รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาผลของอุณหภูมิของการเก็บและการอบแห้งต่อความคงตัวของเอนไซม์หัวในอาหารสัตว์ที่ผลิตโดยการหมักบนอาหารแข็ง

Effect of drying and storage temperature on the stability of enzymes in dried animal feed produced from solid state fermentation process

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. อนันต์ ทองทา

คณะทรัพยากรชีวภาพ และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
49 ถนนบางขุนเทียนชายทะเล 25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีวิทยาเขตบางขุนเทียน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วง ขอบคุณแหล่งทุนที่ทำให้งานประสบความสำเร็จ และขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ ทองทา ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำจนประสบความสำเร็จในที่สุด

สารบัญ

1. บทนำ 1

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ 2

2.1 ขอบเขตของงานวิจัย 2

2.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

2.3.1 กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-State Fermentation, SSF) 3

2.4 เอนไซม์จากการหมักแบบอาหารแข็ง 5

2.4.1 เอนไซม์อะไมเลส 5

2.4.2 เอนไซม์เซลลูเลส 6

2.4.3 เอนไซม์ไซแลนเนส 7

2.4.4 เอนไซม์โปรตีเอส 7

2.5 การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ 8

2.6 จลน์พลศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ 9

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 11

3.1 สารเคมี 11

3.2 การเตรียมจุลินทรีย์ในการทดลอง 11

3.3 วิธีการทดลอง 11

3.3.1 กระบวนการหมัก 11

3.3.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบแห้งของหัวอาหารสัตว์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 12

3.3.3 ผลของสภาวะในการเก็บรักษาและระยะเวลาในการเก็บรักษาของหัวอาหารสัตว์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ 12

3.4 การสกัดเอนไซม์ 12

3.5 วิธีการวิเคราะห์ 12

3.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 12

3.5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 13

3.5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 13

3.5.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส 13

สารบัญ (ต่อ)

3.6 การพัฒนาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ 13

3.6.1 แบบจำลองปฏิกิริยาอันดับศูนย์ 13

3.6.2 แบบจำลองปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง 14

3.6.3 แบบจำลองแบบอนุกรม 14

4. ผลการทดลอง 15

4.1 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งปริมาณความชื้นของหัวอาหารสัตว์ 15

4.2 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ 15

4.3 การพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างการอบแห้ง 19

4.4 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ 21

4.5 การวิเคราะห์แบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่มีผลต่อการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ 25

5. สรุปผลการทดลอง 27

6. เอกสารอ้างอิง 28

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี 33

ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง 42

ประวัติผู้วิจัย 49

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C, 60°C, 70°C และ 80°C 15

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ ( ) 50°C, ( ) 60°C,( ) 70°C และ( )80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 16

รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ ( ) 50°C, ( ) 60°C,( ) 70°C และ ( )80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 17

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ ( ) 50°C, (◆) 60°C,( ) 70°C และ ( )80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 18

รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสกับระยะเวลาในการอบแห้งที่อุณหภูมิ ( ) 50°C, (◆) 60°C,( ) 70°C,( )80°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 19

รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ( ) 4°C, (◆) 25°C,( ) 30°C,( )37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 22

รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ( ) 4°C, (◆) 25°C,(▲) 30°C,(●)37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 23

รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ( ) 4°C, ( ) 25°C,( ) 30°C,( )37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 23

รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสกับระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ( ) 4°C, ( ) 25°C,( ) 30°C,( )37°C จากการทดลองเทียบกับการคำนวณโดยใช้แบบจำลองแบบอนุกรม 24

รูปที่ ก.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm 35

รูปที่ ก.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm 37

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ ก.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสต่อค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 nm 39

รูปที่ ก.4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนต่อค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 nm 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบการหมักแบบอาหารแข็ง และอาหารเหลว 3

ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่ผลิตจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง 4

ตารางที่ 3 การใช้ *A.oryzae* ในการผลิตเอนไซม์โดยการใช้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง 5

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการอบแห้ง 20

ตารางที่ 5 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการอบแห้ง ตามแบบจำลองแบบอนุกรม 21

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการสูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษา 25

ตารางที่ 7 ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ ของแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเสื่อมสภาพ ของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษา ตามแบบจำลองแบบอนุกรม 26

ตารางที่ ข.1 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 43

ตารางที่ ข.2 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 44

ตารางที่ ข.3 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 45

ตารางที่ ข.4 ผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส 46

ตารางที่ ข.5 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 47

ตารางที่ ข.6 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 47

ตารางที่ ข.7 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส 48

ตารางที่ ข.8 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส 48

ผู้รับผิดชอบและหน่วยงาน

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาษาไทย นายอนันต์ ทองทา

ภาษาอังกฤษ Mr. Anan Tongta

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 40%

คณะผู้วิจัย

ภาษาไทย นางมณฑิรา นพรัตน์

ภาษาอังกฤษ Mrs. Montira Nopharatana

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

ภาษาไทย นายพนิต กิจสุบรรณ

ภาษาอังกฤษ Mr. Panit Kitsubun

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

ภาษาไทย นางสาวพงศ์พงา จางบัว

ภาษาอังกฤษ Miss Pongpanga Jangbua

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %

คณะทรัพยากรชีวภาพ และเทคโนโลยี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

49 ถนนบางขุนเทียนชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

หมายเลขโทรศัพท์ (02)-470 7564

บทคัดย่อ

การผลิตหัวอาหารสัตว์ที่มีเอนไซม์ต่างๆอยู่ หลังจากการหมักแล้วจะต้องนำผลิตภัณฑ์ไปอบแห้งเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยอุณหภูมิในการทำแห้งสามารถทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้จะมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่คงเหลือ นอกจากนี้ในการผลิตเพื่อจำหน่ายนั้นจะต้องมีการผลิตภัณฑ์เก็บไว้ เพื่อรอจำหน่าย ซึ่งสภาวะในการเก็บรักษา จะมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ต่างๆได้ ในโครงการนี้เป็นการทดสอบผลของอุณหภูมิในการทำแห้งต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในหัวอาหารสัตว์ 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 พบว่าแบบจำลองอนุกรมสามารถทำให้เส้นกราฟที่สอดคล้องกับผลการทดลอง มากกว่าแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์แบบอื่นๆ โดยค่าคงที่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ (k_1 และ k_2) แปรผันตามอุณหภูมิ โดยผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จะมีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าใกล้เคียงกันโดยจะเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 80-90% เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 135 วัน เมื่อวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษาพบว่าการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการเก็บรักษาสามารถทำนายได้ด้วยแบบจำลองแบบอนุกรม

Abstract

In the process of enzyme production for animal feed, crude enzymes have to be dried in the oven after the enzyme fermentation. Temperature in the oven will affect the activity of the enzymes. Also, the enzymes have to be kept for a certain amount of time before selling to customers. The conditions in the storage area are so important to the stability of the enzymes. In this project, the keeping temperature is set to affect the stability of the enzymes. It was found that dying of enzyme at 50 C for 24 hours will keep the highest enzyme activities compare with other temperatures. When using 3 mathematical models to predict the activities of enzymes, it was found that first order kinetic reaction in serial fitted best to the experimental data compare with another two models. Enzymes also lost the activities along with the storage times. The activities of enzymes were at 80-90% of the initial values after 135 days of storage.