

1. บทนำ

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง หมายถึง กระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ให้เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งขึ้น โดยการหมักจะอยู่ในสภาวะที่ปราศจากน้ำอิสระ (Mitchell และ Lonsane, 1992) แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การหมักแบบอาหารแข็งเป็นการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ การผลิตเอนไซม์ การผลิตเอทานอล และการผลิตโคจิ เป็นต้น โดยที่การหมักแบบอาหารแข็งมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบอาหารเหลวหลายประการ เช่น วิธีการหมักง่าย ไม่ซับซ้อน การลงทุนต่ำ ให้ผลผลิตเป็นปริมาณเข้มข้นสูง (Ward, 1995) รวมไปถึงเอนไซม์ที่ผลิตออกมาเป็นการผลิตเอนไซม์แบบอยู่ภายนอกเซลล์ ทำให้สะดวกในการเก็บเกี่ยวผลผลิต การหมักแบบอาหารแข็งเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต ทำให้ช่วยในการลดต้นทุนการผลิต (Ikari และ Mitchell, 1994) โดยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์ โดยเอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เช่น เอนไซม์ อะไมเลส, เซลลูเลส, โปรติเอส, ไซแกนเนส และ เพคตินเนส เป็นต้น (Graminha และคณะ, 2008) ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ มีการนำเอนไซม์ชนิดต่างๆ มาใช้เสริมในอาหารสัตว์ ได้แก่ เอนไซม์ อะไมเลส (amylase), เซลลูเลส (cellulase), โปรติเอส (protease), และ ไซแกนเนส (xylanase) เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตสูงขึ้น เพราะการเสริมเอนไซม์ลงไปในอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้การย่อยอาหารดีขึ้นจะช่วยให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี และสามารถลดต้นทุนค่าอาหาร ลดต้นทุนการผลิตผลผลิต เนื่องจากสามารถใช้สูตรอาหารคุณภาพต่ำราคาถูกลงมาเลี้ยงสัตว์ได้

ในการผลิตหัวอาหารสัตว์ที่มีเอนไซม์ต่างๆอยู่นั้น หลังจากการหมักแล้วจะต้องนำผลิตภัณฑ์ไปอบแห้งเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งจะอยู่ในช่วง 65-85 องศาเซลเซียส (Gibson, 1995) ซึ่งอุณหภูมิในการทำแห้งสามารถทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้จะมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่คงเหลือ จากการวิจัยของ Dilek และ Belma พบว่าเอนไซม์อะไมเลสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Dilek และ Belma, 2004) และ จากการวิจัยของ Singh และ คณะ พบว่าเอนไซม์ไซแกนเนสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Singh และ คณะ 2000) นอกจากนี้ในการผลิตเพื่อจำหน่ายนั้นจะต้องมีการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เพื่อรอจำหน่าย ซึ่งสภาวะในการเก็บรักษา จะมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ต่างๆได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาของผลของอุณหภูมิในการอบแห้งและการเก็บรักษา ต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์และสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อให้สามารถออกแบบและควบคุมกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ให้มีเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ

2.1 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำแห้งของหัวอาหารสัตว์ต่อ กิจกรรมของเอนไซม์
2. ศึกษาผลของสภาวะในการเก็บรักษา และระยะเวลาในการเก็บรักษาของหัวอาหารสัตว์ต่อ กิจกรรมเอนไซม์ และ ความชื้น
3. สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อใช้ทำนายความคงตัวของเอนไซม์ที่สภาวะการอบและการเก็บรักษาแบบต่างๆ

2.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งในการทำนายผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำแห้งของหัวอาหารสัตว์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และ ความชื้นระหว่างการทำแห้งที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ที่นำไปใช้ได้จริงในเชิงการผลิต เพื่อสามารถผลิตหัวอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพสูง นอกจากนี้งานวิจัยนี้อาจนำไปใช้ในการเป็นข้อมูลในการศึกษาต่อไปในการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในทางจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม กระบวนการหมัก หมายถึงกระบวนการผลิตใดๆ ก็ตามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวนมาก ซึ่งครอบคลุมทั้งการหมักแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน การพัฒนากระบวนการหมักมีพื้นฐานความรู้และปรับปรุงมาจากอาหารหมักในสมัยโบราณ ซึ่งการหมักสมัยนั้นเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ เนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ติดมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารหมัก ต่อมาเมื่อนุชนมีความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักมากขึ้น จึงมีการหมักที่มีความสำคัญทางการค้า ตัวอย่างเช่น การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นตัวเซลล์ เช่น การผลิตเซลล์ยีสต์ การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ การหมักที่ให้ผลผลิตเป็นสารเมแทโบไลต์ เช่น การหมักแอลกอฮอล์ การผลิต

กรดซิตริก สารปฏิชีวนะ เป็นต้น โดยการหมักสามารถแบ่งได้ตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้เป็นสองชนิด คือ

2.3.1 Solid state fermentation เป็นการหมักแบบอาหารแห้ง ซึ่งมีการเติมน้ำเพียงเล็กน้อย เพื่อเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการเท่านั้น

2.3.2 Submerged liquid fermentation เป็นการหมักแบบอาหารเหลว ซึ่งเป็นการหมักโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว เช่น การหมักแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชู เป็นต้น

2.3.1 กระบวนการหมักแบบอาหารแห้ง (Solid-State Fermentation, SSF)

กระบวนการหมักแบบอาหารแห้ง หมายถึง กระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ให้เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งชื้น เช่น เมล็ดถั่วเหลือง รำข้าว หรือกากมันสำปะหลัง เป็นต้น โดยการหมักจะอยู่ในสภาวะที่ปราศจากน้ำอิสระ (Mitchell และ Lonsane, 1992) แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การหมักแบบอาหารแห้งเป็นการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตโปรตีนในอาหารสัตว์ การผลิตเอนไซม์ การผลิตเอทานอล และการผลิตโคจิ เป็นต้น การหมักแบบอาหารแห้งสามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ประหยัดพลังงาน สามารถลดปัญหาการบำบัดน้ำเสียหลังการหมักได้ดี โดยที่การหมักแบบอาหารแห้งมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบอาหารเหลวหลายประการ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการหมักแบบอาหารแห้ง และอาหารเหลว (Mitchell และ Lonsane, 1992)

การหมักแบบอาหารแห้ง	การหมักแบบอาหารเหลว
1. วัสดุที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมง่าย ราคาถูก มักใช้วัสดุทางการเกษตร เช่น รำข้าวสาลี เมล็ดธัญพืช มันสำปะหลัง ฯลฯ	1. อาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบจากสารอาหารหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีราคาแพง และมีวิธีเตรียมยุ่งยาก
2. การควบคุมระบบไม่ยุ่งยาก	2. การออกแบบและควบคุมระบบต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก เช่น การควบคุม การเกิดฟอง การกวน การให้อากาศ
3. เนื่องจากความชื้นต่ำ ปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรียมีน้อย	3. ปัญหาการปนเปื้อนเป็นปัญหาที่ต้องระวังเป็นอย่างมาก
4. ผลผลิตต่อปริมาตรถังหมักสูงกว่าการหมักแบบอาหารเหลว	4. ผลผลิตต่อปริมาตรถังหมักต่ำกว่าการผลิตแบบอาหารแห้ง

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถนำมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์ โดยเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้สัตว์สามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพ (Bedford และ Partridge, 2001) โดยเอนไซม์ที่มีการนำมาประยุกต์ในอาหารสัตว์ เช่น เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรตีเอส ไซเลนเนส และ เพคตินเนส เป็นต้น (Graminha และคณะ, 2008) โดยตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Losane และ Ghildyal, 1992)

เอนไซม์	จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ
Glucoamylase	<i>A. oryzae</i>	Rice, Soybeans
	<i>A. niger</i>	Wheat bran or combined flour
Protease	<i>A. oryzae</i>	Wheat bran
		Wheat bran + Rice
		Bran + Soybean cake
Cellulase	<i>Trichoderma ressi</i>	Wheat bran
	<i>Pleurotus sojor</i>	Agro-industrial waste
Lipase	<i>T. koningii</i>	Wheat bran + saw dust
	<i>A. niger</i>	Wheat bran
	<i>A. lichuensis</i>	Wheat bran
Xylanase	<i>A. niger</i>	Wheat bran + rice straw
	<i>A. terreus</i>	
	<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	
Catalase	<i>A. oryzae</i>	Wheat bran
	<i>Rhizopus niveus</i>	Wheat bran

กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียและรา เป็นจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก โดยจุลินทรีย์ประเภทรามักเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการหมักแบบอาหารแข็ง เนื่องจากรามีการเจริญเป็นเส้นใย ดังนั้นจึงสามารถดูดซึมสารอาหารจากแหล่งอาหารในการเจริญได้ดี ราที่นิยมนำมาใช้ในการหมักแบบอาหารแข็ง เช่น *A.oryzae*, *A.niger* และ *Rhizopus sp.* โดยเฉพาะ *A.oryzae* มีข้อดี คือ สามารถเจริญเติบโตได้ในสารอาหารหลายประเภท สามารถใช้ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกได้ รวมไปถึง *A.oryzae* ถือว่าเป็นเชื้อราที่มีความปลอดภัย (GRAS, Generally Recognized as Safe) (Li

และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก และมีข้อมูลทางพันธุกรรมมาก ทำให้สะดวกในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีขึ้น (Rao และคณะ, 1998) ตัวอย่างการใช้ *A.oryzae* ในการผลิตเอนไซม์โดยใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การใช้ *A.oryzae* ในการผลิตเอนไซม์โดยใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

ชนิดเอนไซม์	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Amylase	<i>A.oryzae</i>	Cannel และ Moo-young(1980)
Protease	<i>A.oryzae</i> NISL 1913	Fukushima และคณะ (1989)
	<i>A.oryzae</i> NRRL 2160	Battaglino และคณะ (1991)
Xylanase	<i>A. oryzae</i> NRRL 3485	Szendefy และคณะ (2006)
Cellulase	<i>A. niger</i> KK2	Kang และคณะ (2004)

2.4 เอนไซม์จากการหมักแบบอาหารแข็ง

2.4.1 เอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะ α -1-4,glucosidic ของ Polysaccharide เช่น แป้ง หรือ โกลโคเจน ให้มีขนาดเล็กลง เอนไซม์อะไมเลสสามารถผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ มีทั้งราและแบคทีเรีย โดยกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Bacillus subtilis* *B.sterothermophilus* จากเชื้อราเช่น *Aspergillus oryzae*, *A.niger*, และ *Rhizopus sp* (Prior และคณะ, 1992)

มีงานวิจัยที่ใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากรำจำนวน 3 สายพันธุ์โดยใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (Soccol และคณะ, 1994) พบว่าการหมักแบบอาหารแข็งสามารถให้ปริมาณเอนไซม์มากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว 6-15 เท่า และงานวิจัยของ (Baysal และคณะ, 2003) พบว่ากระบวนการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากการหมักแบบอาหารแข็ง

เอนไซม์อะไมเลสในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์จะช่วยในการย่อยสารอาหารประเภทแป้ง ทำให้ช่วยในการย่อยภายในลำไส้เล็กของสัตว์ให้ดีขึ้นและเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมอาหาร ทำให้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์สูงขึ้น

เอนไซม์อะไมเลสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 50 °C นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์อะไมเลสถูกทำให้เสียสภาพได้โดยไอออนของโลหะบางชนิดเช่น calcium เป็นต้น (Dilek และ Belma, 2004) และ (Milan และคณะ, 2002)

2.4.2 เอนไซม์เซลลูเลส

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะ beta-1,4-D-glycosidic linkages ไปเป็น polysaccharide สายสั้น และ กลูโคส สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ รวมไปถึงใช้ในการบำบัดน้ำเสีย ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์การใช้เอนไซม์เซลลูเลส จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายขององค์ประกอบอาหารสัตว์ ทำให้เกิดประโยชน์กับสัตว์มากขึ้น โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ในการช่วยย่อยองค์ประกอบในอาหารสัตว์ประเภทเส้นใยเซลลูโลส

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถใช้จุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย และราในการผลิต โดยจุลินทรีย์ประเภทราที่สามารถนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* โดยงานวิจัยของ Shah และคณะ (2005) ได้ทำการหมัก *Aspergillus spp.* MPS-002 ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่ากระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และมีงานวิจัยพบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากรา *Trichoderma reesei* QMY-1 ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งจะสามารถผลิตเอนไซม์ ได้มากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว 72% (Chahal และคณะ, 1984)

การศึกษาการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่งโดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C (Carnimal, 1984) รวมไปถึงงานวิจัยของ Coral และคณะ (2003) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C

2.4.3 เอนไซม์ไซแลนเนส

เอนไซม์ไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะ β -1,4-xylan ของ polysaccharide ไปเป็นไซโลส เอนไซม์ไซแลนเนสมีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมชนิดต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมผ้า และอุตสาหกรรมอาหาร โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้มีทั้ง รา แบคทีเรีย และยีสต์ แต่มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสมากกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ โดยมีงานวิจัยพบว่าการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสโดยการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงกว่าการหมักแบบอาหารเหลวถึง 22 เท่า (Archana และคณะ, 1997) รวมไปถึงงานวิจัยของ Maciel และคณะ (2008) พบว่า การผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *A. niger* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากถั่วเหลืองและขานอ้อยเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ในปริมาณสูง (3500 U/g)

การใช้เอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารสัตว์ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของค์ประกอบในอาหารสัตว์ทำให้เกิดประโยชน์กับสัตว์มากขึ้น โดยช่วยในการย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharide) ทำให้มีผลไปช่วยลดความหนืด ในกระเพาะของสัตว์ (Bedford, 2001)

เอนไซม์ไซแลนเนสจากราจะหน่ร้อน *Thermomyces laniginosus* strain SSBP พบว่าการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง 32% หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 30 นาที (Singh และคณะ, 2000)

2.4.4 เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอสมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน หรือ โพลีเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโน หรือ เปปไทด์สายสั้นๆ โดยมีลักษณะปฏิกิริยาเป็นการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (Hydrolysis) เอนไซม์โปรตีเอสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมซักล้าง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา สำหรับจุลินทรีย์ ที่ผลิตโปรตีเอสได้มีทั้งพวก รา แบคทีเรีย (Rao และคณะ, 1998) โดยจุลินทรีย์ประเภทที่นำมาใช้ในการหมักแบบอาหารแข็ง เช่น *A. oryzae*, *A. niger*, และ *Rhizopus* sp. เนื่องจากมีการเจริญเป็นเส้นใย ดังนั้นจึงสามารถดูดซึมสารอาหารจากแหล่งอาหารได้ดี และมีการผลิตเอนไซม์แบบ Extracellular (Ikari และ Mitchell, 1994) ทำให้สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้โดยง่าย และให้ผลผลิตสูง

มีงานวิจัยที่ใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสด้วย *A.oryzae* โดยใช้ฟางข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ในปริมาณสูง (~1200 U/g) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ (Chutmanop และคณะ, 2007)

การเสริมเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารสัตว์จะช่วยให้การย่อยสลายอาหารของสัตว์ให้ดีขึ้น และเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมอาหาร ทำให้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์สูงขึ้น (Ibrahim, 2007) นอกจากนี้เอนไซม์โปรตีเอสในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ ยังช่วยในการยับยั้งสารพวก anti-nutritional factors เช่น lectin inhibitor และ trypsin inhibitor ที่มักพบในถั่วเหลือง ทำให้สัตว์ได้รับสารอาหารที่ดีขึ้น (Bedford, 2001)

เอนไซม์โปรตีเอสประเภท Alkaline protease จะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C โดยมีความคงตัวของเอนไซม์ในช่วง pH 5.0-9.0 (Nasuno และคณะ, 1972) และ (Gessesse และคณะ 2003) ในขณะที่เอนไซม์โปรตีเอสประเภท acid protease จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °C และช่วง pH 4-4.5 รวมไปถึงสามารถเสถียรสภาพได้โดยไอออนของโลหะบางชนิดเช่น calcium เป็นต้น (Ghorbel, 2003)

2.5 การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ เมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมเพียงเล็กน้อย ก็สามารถทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไปได้มาก เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาเฉพาะ ขึ้นกับโครงสร้างของเอนไซม์เป็นอย่างมาก สาเหตุหลักของการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์มีดังนี้

1. ความร้อน โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) และ โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure) ของเอนไซม์ ประกอบด้วยแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลและเป็นพันธะที่ไม่แข็งแรง ทำให้เอนไซม์ที่ได้รับความร้อนสูญเสียสภาพธรรมชาติ เพราะพันธะที่ยึดเหนี่ยวโมเลกุลภายในหลุดออกจากกัน

2. พีเอช กรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างของเอนไซม์ ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน (Functional group) 2 กลุ่ม คือ $-NH_2$ และ $-COOH$ โครงสร้างของเอนไซม์จึงมีประจุ เมื่อ pH ของสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลง ทำให้โครงสร้าง 3 มิติ ของเอนไซม์เปลี่ยน ทำให้เอนไซม์สูญเสียธรรมชาติ

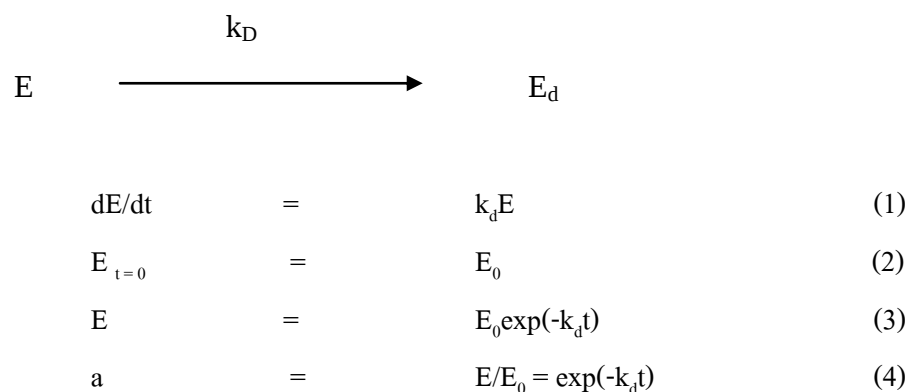
3. โลหะ ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Co^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+} สามารถทำให้เกิดการยึดจับ (Chelating) ทำให้เอนไซม์ตกตะกอนหรือเสียสภาพธรรมชาติ

4. สารออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) เช่น ออกซิเจน และสารที่เป็นสารออกซิไดซ์สามารถทำให้เอนไซม์หลายชนิดเสื่อมสภาพได้ โดยมักจะทำให้เกิดไดซัลไฟด์ บริดจ์ (Disulfide Bridges) ในลูกโซ่โพลีเพปไทด์ที่มี -SH ของกรด อะมิโน ซีสทีอีน (Cysteine)

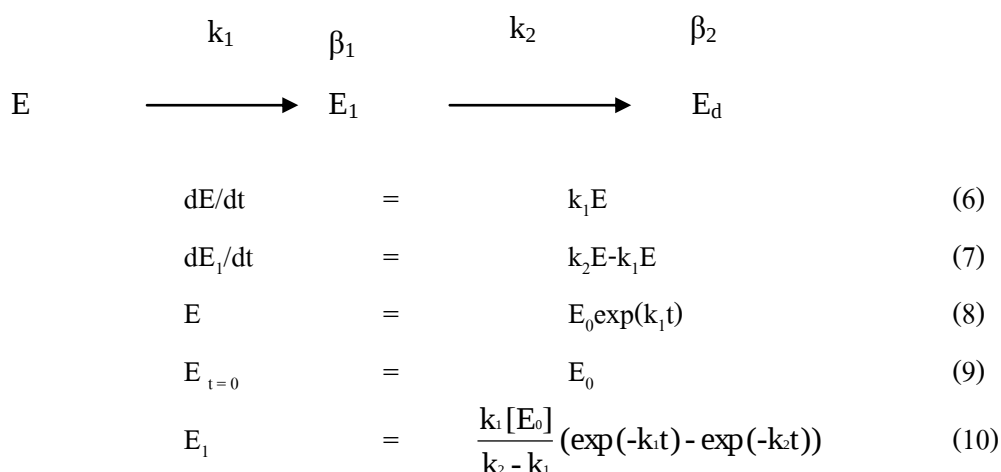
5. ปัจจัยอื่นๆ เช่น แรงกล (Mechanical force) เป็นต้น

2.6 จลนพลศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษาจลนพลศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากความร้อน (thermal deactivation) พบว่าการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โดยทั่วไป เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (Bassetti, 2000) ตามสมการ (1)-(4)



แต่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ บางสถานะอาจไม่เป็นไปตามแบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่งได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแบบจำลองการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เป็นแบบจำลองเชิงอนุกรม (series deactivation) หรือ จัดได้เป็น (non-first order model) ตามสมการ (6)-(12) (Sadana, 1992)



$$a = \frac{[E] + \beta_1[E_1]}{[E_0]} \quad (11)$$

$$a = \frac{1 + \beta_1 k_1}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) - \frac{k_1 \beta_1 \exp(k_2 t)}{k_2 - k_1} \quad (12)$$

E : กิจกรรมของเอนไซม์

E_1 : กิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะกลาง

E_d : กิจกรรมของเอนไซม์ที่เสื่อมสภาพ

k_1, k_2, K_d : ค่าคงที่ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

β : อัตราส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะกลางต่อสภาวะเริ่มต้น

T : อุณหภูมิ (เคลวิน)

t : เวลา (นาทึ)

$t_{1/2}$: ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

1. Citric acid, Na_2HPO anhydrous, Dinitrosalicylic acid จาก Sigma Chemical Co.Ltd.,USA.
2. D-glucose, D-xylan, Fluka Biochemika จาก Switzerland.
3. Sodium Hydroxide (NaOH), Potato Dextrose Agar จาก E Merck, Damstadt Germany.
4. Trichloroacetic acid (TCA) Folin – Ciocalte's phenol reagent จาก Carlo Erba reagent Ltd., Lambadia Italy.
5. Sodium carbonate (Na_2CO_3 Soluble starch Carboxymethyl Cellulose) Casaein Potassium Sodium Tartrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) จาก Ajax Finechem Pty Ltd Australia.

3.2 การเตรียมจุลินทรีย์ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Aspergillus oryzae* (wild type) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ทำการเก็บรักษาโดยการเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยมีอายุการเก็บรักษา 1 เดือน สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ *A. oryzae* ในการหมัก จะทำการเลี้ยง *A. oryzae* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเตรียมเป็น spore suspension โดยให้ได้ความเข้มข้นโดยประมาณ 10^7 spore/ml โดยใช้ 0.01% ของ Tween 80 ปริมาตร 5 ml ต่อ slant เป็นตัวชะ

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 กระบวนการหมัก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กากถั่วเหลืองปรับความชื้นให้ได้ 50 % จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำ spore suspension มาคลุกเคล้าให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบแห้งของหัวอาหารสัตว์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำตัวอย่างจากหัวข้อ 3.3.1 มาทำการอบแห้งโดยใช้ตัวอย่าง 300 กรัม อบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมงเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และ ไซแลนเนส โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.3 ผลของสภาวะในการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาของหัวอาหารสัตว์ต่อกิจกรรมเอนไซม์

นำตัวอย่างจากหัวข้อ 3.3.1 มาทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนมีความชื้น 7.79% ทำการเก็บตัวอย่างไว้ในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ภายในห้องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก 15 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และ ไซแลนเนส และความชื้นที่เปลี่ยนไปตลอดการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.4 การสกัดเอนไซม์

ทำการชั่งตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจากการหมัก 1 กรัมในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7 ปริมาตร 10 ml นำไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) ด้วยอัตรา 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 5 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 °C เพื่อรักษาสภาพเอนไซม์ไว้ก่อนจะวิเคราะห์

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Rick และ Stegbauer (1974) สำหรับนิยามของกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส คือ 1 หน่วยของเอนไซม์ อะไมเลส คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7

3.5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Mandels (1976) สำหรับนิยามของกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 หน่วยของเอนไซม์ เซลลูเลส คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7

3.5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนสได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Bailey (1992) สำหรับนิยามของกิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนส 1 หน่วยของเอนไซม์ ไซเลนเนส คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยไซเลนให้เป็นน้ำตาลไซโลสได้ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7

3.5.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Anson (1944) สำหรับนิยามของกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส 1 หน่วยของเอนไซม์ โปรตีเอส คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนให้เป็นกรดอะมิโนไทโรซีนได้ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 9

3.6 การพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์

สำหรับการพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ ได้ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 3 แบบจำลองได้แก่ แบบจำลองปฏิกิริยาอันดับศูนย์ แบบจำลองปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ แบบจำลองแบบอนุกรม ในการทำนายการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์

3.6.1 แบบจำลองปฏิกิริยาอันดับศูนย์

กิจกรรมของเอนไซม์หาได้จาก

$$A = -kt$$

โดยกำหนดให้

A คือ กิจกรรมของเอนไซม์ในรูปไร้หน่วย (กิจกรรมของเอนไซม์/กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)

k คือ ค่าคงที่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (ชั่วโมง⁻¹)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

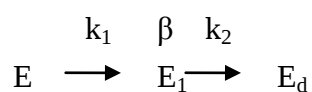
3.6.2 แบบจำลองปฏิกิริยาระดับหนึ่ง

กิจกรรมของเอนไซม์หาได้จาก

$$A = \exp^{-kt}$$

3.6.3 แบบจำลองแบบอนุกรม (Sadana , 1992)

จากกลไกการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์



E คือ เอนไซม์ในสภาวะธรรมชาติ

E_1 คือ เอนไซม์ในสภาวะกลาง

E_d คือ เอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติ

β คือ ค่าแอกติวิตี้คงเหลือที่สภาวะกลาง (E_1/E_2)

กิจกรรมของเอนไซม์หาได้จาก

$$A = \frac{(1 + \beta_1 k_1)}{k_2 - k_1} \exp(-k_1 t) - \frac{k_1 \beta_1 \exp(-k_2 t)}{k_2 - k_1}$$

โดยกำหนดให้

A คือ กิจกรรมของเอนไซม์ในรูปไร้หน่วย (กิจกรรมของเอนไซม์/กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)

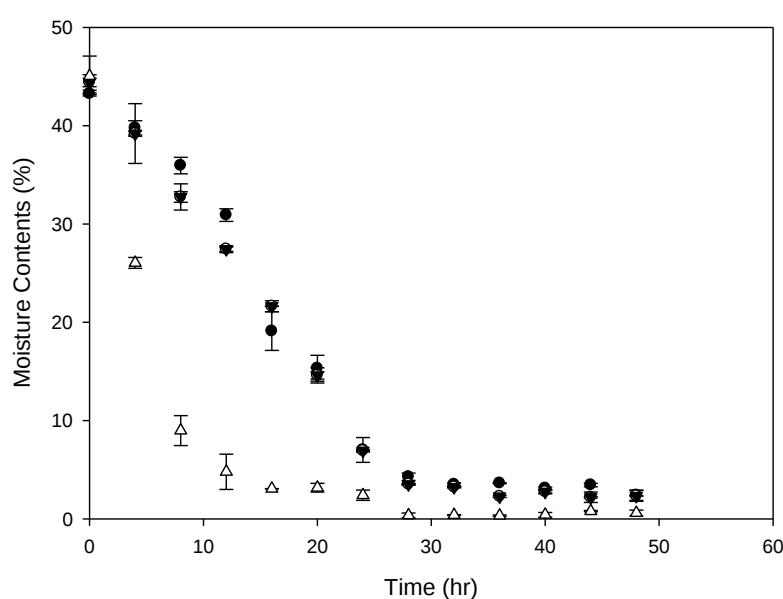
k_1 และ k_2 คือ ค่าคงที่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (ชั่วโมง⁻¹)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

4. ผลการทดลอง

4.1 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งปริมาณความชื้นของหัวอาหารสัตว์

ผลของปริมาณความชื้นต่อระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิต่างกันแสดงไว้ในรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส จะใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงในการทำให้ผลิตภัณฑ์หัวอาหารสัตว์ มีปริมาณความชื้นต่ำกว่า 10 % ส่วนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจะใช้ระยะเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง

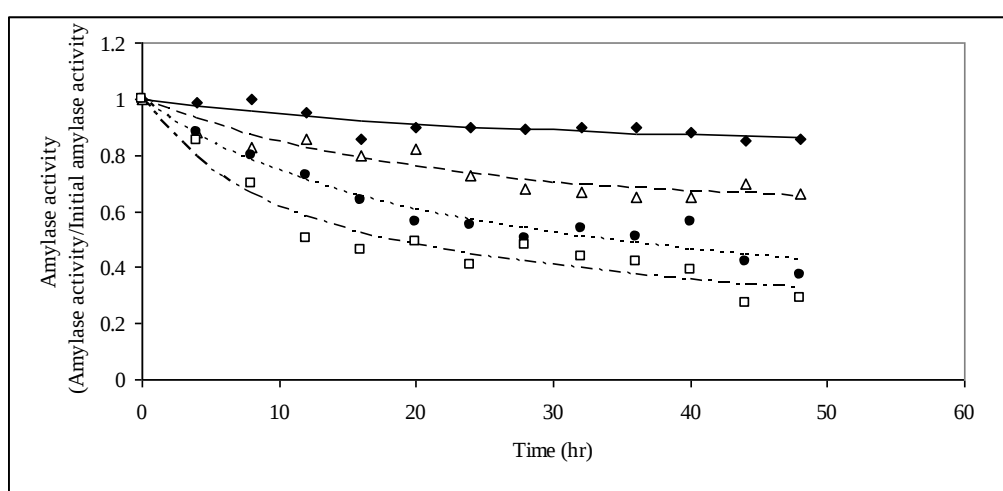


รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C (●), 60°C (○), 70°C (▼) และ 80°C (△)

4.2 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดลองผลของอุณหภูมิในการทำแห้ง ต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส แสดงในรูปที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์อะไมเลสจะสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อยในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะลดลงเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำแห้งสูงขึ้น เมื่ออบแห้งหัวอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะมีปริมาณความชื้นต่ำกว่า 10% จะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ 90%, 73%, 55% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ในขณะที่การอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะมีปริมาณความชื้นมีค่าต่ำกว่า 10% จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียง 70% จากกิจกรรมของ

เอนไซม์เริ่มต้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการอบแห้งหัวอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิต่ำจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในผลิตภัณฑ์สุดท้ายสูงกว่า ถึงแม้ว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิต่ำจะใช้เวลาในการอบแห้งนานกว่า ยกเว้นการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ ต่ำกว่าการอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเพราะการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการอบแห้งที่นานกว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการวิจัยของ Nigam และ Singh พบว่าเอนไซม์อะไมเลส จาก *A. oryzae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ 40 °C (Nigam และ Singh, 1995) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จาก *Bacillus spp.* จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 60 °C (Dilek และ Belma, 2004)

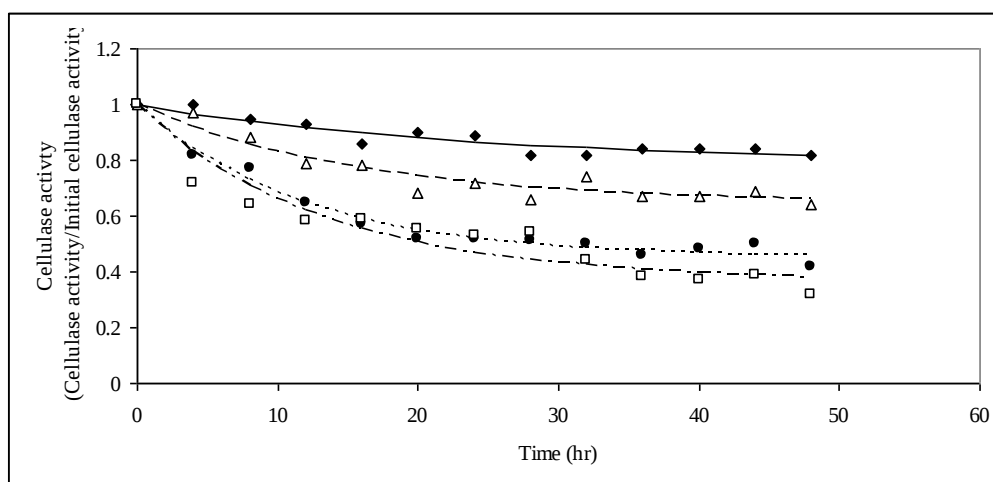


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ () 50°C, () 60°C, () 70°C และ () 80°C จากผลการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม

สำหรับผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และ โปรตีเอส แสดงในรูปที่ 3-5 ตามลำดับ โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมได้เร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำแห้งสูงขึ้นโดยลำดับ

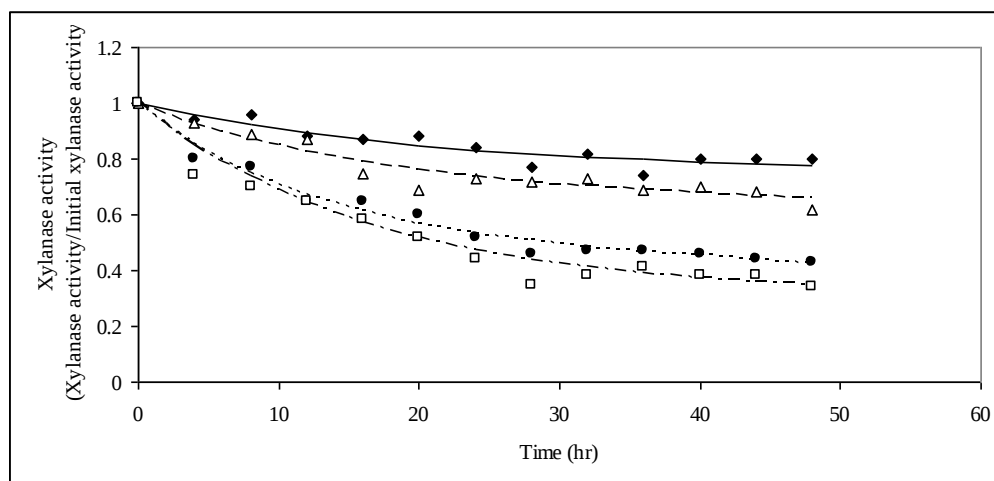
โดยการอบแห้งหัวอาหารสัตว์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ 88%, 72%, 52% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ในขณะที่การอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจนมีปริมาณความชื้นมีค่าต่ำกว่า 10% จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือ 66% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เซลลูเลสจาก *A.niger* พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C (Coral และคณะ 2002) นอกจากนี้ Carnimal (1984) โดยพบว่ากิจกรรม

ของเอนไซม์เซลลูเลสจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C (Carnimal, 1984) รวมไปถึงงานวิจัยของ Andreus และคณะที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังการบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Andreus และ คณะ 1999)



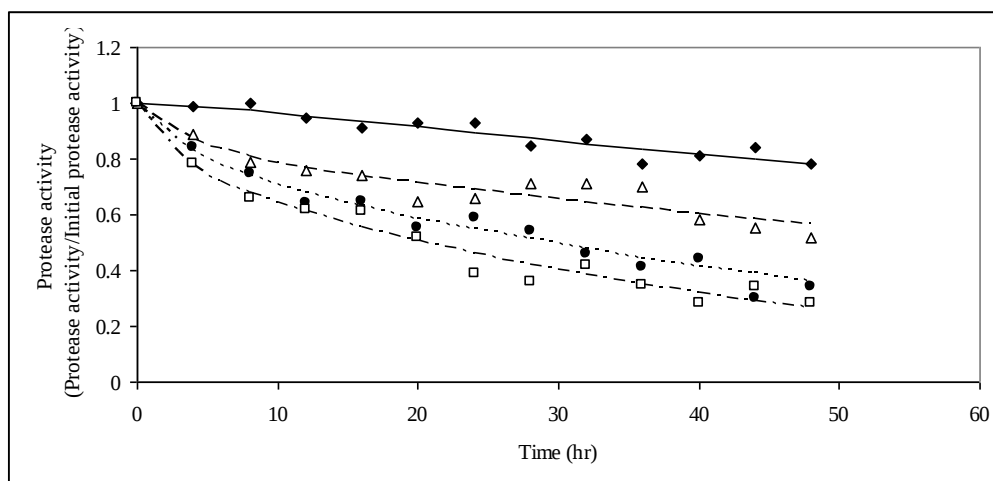
รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ () 50°C , () 60°C , () 70°C และ () 80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม

รูปที่ 4 แสดงการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสระหว่างการอบแห้งพบว่า การอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสน้อยที่สุด โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 83% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ในขณะที่การอบแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้น เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมได้เร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำแห้งสูงขึ้นโดยลำดับ โดยการอบแห้งที่ 60, 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 73% และ 52% ตามลำดับ ส่วนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณ 70% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pereira (2003) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *B. subtilis* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป โดยประสิทธิภาพของเอนไซม์ไซแลนเนสที่บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 20 % ของกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Pereira และคณะ, 2003)



รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ () 50°C, (●) 60°C, (△) 70°C และ (◆) 80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม

ผลการทดลองการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสระหว่างการอบแห้งแสดงในรูปที่ 5 โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ อะไมเลส ไซแลนเนส และโปรตีเอส ดังกล่าวข้างต้น โดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนน้อยที่สุด โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีน 93% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ส่วนการอบแห้งที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 67% และ 59% ตามลำดับ ส่วนการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณความชื้นน้อยกว่า 10% โดยใช้เวลา 8 ชั่วโมง เอนไซม์โปรตีนจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณ 66% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เอนไซม์โปรตีเอสประเภท Alkaline protease จะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C โดยมีความคงตัวของเอนไซม์ในช่วง pH 5.0-9.0 (Nasuno และคณะ, 1972) นอกจากนี้ Ghorbel และคณะ (2002) ที่พบว่าเอนไซม์โปรตีนจาก *Bacillus cereus* BG1 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณ 30% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น เมื่ออบที่ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเมื่ออบที่ 70 °C เป็นเวลา 15 นาที (Ghorbel และ คณะ 2002)



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ () 50°C, () 60°C, () 70°C, () 80°C จากกราฟทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม

4.3 การพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างการอบแห้ง

เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 3 แบบ คือ แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับศูนย์, แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ แบบจำลองแบบอนุกรม เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ พบว่าแบบจำลองอนุกรมสามารถทำให้เส้นกราฟที่สอดคล้องกับผลการทดลองมากกว่าแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์แบบอื่นๆ (ตารางที่ 4) โดยที่แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่งอาจสามารถทำนายการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้เฉพาะที่อุณหภูมิสูงๆ เท่านั้น

แบบจำลองแบบอนุกรมสามารถอธิบายกลไกในการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ว่าเอนไซม์ที่สภาวะธรรมชาติ (E) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ในสภาวะกลาง (Intermediate form, E_1) ด้วยค่าคงที่ k_1 ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนไปสู่เอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติ (E_d) ด้วยค่าคงที่ k_2 (Boy et al, 1999) และค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ (k_1, k_2) แปรผันตามอุณหภูมิ (ตารางที่ 5) โดยที่ค่าคงที่ k_1 และ k_2 จะมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าค่าคงที่ k_1 มีค่าสูงกว่าค่าคงที่ k_2 มากแสดงว่าขั้นตอนการเปลี่ยนเอนไซม์จากสภาวะธรรมชาติไปเป็นเอนไซม์ในสภาวะกลางเกิดขึ้นได้เร็วกว่าการเปลี่ยนจากสภาวะกลางไปยังสภาวะเสียสภาพธรรมชาติ ส่วนค่าแอดคทีวิตี้คงเหลือที่สภาวะกลาง (β) จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แสดงว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ในสภาวะกลางเปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองทางจิตนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการอบแห้ง

เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	แบบจำลองปฏิกิริยา อันดับศูนย์	แบบจำลองปฏิกิริยา อันดับหนึ่ง	แบบจำลองแบบอนุกรม
อะไมเลส	50	0.66	0.67	0.78
	60	0.66	0.74	0.91
	70	0.74	0.85	0.95
	80	0.54	0.81	0.94
เซลลูเลส	50	0.75	0.76	0.89
	60	0.62	0.68	0.93
	70	0.44	0.66	0.98
	80	0.55	0.82	0.93
ไซเลนเนส	50	0.82	0.81	0.89
	60	0.65	0.76	0.90
	70	0.75	0.92	0.97
	80	0.65	0.87	0.97
โปรตีเอส	50	0.69	0.71	0.87
	60	0.69	0.76	0.93
	70	0.63	0.81	0.98
	80	0.55	0.78	0.94

ตารางที่ 5 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการอบแห้ง ตามแบบจำลองแบบอนุกรม

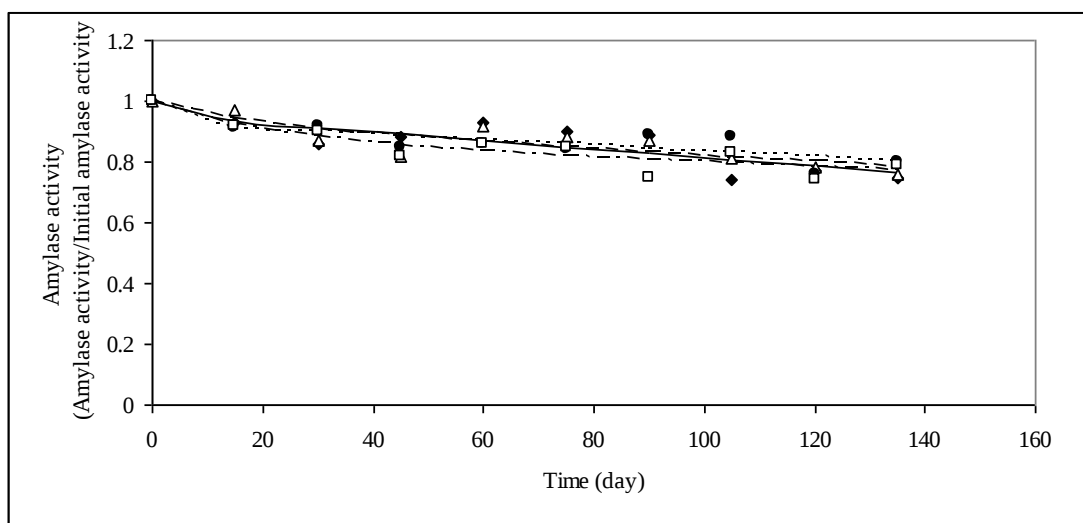
เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	k_1 (hr ⁻¹)	k_2 (hr ⁻¹)	β
อะไมเลส	50	0.0418	1×10^{-6}	0.8424
	60	0.0525	1×10^{-6}	0.6245
	70	0.0869	9.2×10^{-3}	0.5850
	80	0.1363	1.2×10^{-2}	0.5190
เซลลูเลส	50	0.0423	1×10^{-8}	0.7920
	60	0.0648	1×10^{-8}	0.6411
	70	0.0660	7×10^{-4}	0.4646
	80	0.0668	2.4×10^{-4}	0.3812
ไซเลนเนส	50	0.0472	1×10^{-8}	0.7521
	60	0.0640	1.5×10^{-3}	0.6752
	70	0.0808	4.3×10^{-3}	0.4845
	80	0.0864	4.9×10^{-3}	0.4055
โปรตีเอส	50	0.1533	5.7×10^{-3}	0.9900
	60	0.2414	8.1×10^{-3}	0.8061
	70	0.2627	1.7×10^{-2}	0.7693
	80	0.3677	2.3×10^{-2}	0.7514

4.4 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

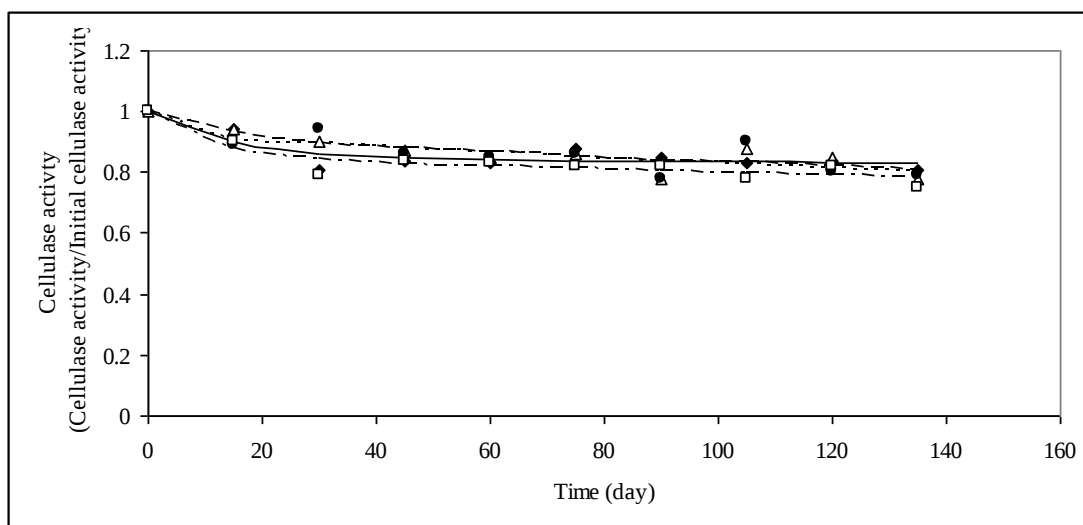
รูปที่ 6-9 แสดงผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ จากผลการทดลอง พบว่าเอนไซม์จะมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าการเก็บรักษาหัวอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 4°C, 25 °C, 30°C และ 37°C เป็นเวลา 135 วันจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 75%, 75%, 80% และ 79% จากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเริ่มต้นตามลำดับ (รูปที่ 6) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บรักษาน่าจะเกิดจาก ปฏิกิริยาออกซิไดซ์โดยอากาศ และ เอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยเอนไซม์อื่นๆให้

สูญเสียโครงสร้างการทำงาน (Juul, 1997) สำหรับผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไชเลนเนส และโปรติเอส พบว่ามีแนวโน้มเดียวกับเอนไซม์อะไมเลส โดยจะมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยรูปที่ 7 แสดงผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาหัวอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 4°C, 25 °C, 30°C, 37°C เป็นเวลา 135 วันจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 81%, 78%, 79% และ 75% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ เช่นเดียวกับรูปที่ 8 และ 9 ซึ่งผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไชลเลนเนส และโปรติเอส โดยเมื่อทำการเก็บรักษาหัวอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 4°C, 25 °C, 30°C, 37°C เป็นเวลา 135 วันจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ไชลเลนเนส 63%, 73%, 74% และ 73% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น และเหลือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 80%, 76%, 81% และ 82% จากกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น

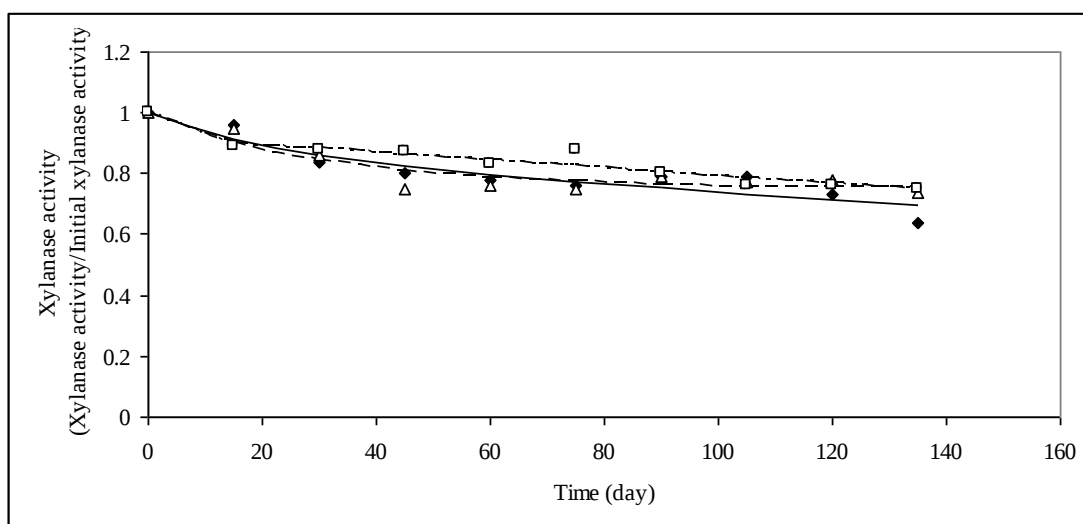
ผลการทดลองที่ได้ให้แนวโน้มสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น งานวิจัยของ Aksoy และ คณะ (1999) ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะลดลงในระหว่างการเก็บรักษา โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเพียง 20% เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้นเมื่อทำการเก็บรักษาใน phosphate buffer, pH 6.9, เป็นเวลา 30 วัน และงานวิจัยของ Dinser และ Telefoncu ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจะเหลือเพียง 72% เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้นเมื่อทำการเก็บรักษาใน phosphate buffer pH 7.6 เป็นเวลา 11 วัน ในอุณหภูมิ 4°C (Dinser และ Telefoncu, 2006)



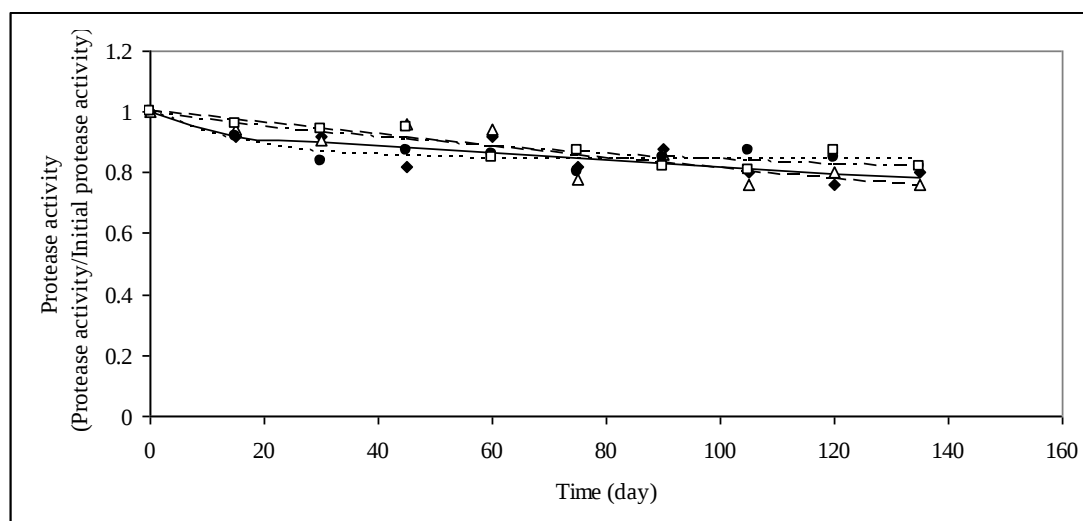
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (□) 4°C, (◆) 25°C, (△) 30°C, (●) 37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (◆) 4°C, (△) 25°C, (□) 30°C, (●) 37°C จาการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (□) 4°C, (◆) 25°C, (△) 30°C, (●) 37°C จาการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ () 4°C, (◆) 25°C, (△) 30°C, (●) 37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม

4.5 การวิเคราะห์แบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 3 แบบ ได้แก่ แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับศูนย์, แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ แบบจำลองแบบอนุกรม โดยพบว่าแบบจำลองอนุกรมสามารถทำให้เส้นกราฟที่สอดคล้องกับผลการทดลองมากกว่าแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์แบบอื่นๆ (ตารางที่ 6)

จากตารางที่ 7 พบว่าค่าคงที่ของการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ไม่ได้แปรผันตามอุณหภูมิ ซึ่งน่าจะเป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ในการเก็บรักษาไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษา

เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	แบบจำลองปฏิกิริยา อันดับศูนย์	แบบจำลองปฏิกิริยา อันดับหนึ่ง	แบบจำลองแบบอนุกรม
อะไมเลส	50	0.59	0.62	0.72
	60	0.70	0.72	0.77
	70	0.50	0.54	0.75
	80	0.60	0.63	0.83
เซลลูเลส	50	0.27	0.27	0.80
	60	0.53	0.34	0.79
	70	0.38	0.42	0.71
	80	0.57	0.59	0.86
ไซเลนเนส	50	0.73	0.77	0.88
	60	0.73	0.61	0.89
	70	0.61	0.78	0.92
	80	0.75	0.78	0.88
โปรตีเอส	50	0.56	0.59	0.76
	60	0.77	0.77	0.78
	70	0.51	0.51	0.83
	80	0.73	0.73	0.84

ตารางที่ 7 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเสื่อมสภาพของ
เอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษา ตามแบบจำลองแบบอนุกรม

เอนไซม์	อุณหภูมิ (°C)	k_1 (day ⁻¹)	k_2 (day ⁻¹)	β
อะไมเลส	4	0.0234	1.1×10^{-4}	0.8457
	25	0.0871	1.4×10^{-4}	0.9292
	30	0.1163	1×10^{-3}	0.9134
	37	0.0401	9×10^{-4}	0.8487
เซลลูเลส	4	0.0779	5.82×10^{-5}	0.8524
	25	0.0627	8.7×10^{-5}	0.8956
	30	0.04683	9.9×10^{-6}	0.9152
	37	0.0965	5.7×10^{-4}	0.8409
ไพลานเนส	4	0.0467	1.7×10^{-3}	0.8437
	25	0.0339	1×10^{-6}	0.7495
	30	0.0694	1.6×10^{-3}	0.9265
	37	0.0445	1.5×10^{-3}	0.8569
โปรตีเอส	4	0.0434	2×10^{-3}	0.8088
	25	0.0083	2.1×10^{-3}	0.7542
	30	0.0581	9.53×10^{-5}	0.8454
	37	0.0126	1×10^{-9}	0.7828

5. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์ พบว่าการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการอบแห้ง 24 ชั่วโมง จะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการอบแห้งที่อุณหภูมิอื่นๆ โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 90%, 88%, 83% และ 93% ของเอนไซม์ อะไมเลส เซลลูเลส ไซแลนเนส และ โปรติเอส เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 3 แบบ คือ แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับศูนย์ แบบจำลองแบบปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ แบบจำลองแบบอนุกรม พบว่าแบบจำลองอนุกรมสามารถทำให้เส้นกราฟที่สอดคล้องกับผลการทดลองมากกว่าแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์แบบอื่นๆ และค่าคงที่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (k_1 และ k_2) แปรผันตามอุณหภูมิ

จากผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จะมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าใกล้เคียงกันโดยจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 80-90% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 135 วัน เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษาพบว่าการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษาสามารถทำนายได้ด้วยแบบจำลองแบบอนุกรม

เอกสารอ้างอิง

- Aksoy, S., Tümtürk H. and Hasirci, N., 1998, "Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres", **Journal of Biotechnology**, Vol. 60, pp. 37-46.
- Andreasson, J., Azevedo, H., Cavaco-Paulo, A., 1999, "Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes" **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Vol. 7 pp. 233 – 239.
- Anson, M.L., 1938, "Estimation of pepsin, trypsin, papain and acthepsin with hemoglobin", **Journal of General Physiology**, Vol 22, pp.79-88.
- Archana, A. and Satyanarayana, T., 1997, "Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation", **Enzyme and Microbial Technology**, pp. 12-17.
- Bailey, M.J., Biely, P. and Pontanen, K., 1992, "Inter laboratory testing of methods for assay of xylanase activity", **J. Biotechnol.**, Vol. 23, pp. 257-270.
- Battaglini, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholoma, G., 1991, "Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation", **Apply Microbiology and Biotechnology**, Vol. 35, 292–296.
- Baysal, Z., Uyar, F. and Aytekin, Ç., 2003, "Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermo-tolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water", **Process Biochemistry**, Vol.38, pp. 1665-1668.
- Bedford R.M, Patridge G.G., 1995, **Enzymes in farm animal nutrition**, Finnfeeds International, Marlborough, Wiltshire, UK
- Bhumiratana, A., Flegel, T.W., Glinsuko, T and Somporan, W., 1980, "Isolation and analysis of mold from soy sauce and koji in Thailand", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 39, pp. 430-435.

Boy M., Dominik, A., Voss, H. 1999, "Fast determination of biocatalyst process stability". **Process Biochemistry**, Vol, 34, pp. 535-547.

Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., Srinophakun, P., 2008, "Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agro industrial substrates", **J. Chem. Technol**, Vol. 83, pp. 1012–1018.

Cannel, E. and Young, M., 1980, "Solid-state fermentation systems". **Process Biochemistry**, Vol. 15, pp. 2–7.

Carnimal, G., 1985, "Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose" **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 27, pp. 1282-1290.

Chahal, S.D., 1984, "Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production" **Appl y Environmental Microbiology**, Vol. 49, pp. 205-210.

Coral, G., Burhan, A., Hatice, G., 2002, "Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain" **Turkey J Biology**, Vol. 26, pp. 209-213.

Dinçer, A. and Telefoncu, A., 2007, "Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Vol. 45, pp. 10-14

Dilek, A., Belma, O., 2004, " α -Amylase inactivation by Temperature during starch hydrolysis", **Process biochemistry**, Vol. 39, pp. 1137-1144.

Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T. and Motai, H., 1989 "Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*", **Applied Microbiology and Biotechnology** , Vol. 30, pp. 604–608.

Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe A.B., and Mattiasson, B., 2003, "Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol.32, pp. 519-524.

Ghorbel, B., Kamoun ,S.A and Nasri, M., 2003, "Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 32, pp. 513-518.

Gibson, K., 1995, "The pelleting stability of animal feed enzymes", In: **2nd European Symposium on Feed Enzymes**, Noordwijkerhout, pp. 157-162.

Graminha, E.B.N, Goncalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Silva, R., Gomes, E., 2008, "Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition", **Animal Feed Science and Technology**, Vol. 14, pp. 1-22.

Ikari, L., and Mitchell, D.A., 2000, "Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture," **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 68 , pp.619-627.

Juul, P., 1999, "Stability of Plasma Enzymes During Storage" **J.Clinical Chemistry. Principles and Techniques**, Vol. 13, pp. 417-422.

Kang, W. S., Park, S.Y., Lee, S.J., Hong. I. S. and Kim, W., S., 2004, "Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass", **Bioresource Technology**, Vol. 91, pp. 153-156.

Losane, B.K. and Ghildyal, N.P., 1992 "Exoenzyme", In **Solid state cultivation**, Elsevier Applied Science, Barking, Essex, pp.191-209.

Li, D.M., Horie,Y., Wang,Y., Li,R., 1998, "Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis". **Mycoscience**, Vol. 39, pp. 299-305.

Maciel, M.G., Vandenberghe, P.L. , Windson, C., Haminiuk,I., Fendrich, C.R., Bianca, B.E.D., Brandalize, T.Q.S., Pandey, A., Soccol, R.C, 2008, “Xylanase Production by *Aspergillus niger* PB326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs”, **Food Technol.Biotechnol**, Vol. 46, pp.183–189.

Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C., 1976, “Measurement of saccharifying cellulose”, **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, Vol. 6, pp. 21-33.

Milan, P., Jolanta, B., 2002, “Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*”, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 20, pp. 443–450.

Mitchell, D.A., Lonsane, B.K., 1992, “Definition characteristics and potential”, In: **Solid Substrate Cultivation**, New york, Elsevier Applied Science, pp. 1–16.

Nasuno, S. 1972, “Differentiation of *Aspergillus sojae* from *Aspergillus oryzae* by polyacrylamide gel disc electropholysis”, **Journal of General Microbiology**, Vol. 71, pp. 29-33.

Nigam, P. and Singh, D., 1995, “Enzyme and microbial systems involved in starch processing” **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 17, pp. 770-778.

Pereira, P., Carvalho, A., Ferreira, M. and Barros, M., 2004, “Thermo stabilization of *Bacillus subtilis* CCMI 966 xylanases with trehalose study of deactivation kinetics”, **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 34, pp. 278-282.

Prior, B.A., Du Preez, J.C. and Rein, P.W.,1992 “Environment parameter”, In **Solid State Cultivation**, New york, Elsevier Applied Science, pp. 65-85.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghate, M.S. and Deshpande, V.V., 1998, “Molecular and biotechnological aspects of microbial protease”, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Vol. 62, pp. 597-635

Rick, W. and Stegbauer, H.P., 1974, "amylase measurement of reducing group", In **H.V. Bergmeyer (ed.), Methods of enzymatic analysis**, 2nd ed. Vol. 2, Academic press, New York.

Sadana, A., 1991, "**Biocatalysis Fundamental of Enzyme Deactivation kinetic**", Prentice Hall, New jersey, pp. 32-125.

Shah, P. M., Reddy, V.G., Banerjee, R., Ravindra Babu, P. and Kothari, I. L., 2005, "Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002)", **Process Biochemistry**, Vol. 40, pp. 445-451

Soccol, C.R., Iloki, I., Marin, B. and Raimbault, M., 1994, "Comparative production of alpha amylase glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* Strain in submerged and solid state fermentation", **Journal of Food science and Technology**, Vol 31, pp. 320-323

Singh, S., Pillay, B., Prior, B., 2000, " Thermal stability of β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol 26, pp.502-508

Szendefy, J., G. Szakacs and L. Christopher, 2006, "Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp", **Enzyme Microbial Tech.**, Vol. 39 pp. 1354-1360.

Ward, A., 1975, **Handbook of Enzyme Biotechnology**, Ellis Horwood Ltd, Chichester, pp.275

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ดัดแปลงมาจาก Rick and Stegbauer (1974)

สารเคมี

1. 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7
2. dinitrosalicylic acid (DNS)
3. สารละลายมาตรฐานน้ำตาล glucose เข้มข้น 50 mM
4. 1%(w/v) ของ soluble starch ใน 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7

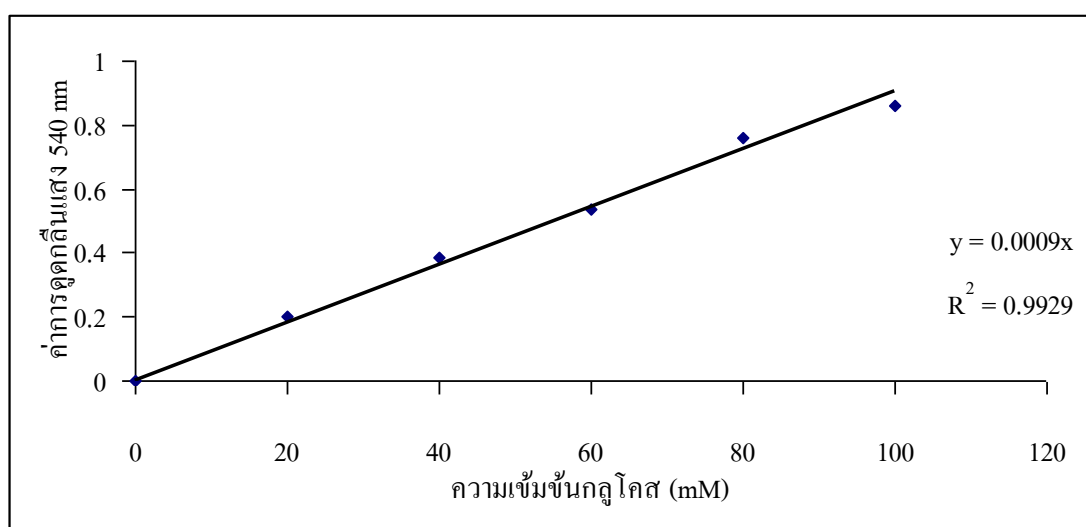
วิธีการ

1. ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่สารละลาย soluble starch ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร
3. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 นาที
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS ลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
5. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที
6. จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน
8. ทำหลอดควบคุมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เหมือนตัวอย่างและใส่ DNS ตามด้วย soluble starch จากนั้นทำตามวิธีการตั้งแต่ข้อ 5-7 ส่วนหลอด blank ให้ใช้สารละลาย buffer แทนสารละลายเอนไซม์ และ ทำตามวิธีการเดียวกับตัวอย่าง
9. ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล glucose จากนั้นทำตามตัวอย่างตั้งแต่ข้อ 1-7 คำนวณหาค่า slope ของกราฟมาตรฐาน

10. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าผลต่าง OD} \times \text{ความเจือจาง} \times 10 \times \text{ปริมาตรบัฟเฟอร์ในการสกัด}}{\text{(ยูนิต/กรัมเปียก)} \quad \text{Slope ของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม}}$$

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ยูนิต/กรัมเปียก)} \times 100}{\text{(ยูนิต/กรัมแห้ง)} \quad 100 - (\%) \text{ moisture}}$$



รูปที่ ก.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ดัดแปลงมาจาก Mandels และคณะ (1976)

สารเคมี

1. 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7
2. dinitrosalicylic acid (DNS)
3. สารละลายมาตรฐานน้ำตาล glucose เข้มข้น 50 mM
4. 2%(w/v) ของ Carboxymethyl Cellulase (CMC) ใน 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7

วิธีการ

1. ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่สารละลาย Carboxymethyl Cellulase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร
3. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 30 นาที
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS ลงในหลอดทดลองปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร
5. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที
6. จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน
8. ทำหลอดควบคุมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เหมือนตัวอย่างและใส่ DNS ตามด้วย Carboxymethyl Cellulase จากนั้นทำตามวิธีการตั้งแต่ข้อ 5-7 ส่วนหลอด blank ให้ใส่สารละลาย buffer แทนสารละลายเอนไซม์ และ ทำตามวิธีการเดียวกับตัวอย่าง
9. ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล glucose จากนั้นทำตามตัวอย่างตั้งแต่ข้อ 1-7 คำนวณหาค่า slope ของกราฟมาตรฐาน

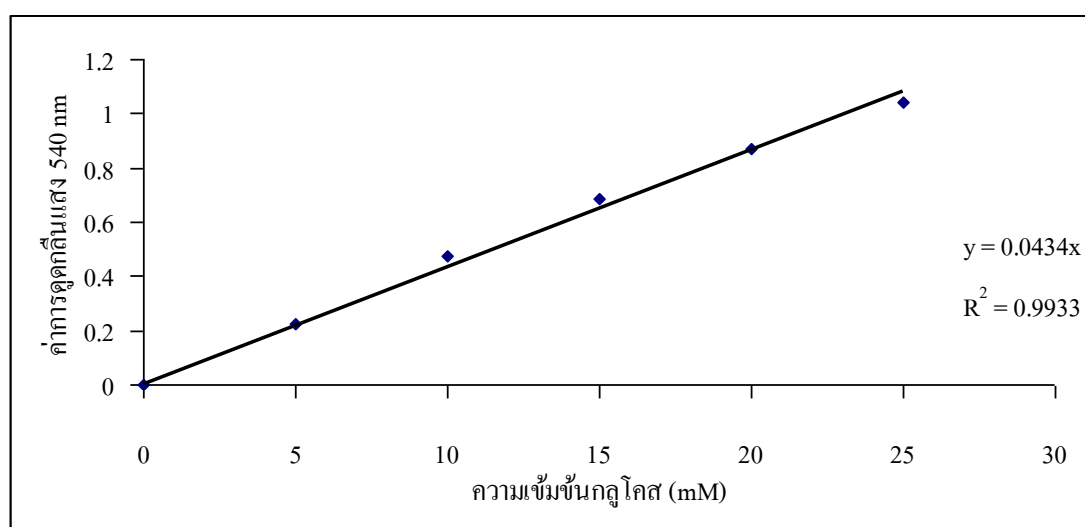
10. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ตามสูตรข้างล่าง

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าผลต่าง OD} \times \text{ความเจือจาง} \times 10 \times \text{ปริมาตรบัฟเฟอร์ในการสกัด}}{\text{Slope ของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม}}$$

(ยูนิต/กรัมเปียก)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส(ยูนิต/กรัมเปียก)} \times 100}{100 - (\%) \text{ moisture}}$$

(ยูนิต/กรัมแห้ง)



รูปที่ ก.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส (Xylanase activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสดัดแปลงมาจาก Bailey และคณะ (1974)

สารเคมี

1. 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7
2. dinitrosalicylic acid (DNS)
3. สารละลายมาตรฐานน้ำตาล xylose เข้มข้น 50 mM
4. 1%(w/v) ของ xylan ใน 0.2 M citrate phosphate buffer pH 7

วิธีการ

1. ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่สารละลาย xylan ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร
3. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 นาที
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
5. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที
6. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 rpm นาน 10 นาที
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ไปหาปริมาณ xylanase จากกราฟมาตรฐาน
8. ทำหลอดควบคุมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เหมือนตัวอย่างและใส่ DNS ตามด้วย xylan จากนั้นทำตามวิธีการตั้งแต่ข้อ 5-7 ส่วนหลอด blank ให้ใช้สารละลาย buffer แทนสารละลายเอนไซม์ และทำตามวิธีการเดียวกับตัวอย่าง
9. ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล xylose จากนั้นทำตามตัวอย่างตั้งแต่ข้อ 1-7 คำนวณหาค่า slope ของกราฟมาตรฐาน

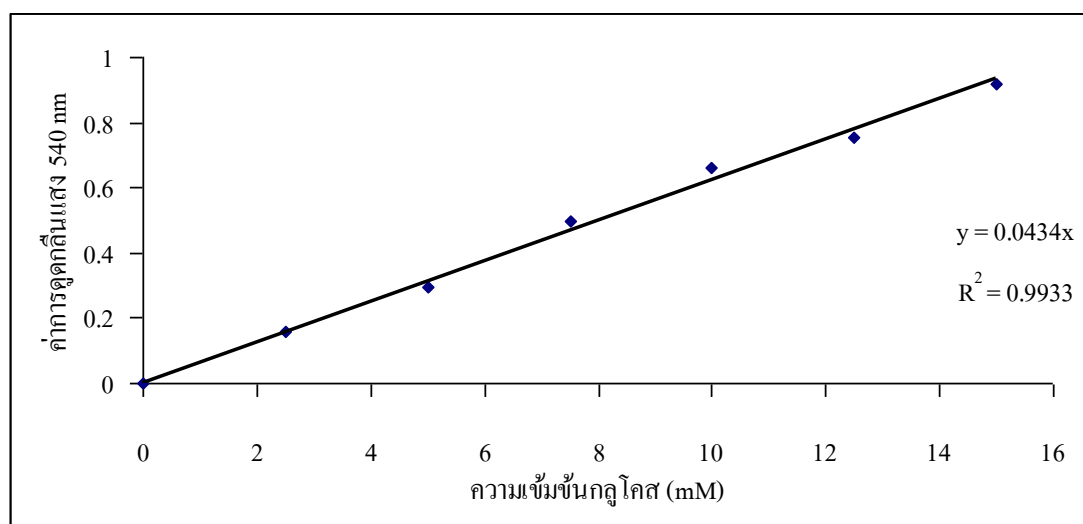
10. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไโซเลนเนส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าผลต่าง OD} \times \text{ความเจือจาง} \times 10 \times \text{ปริมาตรบัฟเฟอร์ในการสกัด}}{\text{Slope ของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม}}$$

(ยูนิต/กรัมเปียก)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไโซเลนเนส(ยูนิต/กรัมเปียก)} \times 100}{100 - (\% \text{ moisture})}$$

(ยูนิต/กรัมแห้ง)



รูปที่ ก.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไโซโลสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Anson (1938)

สารเคมี

1. Casein 1.5% ใน borate buffer pH 9
2. Trichloroacetic acid (TCA) 0.4 M
3. 0.4 M sodium carbonate (Na_2CO_3)

4. สารละลาย Folin เจือจางด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1

วิธีการ

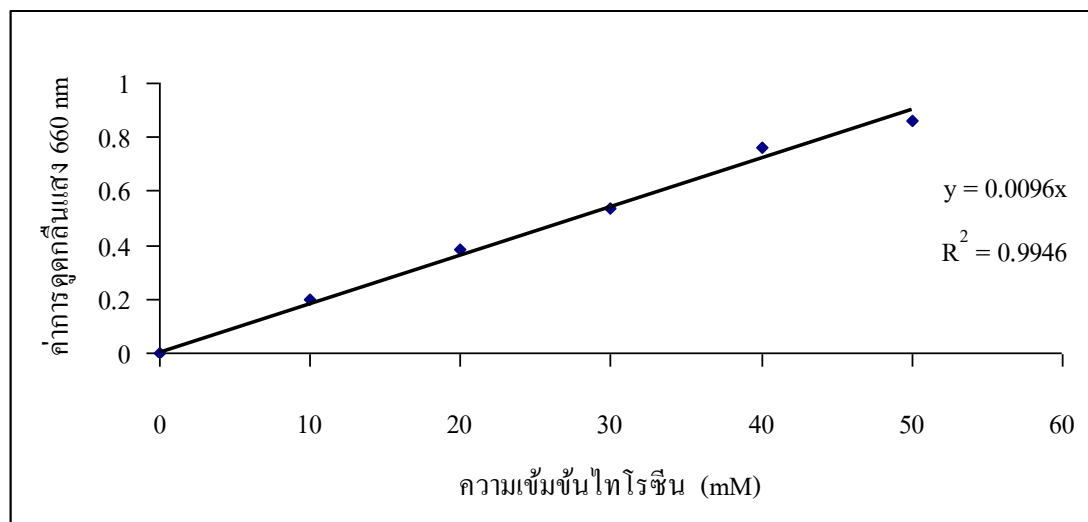
1. ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ใส่สารละลาย Casein ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร
3. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 นาที
4. ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม TCA ลงในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 40 °C นาน 10 นาที
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4800 rpm นาน 10 นาที
6. นำส่วนใสที่ได้มา 0.5 มิลลิลิตร มาเติม 0.4 M sodium carbonate (Na_2CO_3) 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมด้วย สารละลาย Folin 0.5 มิลลิลิตรเข้าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ไปหาปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐาน
8. ทำหลอดควบคุมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เหมือนตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลาย TCA 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย Casein นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C นาน 10 จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 5 ต่อไป
9. ทำกราฟมาตรฐานของ tyrosine จากนั้นทำตามตัวอย่างตั้งแต่ข้อ 1-7 คำนวณหาค่า slope ของกราฟมาตรฐาน
10. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าผลต่าง OD} \times \text{ความเจือจาง} \times 10 \times \text{ปริมาตรบัฟเฟอร์ในการสกัด}}{\text{Slope ของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม}}$$

(ยูนิต/กรัมเปียก)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ในไลแลนเนส(ยูนิต/กรัมเปียก)} \times 100}{100 - (\%) \text{ moisture}}$$

(ยูนิต/กรัมแห้ง)



รูปที่ ก.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข.1 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ชั่วโมงที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	50 °C	±sd	60 °C	±sd	70 °C	±sd	80 °C	±sd
4	0.99	0.03	0.99	0.02	0.99	0.02	0.99	0.03
8	1	0.07	1	0.01	1	0.02	1	0.01
12	0.95	0.06	0.95	0.04	0.95	0.03	0.95	0.02
16	0.86	0.02	0.86	0.01	0.86	0	0.86	0.01
20	0.9	0.02	0.9	0.02	0.9	0.04	0.9	0.01
24	0.9	0.01	0.9	0.07	0.9	0.01	0.9	0.01
28	0.89	0.05	0.89	0.02	0.89	0.1	0.89	0.02
32	0.9	0.05	0.9	0.04	0.9	0.09	0.9	0.02
36	0.9	0	0.9	0.01	0.9	0.09	0.9	0.07
40	0.88	0.03	0.88	0.04	0.88	0.03	0.88	0.09
44	0.85	0.02	0.85	0	0.85	0.05	0.85	0.04
48	0.86	0.01	0.86	0.02	0.86	0.03	0.86	0

ตารางที่ ข.2 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ชั่วโมงที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	50 °C	±sd	60 °C	±sd	70 °C	±sd	80 °C	±sd
4	1	0.06	0.97	0	0.82	0.01	0.72	0.01
8	0.95	0.03	0.88	0.03	0.77	0.02	0.64	0.01
12	0.93	0.	0.79	0.07	0.65	0.02	0.58	0.07
16	0.86	0.08	0.78	0.1	0.57	0.03	0.59	0.03
20	0.9	0.06	0.68	0.04	0.52	0	0.55	0.03
24	0.89	0.07	0.72	0	0.52	0.01	0.53	0
28	0.82	0.12	0.66	0.07	0.51	0.01	0.54	0.03
32	0.82	0.04	0.74	0.07	0.5	0.04	0.44	0.04
36	0.84	0.05	0.67	0.09	0.46	0.02	0.38	0.02
40	0.84	0.03	0.67	0.04	0.48	0.04	0.37	0.04
44	0.84	0.01	0.69	0.09	0.5	0.06	0.39	0.02
48	0.82	0.03	0.64	0.08	0.42	0	0.32	0.06

ตารางที่ ข.3 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนส

ชั่วโมงที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	50 °C	±sd	60 °C	±sd	70 °C	±sd	80 °C	±sd
4	0.94	0	0.93	0.07	0.8	0.07	0.74	0.05
8	0.96	0.08	0.89	0.01	0.77	0.01	0.7	0.01
12	0.88	0.02	0.87	0.02	0.65	0.02	0.65	0.03
16	0.87	0.02	0.75	0	0.65	0.01	0.58	0.03
20	0.88	0.04	0.69	0.04	0.6	0.04	0.52	0
24	0.84	0.09	0.73	0.05	0.52	0.05	0.44	0.04
28	0.77	0.03	0.72	0.04	0.46	0.04	0.35	0
32	0.82	0	0.73	0.04	0.47	0.04	0.38	0.02
36	0.74	0.02	0.69	0.03	0.47	0.03	0.41	0.02
40	0.8	0.04	0.7	0.04	0.46	0.04	0.38	0.03
44	0.8	0.05	0.68	0.01	0.44	0.01	0.38	0.02
48	0.8	0.02	0.62	0.03	0.43	0.03	0.34	0.04

ตารางที่ ข.4 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ชั่วโมงที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	50 °C	±sd	60 °C	±sd	70 °C	±sd	80 °C	±sd
4	0.99	0.02	0.89	0	0.84	0.08	0.78	0.01
8	1	0.01	0.79	0.01	0.75	0.03	0.66	0.03
12	0.95	0.11	0.76	0.02	0.64	0.01	0.62	0.03
16	0.91	0.11	0.74	0.01	0.65	0.04	0.61	0.03
20	0.93	0.02	0.65	0.04	0.55	0.08	0.52	0.01
24	0.93	0.01	0.66	0.04	0.59	0.09	0.39	0.05
28	0.85	0.05	0.71	0.07	0.54	0.08	0.36	0.02
32	0.87	0.07	0.71	0.04	0.46	0.04	0.42	0.01
36	0.78	0	0.7	0.02	0.41	0	0.35	0.07
40	0.81	0	0.58	0.06	0.44	0.09	0.28	0.06
44	0.84	0.01	0.55	0.02	0.3	0.07	0.34	0.05
48	0.78	0.01	0.52	0.02	0.34	0.06	0.28	0.05

ตารางที่ ข.5 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	4 °C	±sd	25 °C	±sd	30 °C	±sd	37 °C	±sd
15	0.93	0	0.97	0.04	0.91	0.01	0.92	0
30	0.86	0.02	0.87	0.1	0.92	0.02	0.9	0
45	0.88	0	0.82	0.06	0.85	0.09	0.82	0.01
60	0.93	0.03	0.92	0.04	0.86	0.02	0.86	0
75	0.9	0	0.88	0.08	0.84	0.06	0.85	0
90	0.89	0	0.87	0.09	0.89	0.04	0.75	0.02
105	0.74	0	0.81	0.04	0.88	0.01	0.83	0.01
120	0.77	0	0.78	0.03	0.76	0.06	0.74	0.01
135	0.75	0	0.76	0.03	0.8	0.04	0.79	0

ตารางที่ ข.6 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	4 °C	±sd	25 °C	±sd	30 °C	±sd	37 °C	±sd
15	0.94	0.06	0.94	0.06	0.89	0.07	0.9	0.03
30	0.81	0.02	0.9	0.09	0.94	0.05	0.79	0.06
45	0.84	0.09	0.87	0.02	0.86	0.11	0.84	0.04
60	0.83	0.1	0.85	0.09	0.85	0.09	0.83	0.01
75	0.88	0.01	0.86	0.11	0.86	0.03	0.82	0.03
90	0.85	0.05	0.78	0.08	0.78	0.03	0.82	0.1
105	0.83	0	0.88	0.05	0.9	0.03	0.78	0.07
120	0.84	0.1	0.85	0.06	0.8	0.09	0.82	0.05
135	0.81	0.08	0.78	0.03	0.79	0.07	0.75	0.01

ตารางที่ ข.7 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซเลนเนส

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	4 °C	±sd	25 °C	±sd	30 °C	±sd	37 °C	±sd
15	0.96	0.0	0.95	0.04	0.89	0.05	0.89	0.05
30	0.84	0.0/	0.86	0.04	0.88	0.03	0.88	0.03
45	0.8	0.08	0.75	0.04	0.87	0.1	0.87	0.1
60	0.78	0.02	0.76	0.01	0.83	0.04	0.83	0.04
75	0.76	0.07	0.75	0.04	0.88	0.04	0.88	0.04
90	0.79	0.05	0.79	0.04	0.8	0.05	0.8	0.05
105	0.79	0.1	0.77	0.03	0.76	0.07	0.76	0.07
120	0.73	0.08	0.78	0.03	0.76	0.04	0.76	0.04
135	0.64	0.07	0.74	0	0.75	0.07	0.75	0.07

ตารางที่ ข.8 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

วันที่	กิจกรรมของเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ / กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น)							
	4 °C	±sd	25 °C	±sd	30 °C	±sd	37 °C	±sd
15	0.92	0.04	0.94	0.05	0.92	0.02	0.96	0.02
30	0.92	0.01	0.91	0.07	0.84	0.1	0.94	0.03
45	0.82	0.06	0.96	0.01	0.87	0.04	0.95	0.08
60	0.92	0.04	0.94	0	0.86	0.05	0.85	0.06
75	0.82	0.04	0.78	0.07	0.8	0.01	0.87	0.03
90	0.88	0.02	0.86	0.03	0.85	0.06	0.82	0.03
105	0.8	0.01	0.76	0	0.87	0.02	0.81	0.07
120	0.76	0.04	0.8	0.05	0.85	0.03	0.87	0.06
135	0.8	0.03	0.76	0.01	0.82	0.04	0.82	0.02

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร.อหันธ์ ทองทา

Name : **Anan Tongta**

Address : 60/5 Moo 3, Srikan, Donmuang
Bangkok 10210, Tel. 02-566-1452

Office : Division of Biotechnology
School of Bioresources and Technology
King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT)
83 Moo 8, Thakham, Bangkhuntian, Bangkok 10150, Thailand
Tel. 02-452-3456 Ext: 4064, **Fax** 02-4279-623, 452-3455,
e-mail : anan.ton@kmutt.ac.th
e-mail : a_tongta@yahoo.com

Academic Background :

1994 - 1995 Ph.D. (Chemical Engineering)
University of Missouri-Rolla, Rolla, Missouri, USA
Thesis Title: Synthesis of Anion Exchange Adsorbent Particles by Surface
Functionalization of Polystyrene Divinylbenzene Based Spherical Porous
matrices

1992 - 1993 M.S. (Chemical Engineering)
University of Missouri-Rolla, Rolla, Missouri, USA
Thesis Title: Experimental and Theoretical Study of the Adsorption of Alpha
Chymotrypsinogen A and Ribonuclease A onto Hydrophobic Porous
Adsorbent Particles

1985 - 1989 B.S. (Chemical Engineering)
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Professional Experience :

Apr 1989 - Jul 1990:	Analyst and Engineer at Bangchak Petroleum Co., Ltd. Bangkok, Thailand.
Jan 1994 - Dec 1995:	Research Assistant, University of Missouri-Rolla, Rolla, Missouri, USA.
Feb 2000 - Nov 2000:	Advanced Training in Industrial Biotechnology, Carl Duisberg Gesellschaft e.V., Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung (German Research Center for Biotechnology), Braunschweig, Germany.
Dec 2000 - Mar 2001:	Research Fellowship, Research Center of Bioprocess Engineering, University of Applied Science Fachhochschule Hamburg, Hamburg, Germany.
Feb 1996 – May 2001:	Lecturer, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology King Mongkut's University of Technology Thonburi.
April 2006 – April 2007	Visiting Assistant Professor, Biological Process Development Facility, University of Nebraska Lincoln, USA
May 2001 – present:	Assistant Professor, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Funded Research Project Final Reports

1. **A. Tongta**, A Mathematical Model of an Amperometric Enzyme Biosensor for the Determination of Glucose Concentration, submitted to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, August 1997.
2. Desai S.G, **Tongta A**, Yompakdee C., Process Modeling, Simulation, and Control of Bioprocess: Application for Baker's Yeast Production and Inducer Controlled Regulation of Protein Production from *Saccharomyces cerevisiae*, submitted to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA),

Thailand, September 1998.

3. **A. Tongta** and S. Dit-U-dompo, Mathematical Modeling of Heat Generated from Banana Respiration, submitted to National Energy Policy Office (NEPO), January 2000.
4. M. Nopharatana, J. Pimsaman, **A. Tongta**, Development of Solid State Fermentation using Rotating Drum Bioreactor submitted to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, September 2003.

Journal Papers

A. Tongta, A.I. Liapis, D.J.Siehr, Equilibrium and Kinetic Parameters of the Adsorption of Alpha-Chymotrypsinogen A onto Hydrophobic Porous Adsorbent Particles, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 21-29.

A.I. Liapis, Y. Xu, O.K. Crosser, and A. Tongta, "Perfusion Chromatography": The Effects of Intra-Particle Convective Velocity and Microsphere Size on Column Performance, *J. Chromatogr. A*, 702 (1995) 45-57

A.I. Liapis, A. Tongta, and O.K. Crosser. Finite Bath Affinity Adsorption of Adsorbates into Spherical Porous Particles: Parameter Estimation in the Laplace Transform Domain, Accepted for Publication in *Mathematical Modelling and Scientific Computing*, September, 1995.

A. Tongta, A.I. Liapis, and S. Hagen, Synthesis of Anion Exchange Adsorbent Particles by Surface Functionalization of Polystyrene-Divinylbenzene Based Spherical Porous Matrices, *Separations Technology*, 6 (1996) 77-89.

M. Somasundrum, A. Tongta, M. Tanticharoen, and K. Kirtikara, A Kinetic Model for the Reduction of Enzyme-generated H₂O₂ at a Metal-dispersed Conducting Polymer Film, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 440 (1997) 259-264

Michell, D.A., Tongta, A., Stuart, D.M., and Krieger, N., 2002, "The Potential for Establishment of Axial Temperature Profiles during Solid-State Fermentation in Rotating Drum Bioreactors", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 80, No. 1, pp. 114-122.

Anan Tongta. Software Sensor for Monitoring of Bioreactor, accepted for publication in Thai Journal of Biotechnology.

Anan Tongta, Montira Nopharatana, Sirirat Saartrat, Monthon Sukumprasertsri. Production of Feed Supplement from Soy Bean Pulp by *Aspergillus oryzae*, accepted for publication in Thai Journal of Biotechnology.

A. Tongta, M. Nopharatana, W. Chanatrutipun, and S. Rakmae. Production of Amylase and Protease by Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae* Using Tray and Pilot Scale Rotating Drum Bioreactor, submitted for publication.

Yanee Srimarut, Anan Tongta, Montira Nopharatana, Thitapha Smitinont, Ruud Valyasevi. Modeling the Effect of Temperature on Growth and Substrate Utilization of *Lactobacillus plantarum* in Simulated Thai Fermented Sausage, submitted for publication.

Scientific Publication/Conference Proceeding

Chieplaem, N., Waiprib, Y., Tongta, A., Boonvanich, V., and Sawangwong, P. 2006. Emulsification of soybean oil by chitosan with different deacetylation degree and molecular weight. In Kim, S.-K., No.H.K., and Park, R.-D.(Eds), Advances in Chitin Science and Technology: Proceeding of the 7th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Bexco, Busan, Korea, 23-27 April. p.399-401.

Rakhansaeng, P., Waiprib, Y., Tongta, A., and Sawangwong, P. 2006. Reduction of suspended solids from hard tofu processing wastewater by chitosan with different deacetylation degree. In Kim, S.-K., No.H.K., and Park, R.-D.(Eds), Advances in Chitin Science and Technology: Proceeding of the 7th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Bexco, Busan, Korea, 23-27 April. p.482-484.

Rakhansaeng, P., Waiprib, Y., Tongta, A., and Sawangwong, P. 2006. Reduction of suspended solids from hard tofu processing wastewater by chitosan with molecular weight. In Kim, S.-K., No.H.K., and Park, R.-D.(Eds), Advances in Chitin Science and Technology: Proceeding of the 7th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. Bexco, Busan, Korea, 23-27 April. p.485-487.

Waiprib, Y., Pinthongkam, V., and Tongta, A. 2005. Inhibition of *Escherichia coli* by chitooligosaccharide mixture prepared from acid hydrolysis of chitin and chitosan. Proceeding of the

7th Agro-Industrial Conference (CDROM). Advancing food technology: Bringing Thailand into the world's kitchen. 22-24 June. BITEC, Bangkok. Book of Abstract. p.80.

Waiprib, Y., Sriprapatana, P., and Tongta, A. 2005. Inhibition of *Escherichia coli* by chitooligosaccharide mixture prepared from food enzymes. Proceeding of the 7th Agro-Industrial Conference (CDROM). Advancing food technology: Bringing Thailand into the world's kitchen. 22-24 June. BITEC, Bangkok. Book of Abstract. p.79.

Chieplaem, N., Waiprib, Y., Tongta, A., and Sawangwong, P. 2004. Control of chitosan deacetylation degree by combined effects of deacetylation temperature, number of repeated batch, and time. Proceeding of the 30th The Congress on Science and Technology of Thailand (CDROM). 19-21 October. Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, Bangkok. Book of Abstract. p.238.

Kantahan, C., Tongta, A., Pimsamarn, J., Nopharatana, M., and Waiprib, Y. 2004. Effect of chitosan coating on storability of coated tangerine orange. Proceeding of the 30th The Congress on Science and Technology of Thailand (CDROM). 19-21 October. Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, Bangkok. Book of Abstract. pp.238-239.

Jirapattarasakul, I., Tongta A., and Kanlayanarat S., 2003, "Effects of Heat Treatment on the Respiration of Mango 'Nam Dok Mai'", APEC Symposium on Postharvest Handling System, September 1-3, Radisson Hotel, Bangkok, Thailand.

Aiumsubtub, A., Poomputsa, K., Tongta, A., Waiprib, Y., and Mekvichitsaeng, P. 2003. Kinetic study of recombinant Dengue viral (NS1) protein synthesis by insect cell culture. Book of Abstracts. BioThailand: Technology for life. 17-20 July. Chonburi. pp. 265.

Phowsrisornjitt, W., Waiprib, Y., and Tongta, A., 2002. Comparison of Degree of Deacetylation of Chitosan Produced by Batch and Repeated Batch Experiments. The 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition, March 13-15, Bangkok, p. 94.

Phankrut, V., Tongta, A., Pimsamare, J. and Nopharatana, M. 2002. Prediction of weight loss of chitosan coated tangerine oranges. Proceeding of the 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition, Bangkok, Thailand, March 13-15.

Charudomrongsak, P., Waiprib Y., and Tongta, A. 2002. Effects of Deacetylation Conditions on the Viscosity of Chitosan Products. . Proceeding of the 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. 13-15 March, Emerald Hotel, Bangkok.

Jirawongsaroj, K., Tongta, A., Nopharatana, M. and Pimsamarn, J. 2001. Modeling heat transfer during solid state fermentation in rotating drum bioreactor: Paramater estimation. BioThailand 2001, 7-10 November, Bangkok, Thailand.

Chungchamroenkit, P., and Tongta, A. 2001. A Dynamic Model for the Design of Low-grade Copper Sulfide Heap Bioleaching 11th Chemical Engineering Symposium, Suranaree University, 9-10 November.

Chanatrytipun, W., Nopharatana, M., Pimsamarn, J and. Tongta, A. 2001. Effect of substrate moisture content on kinetics of growth and protease production from *Aspergillus oryzae* by solid state fermentation. BioThailand 2001, 7-10 November, Bangkok, Thailand.

Maneerat, C., Tongta, A., Kanlayanarat, S., Wongs-Aree, C. 1999. Modeling of Respiration Rate and Modified Atmosphere Packaging of Fresh Banana, a poster presentation at The 9th Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Suranaree University of Technology, 19-22 November. Thailand.

Yompakdee, C., Tongta, A., and Jeankarakul, O.1999. Expression of Gene Encoded Dengue Enveloped Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, 15-18 November.

Yompakdee, C., Tongta, A., and Jeankarakul, O. 1999. Dynamic Behavior of Recombinant Protein Production under Inorganic Phosphate Controlled Expression by *Saccharomyces cerevisiae*, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and the 11th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, November 15-18, Phuket, Thailand.

Tongta, A. and Kongrakaranchai, N. 1999, Transient Responses of A Biosensor with Conducting Film Containing Metal Microparticles, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, November 15-18.

Srikrajib, S., Tongta, A., and Thiravetyan, P. 1999. Biosorption Performance of the Dry Biomass of *Sargassum polycystum*, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18

November 1999. and the 11th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, November 15-18, Phuket, Thailand.

Srikrajib, S., Tongta, A., Thiravetyan, P., and Sivaborvorn, K. 1999. Cadmium Removal by the Dry Biomass of *Sargassum polycystum*, Biobydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century, Proceeding of the International Biobydrometallurgy Symposium IBS'99, San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain, 20-23 June.

Tongta, A., Yompakdee, C., Sunil, S.G., and Jeankarakul, O. 1998. A Mathematical Model for the Derepression of Acid Phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* under Inorganic Phosphate Regulation, an oral presentation at the 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The 1998 Annual Meeting of the National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, 25-27 November.

Chongchittapiban, S., Tongta, A., and Yompakdee, C. 1998. Application of a Cell Cycling Model to the Quality Improvement of Baker's Yeast, an oral presentation at the 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and The Annual Meeting of the National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, 25-27 November.

Arunchoktaworn, P., Tongta, A., and Tanticharoen, M. 1997. A Mathematical Model for the Steady-state and Transient Responses, a poster presentation at The 9th Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Suranaree University of Technology, 19-22 November, Thailand.

Homtong, T., Chanasattru, W., Thiravetyan, P., Tongta, A., and Tanticharoen, M. 1997. Recovery of Copper from Chalcocite Ores by *T. ferrooxidans*, Conference Proceedings of International Biohydrometallurgy Symposium IBS97 BIOMINE 97, 4-6 August, Sydney, Australia.

Maneerat, C., Tongta, A., Kanlayanarat, S., Wongs-Aree, C. 1997. A Transient Model to Predict O₂ and CO₂ Concentrations in Modified-atmosphere Packaging of Banana at Various Temperatures, Proceeding of the Seventh International Controlled Atmosphere Research Conference, July 13-18, Davis, California, USA.

วศินา ทาเขียว, จินดารัตน์ พิมพ์สมาน, มณฑิรา นพรัตน์ และอนันต์ ทองทา, 2002, "Diffusion of Salt in Fish during Salting Process", The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology,

"Biotechnology for Better Living in the New Economy", 12-15 พฤศจิกายน, โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด, จ.ขอนแก่น, หน้า 207.

วราภรณ์ พันธุ์ครุฑ, จินดารัตน์ พิมพ์สมาน, มณฑิรา นพรัตน์ และอนันต์ ทองทา, 2002, "Study of the Coated Tangerines with Different Coating for Storage Prolonging", The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Biotechnology for Better Living in the New Economy", 12-15 พฤศจิกายน, โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด, จ.ขอนแก่น, หน้า 210.

คงพันธ์ จีรวงศาโรจน์, อนันต์ ทองทา, มณฑิรา นพรัตน์ และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน, 2544, "Modeling Heat Transfer during Solid State Fermentation in Rotating Drum Bioreactor: Parameter Estimation", BioThailand (The 13th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology), 7-10 พฤศจิกายน, ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์, กรุงเทพฯ, หน้า 360.

วาฑิต ชนสรุติพันธ์, มณฑิรา นพรัตน์, จินดารัตน์ พิมพ์สมาน และอนันต์ ทองทา, 2544, "Effect of Substrate Moisture Content on Kinetics of Growth and Protease Production from *Aspergillus oryzae* by Solid State Fermentation", BioThailand (The 13th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology), 7-10 พฤศจิกายน, ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์, กรุงเทพฯ, หน้า 361.

ผศ. ดร. นางมณฑิรา นพรัตน์

ชื่อ (ภาษาไทย) นางมณฑิรา นพรัตน์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Montira Nopharatana

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
91 ถนนประชาอุทิศ บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140
โทรศัพท์ 02-470-9245

ประวัติการศึกษา

1999	Ph. D. (Chemical Engineering) University of Queensland, Australia
1991	วท.ม (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1987	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
------	--

สาขาที่มีความชำนาญ วิศวกรรมอาหาร, Solid State Fermentation

Publications

- Jirawongsaroj, K., Tongta, A., **Nopharatana, M.** and Pimsamarn, J. 2001. Modeling heat transfer during solid state fermentation in rotating drum bioreactor: Parameter estimation. BioThailand 2001, 7-10 November, Bangkok, Thailand.
- Chanatrytipun, W., **Nopharatana, M.**, Pimsamarn, J and. Tongta, A. 2001. Effect of substrate moisture content on kinetics of growth and protease production from *Aspergillus oryzae* by solid state fermentation. BioThailand 2001, 7-10 November, Bangkok, Thailand.

- Duangjarat, W., Nontakhumjan, S., Niamkornburi, O., Vongsawasdi, P. and **Nopharatana, M.** 2002. Functional properties of chicken blood and plasme powder from microwave vacuum drying process. The 40th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand, Febuary 4-7. (in Thai).
- Phankrut, V., Tongta, A., Pimsaman, J. and **Nopharatana, M.** 2002. Prediction of weight loss of chitosan coated tangerine oranges. The 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition, Bangkok, Thailand, March 13-15.
- Vongsawasdi, P., **Nopharatana, M.**, Tangbumrunpong, D., Apinunjarupong, S. 2002. Production of instant fruit and vegetable juice by spray dryer and microwave-vacuum dryer. KMUTT Research and Development Journal 25(3), 257-279.
- Aichayawanich, S., **Nopharatana, M.** and Vongsawasdi, P. 2002. Chemical and physical properties of wet-milled and dry-milled rice flour. Proceeding of the International Conference in Food Processing Technology and Engineering, 11-13 December, AIT, Bangkok, Thailand.
- Vongsawadsi, P., **Nopharatana, M.**, Roengdaj, K., Phaphan, W. and Loetrungphanit, A. 2003. Physical properties of spray dried and reconstituted Soya milk. The 41th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand, Febuary 3-7. (in Thai).
- Vongsawadsi, P., **Nopharatana, M.**, Roengdaj, K., Phaphan, W. and Loetrungphanit, A. 2003. Physical properties of instant soya milk from milling method. The 5th Agro-Industry Conference, Bangkok, Thailand, May 30-31. (in Thai).
- Nopharatana, M.**, Mitchell, D.A. and Howes, T. 2003. Use of confocal microscopy to follow the development of penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* in an artificial solid-state fermentation system. Biotechnology and Bioengineering 81(4), 352-367.
- Vongsawasdi, P. and **Nopharatana, M.** 2003. Effect of chicken blood bad plasma powder on qualities of emulsion sausage. KMUTT Research and Development Journal 26(3), 257-279.
- Sanmueng, S., **Nopharatana, M.**, Siri wattanayothin, S. and Yoovidhya, T. 2003. Kinetics of carbondioxide production during steamed bun dough proofing process. 8th Asean Food Conference, 8-11 October, Hanoi, Vietnam.
- Kunanopparat, T., **Nopharatana, M.**, Siri wattanayoyhin, S. and Srichumpoung, W. 2003. Economic feasibility study and technology evaluation of the production of instant soymilk. Food 33(4), 299-307. (in Thai)

- P. Vongsawasdi, **Nopharatana, M.** and Nadchayangkul, K. 2003. Instant Soymilk Production by Spray Drying Foam Technique, Proceedings of the 3rd Asia Pacific Drying Conference, Sep.1-3, AIT, Bangkok, Thailand.
- Vongsawasdi, P., **Nopharatana, M.**, Suebsaisich, N. And Eksuwanjaroen, W. 2004. Effect of storage time on qualities of sol and fish ball from purple-spotted big eye fish (*Priacanthus tayenus*) stored in ice. The 42th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand, February 4-7. (in Thai).
- Pitaksuriyarat, S., Sae-evo, S., Sathianpattaratane, P., **Nopharatana, M.** and Vongsawasdi, P. 2004. Kinetics of gelatinization of rice. Proceeding of the 6th Agro-Industrial Conference, May 28-29, IMPACT, Bangkok, Thailand.
- Vongsawasdi, P, **Nopharatana, M.**, Hutinan, S., Kerdchana, S. and Tachaarmorn, T. 2004. Drying conditions of taro as affected on the physical, chemical and rheological properties of dry-milled taro flour. Proceeding of the 6th Agro-Industrial Conference, May 28-29, IMPACT, Bangkok, Thailand.
- Supareokthaweechai, N., Kakumyan, P., Siriwatanayothin, S., **Nopharatana, M.** and Ruenglertrpanyakul, W. 2004. Effect of processing parameters on residence time distribution of food particle in two-phase flow system. Proceeding of the 15th International Symposium on Transport Phenomena, May 9-13, Bangkok, Thailand.
- Suebsaisich, N., Vongsawasdi, P and **Nopharatana, M.** 2005. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on shelf life extension of minimally processed longans (*Dimocarpus Longan*, cv. e-dor). Proceeding of the 2nd International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering, January 11-13, Bangkok, Thailand.
- Vongsawasdi, P, **Nopharatana, M.** and Reongdaj, K. 2005. Effect of storage time on qualities of sol and fish balls from dorab wolf-herring stored in ice. Proceeding of the 2nd International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering, January 11-13, Bangkok, Thailand.
- Wuttisetarak, P., **Nopharatana, M.** and Vongsawasdi, P. 2005. Effect of chemicals and temperature on water adsorption and structure of soaked rice. Proceeding of the 2nd International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering, January 11-13, Bangkok, Thailand.
- Seekhiew, R., Siriwatanayotin, S., **Nopharatana, M.** and Chayawanich, N. 2005. Effect of magnetic field on the freezing rate of K-carrageenan gel. Proceeding of the 2nd International Conference

on Innovations in Food Processing Technology and Engineering, January 11-13, Bangkok, Thailand.

Asavasanti, S., Nopharatana, A. and **Nopharatana, M.** 2005. Growth mechanism of cassava pearl in batch drum granulator. Proceeding of the 2nd International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering, January 11-13, Bangkok, Thailand.

Narasuwan, O., Phokrachang, R., Sukphui, T., Ai-tang, R., **Nopharatana, M.** and Siriwattanayothin, S. 2005. Effect of tapioca starch and rice flour on qualities of traditional Thai rice cracker (Kao Kreab). Proceeding of the 7th Agro-Industry Conference, June 22-24, Bangkok, Thailand.

Kerdprom, M., limcharoenchat, P., Pimpaporn, P., **Nopharatana, M.** and Siriwattanayothin, S. 2005. Effect of magnetic field on the qualities of frozen chicken meat. Proceeding of the 7th Agro-Industry Conference, June 22-24, Bangkok, Thailand.

Vongsawasdi, P, **Nopharatana, M.**, Hutinan, S., Kerdchana, S. and Techasupamorn, T. 2005. Drying conditions of Taro as affected on the physical, chemical and rheological properties of wet-milled Taro flour. Proceeding of the 7th Agro-Industry Conference, June 22-24, Bangkok, Thailand.

Asavasanti, S., Nopharatana, A. and **Nopharatana, M.** 2005. Wet Granulation: A new approach in cassava pearl production. Food and Beverage Asia, June-July: 34-38.

ดร. พนิต กิจสุบรรณ

ชื่อ	(ไทย)	นายพนิต กิจสุบรรณ
	(อังกฤษ)	Panit Kitsubun
ตำแหน่ง		นักวิจัย 1
สังกัด		ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
โทรศัพท์		02 470 7580
Email		panit.kit@biotec.or.th
ประวัติการศึกษา		ปริญญาเอก (สาขาวิศวกรรมอาหาร) 2549 Technische Universitaet Muenchen, Munich, Germany. ปริญญาโท (สาขาวิศวกรรมอาหาร) 2546 Technische Universitaet Muenchen, Munich, Germany.
ประวัติการทำงาน		
2549 – ปัจจุบัน		นักวิจัย 1 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2549		นักวิจัย Lehrstuhl fuer Stroemungsmechanik Friedrich-Alexander Universitaet Erlangen-Nuernberg, Erlangen, Germany
2548 – 2549		รองหัวหน้าแผนก Numerical Simulation Lehrstuhl fuer Fluidmechanik und Prozessautomation Technische Universitaet Muenchen, Munich, Germany
2546 – 2549		ผู้ช่วยนักวิจัย Lehrstuhl fuer Fluidmechanik und Prozessautomation Technische Universitaet Muenchen, Munich, Germany
งานวิจัย		1. การทำโมเดลทางคณิตศาสตร์ในกระบวนการ Scale Up 2. การศึกษาการขยายขนาดการผลิตในกระบวนการหมักแบบแข็ง

3. การศึกษาการผลิตอาหารชีวภาพสำหรับสัตว์ในระดับต้นแบบ
4. การศึกษาการผลิตสาร Umami ด้วยกระบวนการหมักถั่วเหลืองในระดับต้นแบบ

รางวัลและความสำเร็จอื่นๆ

DAAD award for best foreign student 2003

ผลงานวิจัย

- Hartmann, C., Schuhholz, J.-P., **Kitsubun, P.**, Chapleau, N., Le Bail, A., Delgado, A. 2004. Experimental and numerical analysis of the thermofluidynamics in a high-pressure autoclave, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 399-411.
- Kilimann, K.V., **Kitsubun, P.**, Chapleau, N., Le Bail, A., Delgado, A., and Gänzle, M.G. and Hartmann, C. Simulation of heterogeneous pressure-temperature induced lethal and sublethal injury of *Lactococcus lactis* in a industrial 3.3-Litre-High-Pressure-Autoclave, *Biotechnology and Bioengineering* 94 (4): 655-666.
- Delgado A., Baars A., Kowalczyk W., Benning R., **Kitsubun P.** 2007. Towards adaptive strategies for high pressure bioprocesses, *High Pressure Research*, 27 (1) 7-16.
- Kitsubun, P.**, Hartmann, C., Delgado., A. 2004. Numerische Analyse von Prozessinhomogenitäten bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln, *Gesellschaft für Angewandte Mathematik und Mechanik (GAMM)*, Dresden, *Proceedings in Applied Mathematics and Mechanics (PAMM)*, WILEY-VCH Verlag Weinheim, 4(1), 486-487.
- Kitsubun, P.**, Hartmann, C., Delgado., A. 2005. Numerical Investigations of Process Heterogeneities during High Hydrostatic Pressure Treatment with Turbulent Inflow Conditions, *Gesellschaft für Angewandte Mathematik und Mechanik (GAMM)*, Luxembourg, *Proceedings in Applied Mathematics and Mechanics (PAMM)*, WILEY-VCH Verlag Weinheim, 5(1), 573-574.
- Diez, L., Zima, E., **Kitsubun, P.**, Hartmann, Ch., Delgado, A. 2005. Numerical Simulation of Granula Motion in Sequencing Batch Reactor (SBR). *Book of Abstracts, 11th Workshop on Two-Phase Flow Predictions.*
- Kitsubun, P.**, Hartmann, C., Delgado, A. 2004. Numerische Analyse von Prozessinhomogenitäten bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln. *GVC Fachausschuss Hochdruckverfahrenstechnik*, 4./5. Februar 2004, Karlsruhe.

- Kitsubun, P.,** Hartmann, C., Delgado, A. 2004. Numerische Analyse von Prozessinhomogenitäten bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln. Jahrestagung der Gesellschaft für Angewandte Mathematik (GAMM), Dresden, 21.-27.03.2004.
- Kitsubun, P.,** Hartmann, C., Delgado, A. 2004. Numerische Analyse von Prozessinhomogenitäten bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln. GVC Fachausschuss Computational Fluid Dynamics und Rheologie., Würzburg.
- Kitsubun, P.,** Hartmann, C., Delgado, A. 2004. Numerical Investigation of Process Heterogeneities During High Hydrostatic Pressure Treatment with Turbulent Inflow Conditions, 3rd International Conferences on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Rio de Janeiro, Brazil, 27.-30.9.2004.
- Kitsubun, P.,** Hartmann, C., Delgado, A. 2004., Numerische Untersuchungen von Prozessheterogenitäten während der Hochdruckbehandlung mit turbulenten Bedingungen“, Gemeinsames Statusseminar von BMBF-, DBU- und DFG -geförderten Forschungsprojekten „Hochdrucklebensmitteltechnologie und -bioverfahrenstechnik“, October 2004, TU München.
- Kitsubun, P.,** Hartmann, C., Delgado, A. 2005. Numerical Investigations of Process Heterogeneities during High Hydrostatic Pressure Treatment with Turbulent Inflow Conditions, Jahrestagung der Gesellschaft für Angewandte Mathematik (GAMM), Luxembourg, 28.03.-01.04.2005.
- Diez, L., Zima, E., **Kitsubun, P.,** Hartmann, Ch., Delgado, A. 2005. Numerical Simulation of Granula Motion in Sequencing Batch Reactor (SBR). 11th Workshop on Two-Phase Flow Predictions, Halle, 5.-8. April 2005.
- Kitsubun, P.,** Delgado, A. 2005. Numerical simulation of the process non-uniformity during high pressure treatment with turbulent inflow conditions. 1st European Congress on Life Science Process Technology, Nürnberg, 11.-13. October 2005.
- Kitsubun, P.,** Kilimann, K. V., Rauh, C., Delgado A. 2005. Experimental and numerical study of thermofluidodynamically induced lethal and sublethal injury of *Lactococcus lactis* in a medium scale high pressure autoclave, 1st International Symposium on Biothermodynamics, Frankfurt am Main, 16. – 17. February 2006.
- Delgado, A., Baars, A., Kowalczyk, W., **Kitsubun, P.** 2006. *Plenary lecture:* Towards adaptive strategies for high pressure bioprocesses, 44th European High Pressure Research Group (EHPRG 2006) International Conference, Prag, Czech republic, 4.-8.09.2006

นางสาวพงศ์พงา จางบัว

ชื่อ (ไทย) นางสาวพงศ์พงา จางบัว
 (อังกฤษ) Pongpanga Jangbua
 ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย
 สถานที่ติดต่อ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150
 โทรศัพท์ 0-2470-7560 โทรสาร 0-2452-3455
 E-mail pong pangaj@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
2542	ตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	ชีววิทยา	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2547	โท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)	จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเจริญและการผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 จากแป้งมันสำปะหลัง
 โดยวิธีการหมักแบบครึ่งคราว

การเสนอผลงาน

1. **Pongpa-nga Jangbua**, Anan Tongta, Montira Nopharatana, Kobkul Laoteng and Supapon Cheevadhanarak. 2005. γ -Linolenic Acid Production by Solid State Fermentation of *Mucor rouxii* Using Soy Bean Pulp. BioThailand 2005: Challenges in the 21 Century, The Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 2-5 November 2005.