

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

มีรายงานการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสัณฐานวิทยาของรา เช่น จำนวนหัวเชื้อ ปริมาณก๊าซ ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ อัตราการกวน และค่า pH ในอาหารระหว่างการเลี้ยงจุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะสัณฐานวิทยาของรา เช่น การเป็นเพลเล็ท หรือเส้นใยระหว่างการเลี้ยง พบว่า มีผลต่อปริมาณการผลิตผลิตภัณฑ์โดยจุลินทรีย์

2.1 จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้น

พบว่ามีผลต่อสัณฐานวิทยาของราเส้นใย ในกระบวนการหมัก สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง เกี่ยวกับการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น คือ จำนวน, ชนิดของหัวเชื้อ (เป็นสปอร์ หรือเส้นใย) และอายุของเชื้อ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการพัฒนา และการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของรา ในกระบวนการหมัก (Papagianni and Moo-young, 2002) ซึ่งมีรายงานดังนี้

Domingue และคณะ (2000) รายงานว่าในการเลี้ยง *Trichoderma reesei* Rut C-30 ในอาหารที่ไม่มีการเติม tween 80 เมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นต่ำ (10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) จะมีการเจริญ เป็นเพลเล็ท ขนาดใหญ่ แต่เมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นสูง (10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) จะมีการเจริญเป็น flocs ขนาดเล็กและ สามารถผลิต soluble protein ได้สูงกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นต่ำ

Van Suijdam และคณะ (1980) พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *A. niger* สามารถเจริญเป็นเพลเล็ท เมื่อใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับที่ Johansen และคณะ (1998) รายงานว่าในการเลี้ยง *A. awamori* การใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นต่ำ (10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ทำให้ ราเจริญเป็นแบบเส้นใย ซึ่งมีกิ่งก้านและมีปลายเส้นใยมาก ขณะที่การใช้จำนวน สปอร์เริ่มต้นสูง (10^5 และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) พบเส้นใยขนาดสั้น ๆ และมีจำนวนปลายเส้นใยน้อยกว่า ทำให้มีการปลดปล่อยเอ็นไซม์ออกมาน้อยกว่าการใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ต่ำกว่า

Jianfeng-Xu และคณะ (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นของรา *A. niger* AB4 ต่อลักษณะการเจริญ และการผลิต heterologous protein โดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า การใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รมีการเจริญ เป็นเพลเล็ทขนาด 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กที่สุด และได้ค่า กิจกรรมเอ็นไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อ 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบการเจริญของราที่เป็นเพลเล็ทขนาดใหญ่กว่า โดยมีขนาด 3.9, 3.7, 3.6 และ 2.3 มิลลิเมตร และให้ค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ 120, 125, 154 และ 148 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า การเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อในรูปของสปอร์เพิ่มขึ้นทำให้ได้ ลักษณะการเจริญเป็นเพลเล็ทที่มีขนาดเล็กลง เช่นเดียวกับที่ Amanullah และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นต่อ ลักษณะการเจริญ ของรา *A. oryzae* พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงราดังกล่าว โดยใช้จำนวนหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ (conidiospores) เริ่มต้นต่ำ การเจริญของรา

จะเป็นแบบเพลเลีย ที่มีขนาดใหญ่ ในขณะที่การใช้ จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นมากขึ้น การเจริญของรา จะเป็น แบบเพลเลียที่มีขนาดเล็กลง

Liang-Xiang Du และคณะ (2003) ศึกษาจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น ต่อลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา ของราเส้นใย *Rhizopus chinesis* 12 ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว พบว่า เมื่อใช้สปอร์ ที่เป็นหัวเชื้อตั้งต้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำให้รามีการเจริญ เป็นเพลเลียขนาดเล็ก และได้กิจกรรมสูงสุดคือ 6400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้จำนวนหัวเชื้อตั้งต้นอื่นๆ คือ 10^5 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร พบการเจริญที่เป็นเพลเลียขนาดใหญ่และได้เอ็นไซม์ 5621 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบลักษณะการเจริญที่เป็นเส้นใยเกาะกันแบบหลวมๆ ได้เอ็นไซม์ 5100 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร

จากการศึกษาของ Rouhang และคณะ (2004) ในรา *A.oryzae* โดยใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นที่ แตกต่างกัน พบว่าการใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้นน้อย จะทำให้ลักษณะการเจริญของราในน้ำหมัก มี รูปแบบเป็นเพลเลียขนาดใหญ่ ในขณะที่การใช้จำนวนหัวเชื้อเริ่มต้น จะทำให้ได้ราที่เป็นเพลเลียมี ขนาดเล็กลง

นอกจากนี้พบว่าการใช้ลักษณะหัวเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันมีผลทำให้รามีลักษณะการเจริญ แตกต่างกัน (นกุล, 2547) โดยเมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเป็นสปอร์ ใน *A. oryzae* พบการเจริญทั้งในรูป ของเส้นใยและ เพลเลีย แต่ถ้าใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของเพลเลีย ก็จะพบการเจริญของราในรูปของ เพลเลีย ตลอดระยะเวลาการเจริญในน้ำหมัก

2.2 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในอากาศร้อยละ 21 จุลินทรีย์นำออกซิเจน ไปใช้เป็น แหล่งพลังงาน ในกระบวนการหายใจ หรือในกระบวนการหมัก (Carlile และ Watkinson, 1994) ซึ่ง การเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวก ที่ต้องการ ออกซิเจน ในการเจริญเติบโต (Wongwicharn และคณะ, 1999; Liang-Xiang Du และคณะ, 2003) นอกจากนี้ ก๊าซออกซิเจนยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของราทั้งทางตรง และทางอ้อม ได้แก่ การเร่งการเจริญเติบโตของรา และการสังเคราะห์หรือหลั่งโปรตีนที่เป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมา นอกเซลล์ ในทางอ้อม ได้แก่ การเพิ่มการผลิตผลิตภัณฑ์ เนื่องจาก การเปลี่ยนแปลง สัณฐานวิทยา ของราเอง Hemmersdorfer และคณะ (1987) รายงานว่า ออกซิเจน มีผลต่อ ลักษณะ การเจริญของ ราเส้นใย ในสภาพที่ออกซิเจนในน้ำหมักขาดแคลน ราเส้นใย จะเกิดการเจริญที่เป็น แบบเพลเลีย

Cui และคณะ (1998) ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำต่อลักษณะการเจริญของรา พบว่า การเจริญแบบเส้นใยไม่เกิดการจำกัดออกซิเจน ส่วนการเจริญแบบ เพลเลียเฉพาะบริเวณ ภายนอก ของเพลเลียเท่านั้นที่ไม่เกิดการจำกัดออกซิเจน แต่การจำกัดออกซิเจนเกิดขึ้นได้ ถ้าเพล ลีามีขนาดใหญ่ กว่าขนาดวิกฤติบริเวณภายใน ซึ่งการเพิ่มออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved

oxygen) โดยการเพิ่มอัตราการกวนให้สูงขึ้นทำให้ได้เพลลีสขนาดเล็กลง และทำให้การจำกัดออกซิเจนภายในเพลลีสลดลง

Wongwicharn และคณะ (1999) ศึกษาการให้ก๊าซออกซิเจนในน้ำหมักโดยวิธี oxygen enrichment และศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อลักษณะการเจริญและการผลิต heterologous protein ใน *Aspergillus niger* B1-D ในระบบการหมักแบบ chemostat พบว่ามีการเจริญเป็น 2 รูปแบบเมื่อใช้ออกซิเจน ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ เมื่อใช้ออกซิเจนร้อยละ 10 พบว่าการเจริญเป็นเส้นใยยาวบาง และมีปลายเส้นใย (hyphal tips) น้อย ส่วนการใช้ก๊าซออกซิเจนร้อยละ 30 และ 50 พบการเจริญเป็นเส้นใยสั้น ๆ และมีจำนวนปลายเส้นใยมาก การมีปลายเส้นใยมากแสดงว่ามีบริเวณที่ active มาก ทำให้ปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมาได้มาก นอกจากนี้พบว่าการใช้ก๊าซออกซิเจนร้อยละ 50 มีผลทำให้เส้นใยเกิดการเกาะกลุ่มกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่า เกิดจากการตอบสนองต่อภาวะการมีปริมาณ ออกซิเจนสูง (hyperoxidant state)

Higashiyama และคณะ (1999) ศึกษาการละลาย ของออกซิเจน ที่มากกว่าสภาวะบรรยากาศปกติ (มากกว่า 7 ppm) โดยวิธี Oxygen Enrichment (OE) method โดยมีการให้ออกซิเจน 25-90 ppm และความดัน 180-380 kPa ใน *Mortierella alpine* พบว่าค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักระหว่าง 20-50 ppm ทำให้রাเปลี่ยนรูปร่างการเจริญจากเส้นใยเป็นเพลลีส และได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ (arachidonic acid) น้อยลงเนื่องจากเกิดการจำกัดออกซิเจนขึ้นที่ผิวเพลลีส ในขณะที่ค่าการละลายที่ 15-20 ppm รูปร่างราไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก แต่ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์น้อยลงมาก โดยค่า การละลายที่ 10-15 ppm เป็นค่าการละลายที่เหมาะสมได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดมากกว่าที่ค่าการละลาย 7 ppm ถึง 1.6 เท่า

McIntyre และคณะ (2002) ศึกษาการเลี้ยง *Mucor circinelloides* แบบกะ พบว่าสภาพบรรยากาศของ ก๊าซระหว่างการหมักมีผลต่อการเกิดรูปร่าง dimorphic ของราชนิดนี้มาก โดยพบการเจริญที่เป็นยีสต์ ในสภาพที่เป็น anaerobic condition เมื่อศึกษาสัดส่วน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 30 และก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 70 ระหว่างการหมัก หรือก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 100 พบการเจริญที่เป็นเส้นใย ในสภาพที่เป็น aerobic condition เท่านั้น

Liang-Xiang Du และคณะ (2003) ศึกษาปริมาณ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักต่อการ เจริญของ *Rhizopus chinesis* 12 ซึ่งเป็นกลุ่ม ที่มีความ สามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ โดยใช้จำนวนสปอร์ 1×10^7 สปอร์พบว่า ราเจริญในรูป Fluffy loose pellets และสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด

Ya-Jie และ Zhong (2003) ศึกษาก๊าซออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) ในการเลี้ยงรา *Ganoderma lucidum* ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางสัณฐานวิทยาเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ และ ganoderic acid โดยควบคุมให้ก๊าซออกซิเจนละลายน้ำประมาณร้อยละ 10 ราจะเจริญเป็นเพลลีสขนาดใหญ่ และพบว่า ให้ผลผลิตสูงกว่าการให้ก๊าซออกซิเจนละลายน้ำ

ประมาณร้อยละ 25 ซึ่งราจะเจริญเป็นเพล็ดที่ขนาดเล็กกว่า จากข้อมูลดังกล่าว สรุปว่า การให้ก๊าซออกซิเจนที่ละลายน้ำมีผลต่อสัณฐานวิทยาของราชนิดนี้เป็นอย่างมาก

การทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Lopez และคณะ (2004) ซึ่งที่ศึกษาผลของการให้อากาศในระหว่างสภาพบรรยากาศปกติ และการเลี้ยงราในสภาพ oxygen enrichment (ใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนร้อยละ 80 และก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 20) ต่อสัณฐานวิทยา และการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ lovastatin พบว่าการให้อากาศนั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชีวมวล แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง รูปร่างของรา เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงราในสภาวะการให้อากาศปกติ โดยการเลี้ยงราในสภาพ oxygen enrichment ที่อัตราการกวนต่ำ (300 rpm) พบว่า ได้ราเจริญเป็นเพล็ดที่ในสภาพการเลี้ยง โดยสภาพอากาศปกติจะมีขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงในสภาพ oxygen enrichment ในทุกๆระยะการทดลอง ส่วนการเลี้ยงราโดยใช้อัตราการกวนสูง (800 rpm) กลับพบว่าการเลี้ยงราในสภาพ oxygen enrichment นั้น รามีการเจริญเป็นเพล็ดที่มีขนาดเล็กกว่า การเลี้ยงราในสภาพอากาศปกติ และการเลี้ยงรา *A. oryzae* U1521 (นกุล, 2547) ในการหมักแบบอาหารเหลวในถังหมักในสภาพ บรรยากาศปกติ ที่อัตราการกวนสูง (700 rpm) พบว่ามีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยสั้นๆ เพียงอย่างเดียว ไม่พบลักษณะการเจริญ ที่เป็นเพล็ดตลอดระยะเวลาการหมัก

2.3 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

การปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์พบได้ทั่วไป ในกระบวนการหมัก ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ออกซิเจน เนื่องมาจากกิจกรรมการหายใจของจุลินทรีย์ (Gibbs และคณะ, 2000) จากงานวิจัยของ McIntyre และ McNeil (1997) ศึกษาผลของ คาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ รา *A. niger* A60 พบว่าเมื่อเลี้ยงราในอาหารเหลวแบบกะ ในช่วง 72 ชั่วโมงแรก ปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าร้อยละ 7.5 ทำให้รามีการเจริญเป็นเพล็ดที่มีขนาดใหญ่ และมีค่า hyphal growth unit, mean hyphal length และ mean branch length เพิ่มขึ้นตาม ปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเลี้ยงราในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (McIntyre และ McNeil, 1997a,b,c) พบว่าการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ค่า hyphal growth unit mean hyphal length และ mean branch length เปลี่ยนแปลง เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ ระบบการหมักแบบกะ งานวิจัยนี้ยังพบว่าปริมาณคาร์บอนได ออกไซด์ มีผลยับยั้งการเจริญ และการผลิต กรดซิตริก เมื่อเทียบกับ ในกรณีไม่มีก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์

2.4 ค่า pH

Carlsen และคณะ (1996) ศึกษาผลของ pH ต่อลักษณะการเจริญและการผลิต α -amylase ของ *A. oryzae* พบว่า pH มีผลต่อการเจริญของราเมื่อใช้หัวเชื้อตั้งต้นในรูปสปอร์คือ ที่ pH 3 - 3.5

รามมีการเจริญเป็นเส้นใยเพียงอย่างเดียว และเมื่อ pH สูงขึ้นเป็น pH 4 - 4.5 รามมีการเจริญ ทั้งเส้นใย และเพลเล็ทโดยที่ pH สูงกว่า 4 เริ่มมีการจับกันของสปอร์ และเมื่อใช้ pH มากกว่า 6 รามมีการเจริญ เป็นเพลเล็ทเพียงอย่างเดียว ซึ่งลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันส่งผลต่อการผลิต α -amylase โดยเมื่อ มีการเจริญเป็นเพลเล็ทจะผลิต α -amylase ได้ $3.0 \text{ FAU(gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ และเมื่อมีการเจริญ เป็นเส้นใย ผลิต α -amylase ได้ $7.5 \text{ FAU(gDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ (FAU = fungal alpha-amylase unite โดย 1 FAU คือ ปริมาณของ α -amylase ที่ทำการย่อยแป้ง 5.26 กรัม ที่ pH 4.7 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Jin และคณะ (1999) ศึกษาผลของ pH ต่อลักษณะการเจริญของรา *A. oryzae* 3 สายพันธุ์ คือ *A. oryzae* DAR 3863, *A. oryzae* DAR 3699 และ *A. oryzae* DAR 1679 ในอาหาร starch processing wastewater (SPW) ที่มีค่า pH แตกต่างกัน คือ pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 พบว่ารา *A. oryzae* DAR 3863 มีการเจริญที่เป็นเส้นใยในอาหารที่มีค่า pH 3.0-3.5 แต่เมื่อเลี้ยงราในอาหารที่มี ค่า pH 4.0-6.0 ว่าจะเจริญเป็นแบบเพลเล็ท ขณะที่รา *A. oryzae* DAR 3699 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 3.5-5.0 ว่าจะเจริญเป็นเพลเล็ท แต่เมื่อเลี้ยงที่ pH 3.0 และ pH ตั้งแต่ 5.5 ว่าจะเจริญเป็นเส้นใย ส่วนรา *A. oryzae* DAR 1679 พบลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยเท่านั้นในระหว่างการเลี้ยงในอาหาร pH 3.0-6.0 และในรายงานนี้ พบว่ารูปแบบการเจริญในลักษณะที่เป็นเพลเล็ทนั้น เป็นรูปแบบ ที่มีการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ มากที่สุด

2.5 อัตราการกวน

ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวนั้นการกวนเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยให้เกิดการผสม และถ่ายเทมวลได้ดี ซึ่งในกระบวนการหมัก แบบใช้อากาศนั้น การกวนเป็นปัจจัยที่จำเป็น เนื่องจากช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายออกซิเจนภายในน้ำหมัก แต่การกวนก่อให้เกิดแรงเฉือน (shear stress) ซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียหาย และมีผลต่อรูปแบบการเจริญ ของรา ระหว่างการหมัก รวมทั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ (Chisti, 1999)

โดยทั่วไปที่อัตราการกวนสูงจะเจริญเป็นเส้นใย ส่วนที่อัตราการกวนต่ำ ว่าจะเจริญเป็นเพลเล็ท เนื่องจากการเพิ่มอัตราการกวนจะมีผลทำให้แรงกล (mechanical force) เพิ่มขึ้น รวมถึงแรงเฉือนเพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ส่วนของเส้นใย แตกออกมาจากเพลเล็ท และอาจมีการเจริญเป็นเส้นใยต่อไปได้ด้วย (Cui และคณะ, 1998)

ลักษณะการเจริญของรามมีผลต่ออัตราการเจริญ กล่าวคือ ที่อัตราการกวนสูง ทำให้รามมีการเจริญเป็นเส้นใยและไม่เกิดการจำกัดออกซิเจน ทำให้เจริญได้เร็วกว่าที่อัตราการกวนต่ำ ที่ทำให้รามเจริญเป็นเพลเล็ท เช่น *A. awamori* ที่อัตราการกวนต่ำ ว่าจะเจริญช้ากว่าที่อัตราการกวนสูง แต่ อัตราการกวนที่สูงเกินไป มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ และส่งผลต่อการปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ ที่ราผลิตขึ้นด้วย (Cui และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตาม หากอัตราการกวนต่ำ เกินไป รามมีการเจริญเป็นเพลเล็ท ขนาดใหญ่ทำให้สารแพร่ผ่านออกมานอกเพลเล็ทได้ยาก (Lejeune และคณะ, 1995) ซึ่ง

แสดงว่า ลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน คือการเจริญเป็นเส้นใย หรือเป็นเพลลีส จะทำให้เราสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันได้ในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย

Amanullah และคณะ (1998) ศึกษาอัตราการกวน ต่อรูปร่างของเส้นใยที่ความเร็วรอบ การกวนสูง (500, 700, 1000 รอบต่อนาที) โดยใช้ *A. oryzae* พบว่า รามีการเจริญเป็นเส้นใยเพียง อย่างเดียว ตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมในการผลิต α -amylase ได้มากที่สุด คืออัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที

Paul และคณะ(1999) ศึกษาการผลิตกรดซิตริกจาก *A. niger* พบว่า ลักษณะการเจริญของ หัวเชื้อเริ่มต้น และอัตราการกวนที่แตกต่างกันมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ เมื่อใช้หัวเชื้อ เป็นเส้นใย และใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที นาน 17 ชั่วโมง ก่อนเพิ่มอัตราการกวนเป็น 800 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดซิตริกได้มากที่สุด คือ 0.74 กรัมต่อกรัมกลูโคส โดยรามีรูปแบบการเจริญ เป็นเส้นใยตลอดระยะเวลาการทดลอง และเมื่อใช้หัวเชื้อเป็น เพลลีส ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.4 มิลลิเมตร เลี้ยงเปรียบเทียบที่อัตราการกวน 2 สภาวะคือ สภาวะแรกเลี้ยงที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที พบว่าเพลลีส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น เป็น 3.2 มิลลิเมตร และหลังจากชั่วโมงที่ 96 เพิ่มอัตราการกวนเป็น 800 รอบต่อนาที เพลลีส มีขนาด ลดลงเหลือ 1.6 มิลลิเมตร (เนื่องจากการแตกหักของเส้นใย) และผลิตกรดซิตริกได้ 0.49 กรัม ต่อกรัมกลูโคส ส่วนสภาวะที่สองเลี้ยงที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที นาน 17 ชั่วโมง และเพิ่มการกวนเป็น 800 รอบต่อนาที พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลีส มีขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากเดิม 1.4 มิลลิเมตร เป็น 1.5 มิลลิเมตร ตลอดการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ นกุล (2547) ที่ศึกษา ปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae* U1521 พบว่า อัตราการกวน มีผล ต่อการเปลี่ยนรูปร่างของราในน้ำหมัก โดยรอบการกวนสูง (700 rpm) รามีการเจริญเป็นเส้นใยเส้น สั้นเพียงอย่างเดียวตลอดระยะเวลาการเจริญในน้ำหมัก และเป็นรูปแบบที่มีการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน สูงสุดถึง 4890 ยูนิต/มล. ในขณะที่รอบการกวนอื่น ๆ ซึ่งต่ำกว่านี้ (250, 350, 450 และ 550 rpm) จะพบลักษณะการเจริญที่เป็นเส้นใยปะปนกับเพลลีส

Lopez และคณะ (2004) ศึกษาผลของการกวนต่อสัณฐานวิทยา และการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ lovastatin โดย *Aspergillus terreus* พบว่าอัตราการกวน ไม่มีผล ต่อการเปลี่ยนแปลงของชีว มวล แต่จะมีผลต่อ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของรา โดยพบว่า อัตราการกวนสูง จะมีผลทำให้เกิดการ แตกหักของเพลลีส ซึ่งจากผลการศึกษพบว่า การเลี้ยงราดังกล่าวโดยใช้อัตราการกวน 300 rpm นั้น รามีการเจริญเป็นเพลลีสขนาดประมาณ 2300 μm แต่เมื่อเลี้ยงราโดยเพิ่ม อัตราการกวน เป็น 800 rpm ทำให้ได้เพลลีสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลดลง(เฉลี่ยประมาณ 700 μm เป็นต้น)

Lai และคณะ (2005) ศึกษาผลของการกวนต่อสัณฐานวิทยาของรา *A. terreus* ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตรที่อัตราการกวนต่างๆ พบว่าอัตราการกวน 225 rpm รามีการเจริญเป็นเส้นใยยาวๆ นอกจากนี้ การใช้อัตราการกวนเป็น 425 rpm ในการเลี้ยงราชนิดเดียวกัน พบว่า ราชนิดนี้สามารถ

ทน ต่อแรงเสียดทานที่เกิดจากการเพิ่ม อัตราการกวน โดยรามีการเจริญเป็นเพลเล็ตที่ปกคลุมไปด้วย เส้นใยลู่ ๆ (frayed pellet)

จากรายงานดังกล่าวแสดงว่า รูปแบบการเจริญของราในการหมักแบบอาหารเหลว มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ในรา ดังนั้น แนวทางการปรับปรุงกระบวนการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอส โดยการเข้าใจถึงปัจจัยต่างๆ ที่ควบคุมการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาของรา โดยเฉพาะปัจจัยการปรับสภาพบรรยากาศระหว่างการหมัก ที่คาดว่าจะทำให้เกิดสภาวะการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีขึ้นต่อไป จึงนำมาเป็นแนวทางการดำเนินการวิจัยในรายงานนี้