37.0

14.5	40.3	37.9
14.75	39.6	38.7
15	40.8	39.3
15.25	40.1	40.2
15.5	40.1	41.2
15.75	41.0	42.2
16	41.0	43.2
16.25	40.7	44.1
16.5	40.5	45.1
16.75	40.7	45.9
17	40.9	46.7
17.25	41.1	47.3
17.5	40.8	44.1
17.75	42.1	42.8
18	42.3	41.6
18.25	42.3	41.0
18.5	41.5	40.3
18.75	41.5	39.3
19	41.8	39.4
19.25	41.0	38.8
19.5	41.3	38.5
19.75	41.7	38.1
20	40.5	37.9
20.25	41.3	36.9
20.5	40.7	36.9
20.75	40.6	36.5
21	40.7	36.4
21.25	40.3	36.0
21.5	40.8	35.8
21.75	39.9	35.7
22	40.0	35.5

22.25	40.6	35.4
22.5	39.8	35.1
22.75	39.5	34.6
23	40.0	34.6
23.25	40.3	34.5
23.5	40.1	34.0
23.75	39.8	34.4
24	39.8	34.3
24.25	40.1	33.9
24.5	39.8	33.9
24.75	39.3	33.7
25	39.9	33.6
25.25	39.2	33.6
25.5	39.9	33.4
25.75	39.1	33.3
26	39.8	33.2
26.25	39.9	33.1
26.5	39.2	33.2
26.75	40.0	32.9
27	38.6	32.9
27.25	39.7	33.1
27.5	38.6	32.9
27.75	39.5	32.9
28	38.9	33.0
28.25	39.7	32.7
28.5	39.2	32.7
28.75	39.2	32.7
29	39.8	32.8
29.25	39.1	32.7
29.5	39.8	32.5
29.75	39.0	32.6

30	39.8	32.6
30.25	38.5	32.7
30.5	39.6	32.6
30.75	39.2	32.7
31	39.1	32.6
31.25	39.7	32.5
31.5	38.3	32.6
31.75	39.6	32.4
32	38.9	32.4
32.25	38.6	32.2
32.5	39.2	32.1
32.75	39.0	32.3
33	38.6	32.2
33.25	39.0	31.7
33.5	39.4	31.6
33.75	39.2	31.7
34	39.1	31.6
34.25	38.9	31.4
34.5	38.9	31.4
34.75	38.6	31.4
35	38.9	31.4
35.25	38.6	31.2
35.5	38.3	31.1
35.75	38.3	31.1
36	38.3	30.9
36.25	38.4	31.0
36.5	38.4	30.8
36.75	39.0	30.9
37	38.7	30.8
37.25	39.0	30.8
37.5	38.4	30.6

37.75	37.6	30.4
38	38.0	30.7
38.25	38.1	30.7
38.5	38.5	30.8
38.75	38.6	30.6
39	38.6	30.7
39.25	38.7	30.6
39.5	37.9	30.4
39.75	38.6	30.5
40	38.8	30.6
40.25	38.2	30.6
40.5	38.2	30.5
40.75	38.3	30.9
41	38.6	30.7
41.25	38.0	30.6
41.5	37.9	30.6
41.75	39.0	30.7
42	38.2	30.6
Average=	39.2	34.1
Max=	43.1	47.3
Min=	34.3	30.3

รูปที่ 3-7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเซลล์มีชีวิตของ *B. subtilis* K-C3 และกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	Viable cell count	Fibrinolytic activity
	(CFU/ g wet substrate)	(units/ g dry substrate)
0	5.41E+07	-
6	5.00E+08	588
12	4.26E+09	817
18	2.81E+10	1,025
24	1.01E+10	1,070
30	4.22E+09	1,627
36	2.92E+09	2,243
42	2.52E+09	1,618
48	2.06E+09	1,262

รูปที่ 3-8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH กับระยะเวลาการหมัก

Cultivation (h)	%Moisture	pH
0	50.63	6.90
6	53.74	7.00
12	51.28	6.79
18	51.52	6.70
24	51.00	7.05
30	51.06	6.91
36	50.30	6.92
42	49.16	6.90
48	48.13	6.96

รูปที่ 3-9 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิอากาศขาเข้าและอุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยกับระยะเวลาการหมัก

Time (h)	Air temp in ( °C)	Average Sub Tepm ( °C)
0	30.2	28.1
0.25	30.8	28.1
0.5	31.8	28.1
0.75	32.3	28.2
1	33.0	28.2
1.25	32.8	28.3
1.5	33.0	28.2
1.75	33.2	28.5
2	33.0	28.4
2.25	33.0	28.4
2.5	33.4	28.3
2.75	33.1	28.4
3	33.0	28.4
3.25	33.1	28.4
3.5	33.2	28.5
3.75	33.6	28.5
4	33.5	28.4
4.25	33.3	28.4
4.5	33.6	28.5
4.75	33.3	28.5
5	33.8	28.6
5.25	34.0	28.8
5.5	34.2	28.9
5.75	33.9	29.1
6	34.3	29.2
6.25	34.6	29.3
6.5	34.5	29.4

6.75	34.5	29.7
7	34.4	29.8
7.25	34.1	30.0
7.5	34.9	30.2
7.75	34.9	30.5
8	34.8	30.8
8.25	34.8	31.0
8.5	35.4	31.2
8.75	35.6	31.4
9	35.3	31.8
9.25	35.3	32.2
9.5	35.9	32.4
9.75	36.4	32.8
10	36.3	33.2
10.25	36.0	33.4
10.5	36.2	33.5
10.75	36.9	34.0
11	37.2	34.6
11.25	37.2	34.8
11.5	37.1	35.3
11.75	37.8	35.5
12	38.3	35.8
12.25	37.5	35.9
12.5	37.8	36.4
12.75	38.0	36.3
13	37.9	37.0
13.25	38.6	37.0
13.5	38.1	37.0
13.75	38.9	37.2
14	38.4	37.4
14.25	39.2	37.3

14.5	38.8	37.5
14.75	39.0	37.5
15	39.2	37.6
15.25	38.9	37.6
15.5	39.2	37.7
15.75	39.6	37.9
16	39.3	37.8
16.25	39.2	37.9
16.5	39.1	37.7
16.75	38.9	37.9
17	38.7	37.7
17.25	39.2	37.6
17.5	39.5	37.6
17.75	39.7	37.3
18	38.5	37.6
18.25	39.4	37.6
18.5	39.2	37.4
18.75	39.0	37.6
19	39.2	37.6
19.25	39.7	37.2
19.5	39.3	37.2
19.75	38.8	36.8
20	39.1	37.2
20.25	38.8	36.8
20.5	39.4	37.1
20.75	39.5	36.9
21	39.6	36.7
21.25	39.2	37.2
21.5	38.7	36.8
21.75	38.9	36.9
22	38.9	36.7

22.25	38.7	36.7
22.5	38.7	36.1
22.75	38.4	36.1
23	38.8	35.6
23.25	38.8	35.6
23.5	37.4	35.4
23.75	38.0	35.2
24	35.8	34.3
24.25	37.5	34.9
24.5	37.8	34.7
24.75	37.8	34.7
25	38.0	34.6
25.25	37.0	34.3
25.5	37.1	34.3
25.75	37.4	33.9
26	37.3	34.0
26.25	37.6	33.9
26.5	37.2	33.7
26.75	36.5	33.5
27	36.6	33.6
27.25	36.9	33.3
27.5	37.1	33.4
27.75	36.8	33.2
28	36.5	33.2
28.25	36.8	32.7
28.5	36.9	32.9
28.75	36.2	32.9
29	36.1	32.8
29.25	36.7	33.0
29.5	36.9	32.9
29.75	36.6	32.8

30	36.3	32.7
30.25	36.9	32.7
30.5	36.9	32.9
30.75	36.7	32.6
31	36.3	32.4
31.25	36.9	32.5
31.5	36.6	32.4
31.75	36.6	32.3
32	36.5	32.4
32.25	36.5	32.2
32.5	36.4	32.0
32.75	36.0	32.2
33	36.0	32.0
33.25	36.1	31.9
33.5	36.2	32.1
33.75	36.3	31.8
34	36.1	31.8
34.25	36.4	31.9
34.5	36.5	31.8
34.75	35.6	31.7
35	36.0	31.5
35.25	36.1	31.7
35.5	36.0	31.6
35.75	36.0	31.7
36	35.9	31.4
36.25	35.1	31.4
36.5	35.6	31.2
36.75	36.1	31.4
37	35.5	31.4
37.25	36.1	30.9
37.5	35.7	31.2

37.75	36.3	31.1
38	35.9	30.9
38.25	36.0	31.0
38.5	35.7	30.5
38.75	35.4	30.8
39	35.4	30.8
39.25	36.0	30.7
39.5	35.8	30.7
39.75	35.2	30.7
40	35.6	30.8
40.25	35.8	30.5
40.5	35.6	30.7
40.75	35.4	30.7
41	35.6	30.7
41.25	35.5	30.6
41.5	35.8	30.7
41.75	35.8	30.8
42	35.8	30.8
42.25	35.6	30.7
42.5	35.8	30.8
42.75	35.6	30.4
43	35.9	30.8
43.25	35.8	30.9
43.5	35.7	31.1
43.75	35.5	30.5
44	35.7	31.0
44.25	35.9	31.0
44.5	35.1	31.0
44.75	32.9	29.9
45	35.5	31.0
45.25	35.6	31.2

45.5	36.7	31.0
45.75	35.9	30.9
46	36.6	30.9
46.25	35.9	30.7
46.5	36.6	30.9
46.75	36.4	30.6
47	36.2	30.8
47.25	35.5	30.5
47.5	36.7	30.2
47.75	35.8	30.4
47.5	36.7	30.2
47.75	35.8	30.4
48	33.3	30.2
<b>Average=</b>	<b>36.4</b>	<b>32.7</b>
<b>Max=</b>	<b>39.7</b>	<b>37.9</b>
<b>Min=</b>	<b>30.2</b>	<b>28.1</b>