

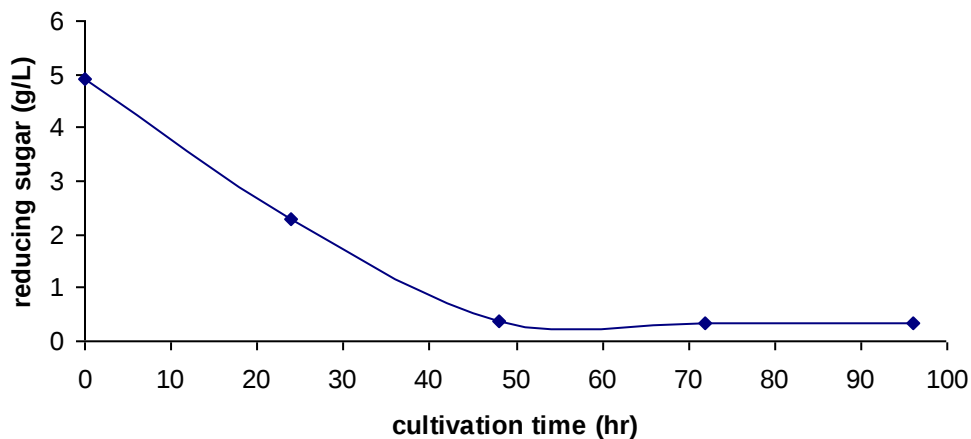
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *A. oryzae* TISTR3087 ในขวดทดลอง

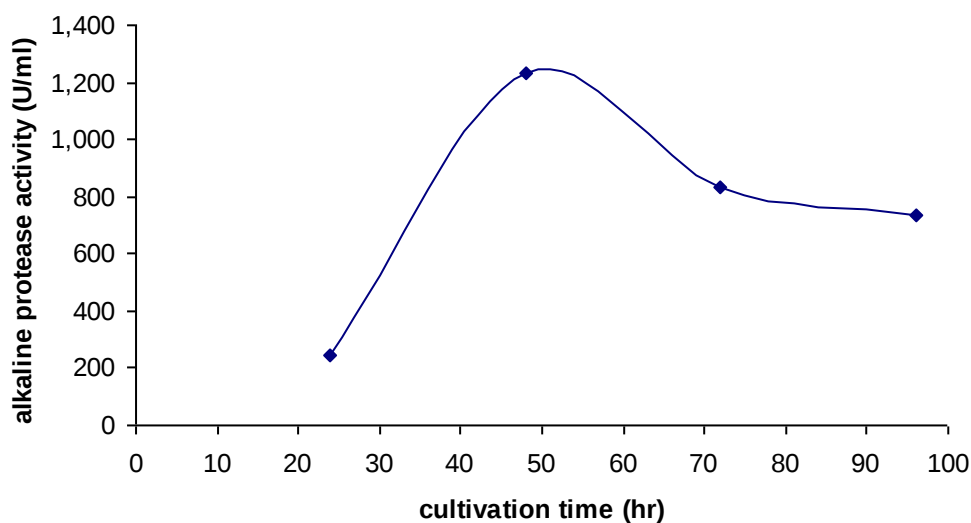
การทดสอบการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *A. oryzae* TISTR3087 ในขวดทดลองระดับห้องปฏิบัติการ (Erlenmeyer flask) และเพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับการผลิตในถังหมักต่อไป เลือกใช้เงื่อนไขที่เคยทดสอบกับรา *A. oryzae* U1521 คือปลูกสปอร์จำนวน 1×10^8 สปอร์ต่ออาหารเหลว สูตรพื้นฐาน (complex medium) จำนวน 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มและเขย่าที่ตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 °C ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีน และรูปร่างที่เปลี่ยนไปที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้

4.1.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และอัลคาไลน์โปรตีน

ในระหว่างการเจริญได้มีการตรวจสอบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และอัลคาไลน์โปรตีน พบว่าภายใน 48 ชั่วโมงหลังจากปลูกสปอร์ ปริมาณน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.1) ซึ่งแสดงถึงมีการเจริญของราชนิดนี้ในอาหารที่เลี้ยง พร้อมกับพบการผลิอัลคาไลน์โปรตีน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20 และพบปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 คือ 1232 Unit/ml แต่หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์ลดลง (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR3087 ในอาหารเหลว complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที



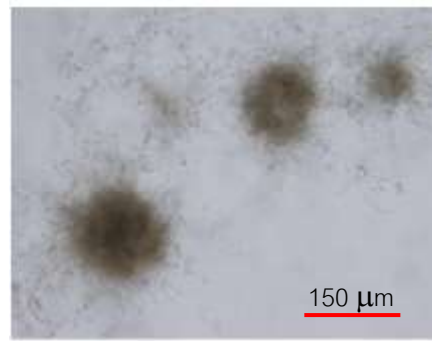
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสของรา *A. oryzae* TISTR3087 ในอาหารเหลว complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.1.2 ลักษณะวิทยาของราในขวดทดลอง

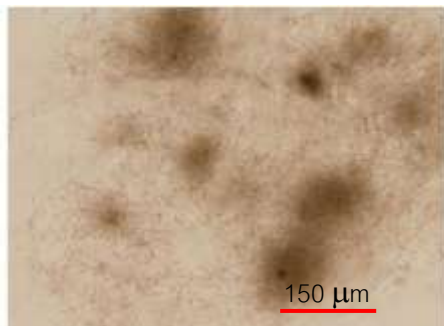
หลังจากปลูกสปอร์ลงในอาหาร complex medium ในขวดทดลอง พบการเจริญเกิดขึ้น โดยภายใน 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3 A) ลักษณะเป็นเส้นใยเกาะตัวพันกันอย่างหลวมๆ และจะพันกันแน่นมากขึ้นจนเห็นเป็นจุดดำตรงกลางเซลล์ มีลักษณะเป็นเพลเล็ต (pellet) และจากนั้นเพลเล็ตจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น จนมีขนาดใหญ่สุดในชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.3 B) หลังจากนั้นพบการหลุดร่วงหรือแตกหักของเส้นใยและเพลเล็ตขนาดเล็กลงในชั่วโมงที่ 72 และ 96 (รูปที่ 4.3 C และ D) อาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของเส้นใยรา (autolysis) และจากกิจกรรมการย่อยสลายที่เกิดจากอัลคาไลน์โปรติเอสที่ราชนิดนี้สร้างขึ้น ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เคยตรวจพบในรา *Aspergillus oryzae* U 1521 (สุนันทา, 2545)



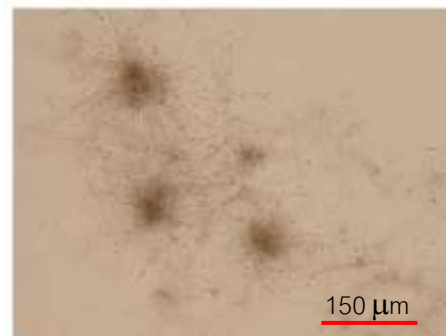
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 4.3 สัณฐานวิทยาของรา *A.oryzae* TISTR 3087 ในอาหารเหลว Complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), ชั่วโมงที่ 48 (B), ชั่วโมงที่ 72 (C) และชั่วโมงที่ 96 (D) กำลังขยาย 200 เท่า

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนในรา *A.oryzae* TISTR 3087 ในขวดทดลองระดับห้องปฏิบัติการ สรุปได้ว่า *A.oryzae* TISTR 3087 สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนได้ดี มีลักษณะการเจริญเป็นเพลเลทในน้ำหมัก ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาในถึงหมักต่อไป ในการทดลองต่อไป จะได้นำข้อมูลในกลุ่มวิจัยที่ผ่านมาในรา *A.oryzae* U1521 (นกุล 2547, ชานนท์ 2549) มาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไป

4.2 รูปแบบหัวเชื้อตั้งต้นระหว่างสปอร์และเพลเลทต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน

เนื่องจากรา *A.oryzae* TISTR 3087 ผลิตสปอร์ได้ไม่สูงเท่ารา *A.oryzae* U1521 ในอาหาร Malt extract agar (MEA) ดังนั้นการเตรียมหัวเชื้อในรูปแบบสปอร์เพื่อปลูกลงไปในถึงหมักจำนวน 1.5 ลิตร ต้องใช้อาหาร MEA จำนวนมาก เพื่อลดปัญหานี้ จึงได้เตรียมหัวเชื้อในรูปแบบเพลเลทเพื่อใช้ทดแทนรูปแบบสปอร์ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1: การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเป็นสปอร์

เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR3087 บน MEA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน จนได้สปอร์ (conidiospore) สีเขียวเข้ม สะสมสปอร์โดยใช้ 0.025 % (v/v) tween 80 ใน normal saline ได้เป็นสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) นำไปใช้เป็นสปอร์ตั้งต้นในขั้นตอนที่สองต่อไป

ขั้นตอนที่ 2: การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเป็นเพลลิต

นำสารแขวนลอยสปอร์ที่เตรียมในขั้นตอนที่ 1 ใส่ลงในขวดทดลองที่มีอาหาร complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด โดยปลูกสปอร์ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน incubator shaker ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที 30 °C นาน 24 ชั่วโมง จะได้ราที่เจริญเป็นเพลลิตขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-250 μm ซึ่งนำไปใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นปลูกลงในอาหารเหลวในถังหมักจำนวน 1500 มิลลิลิตร คิดเป็นหัวเชื้อ 6.67 % (v/v)

4.3 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมักที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที

เพื่อเปรียบเทียบการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนโดยรา *A. oryzae* TISTR 3087 ระหว่างขวดทดลองกับในถังหมักขนาด 2 ลิตร จึงดำเนินการทดลองเหมือนข้อ 4.1 เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีน และรูปร่างที่เปลี่ยนไปที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้

4.3.1 สันฐานวิทยาของราในอาหารเหลว

ศึกษาอัตราการกวนในอาหารเหลวต่อสันฐานวิทยาหรือรูปร่างราที่เกิดระหว่างการหมักของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่ออาหาร 50 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา *A.oryzae* TISTR 3087 ที่ปลูกสปอร์ 1×10^8 ต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 0

4.3.1.1 ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกสปอร์

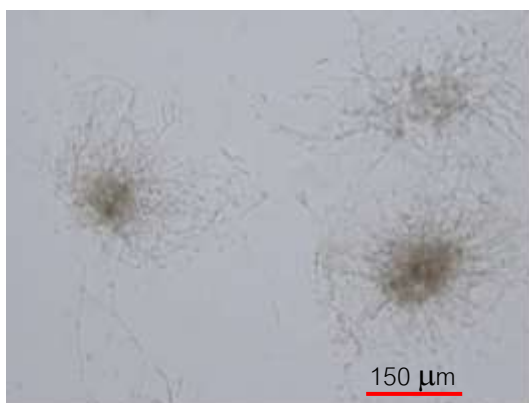
จากการศึกษาพื้นฐานวิทยาของราในน้ำหมักด้วย Image analyzer หลังจากปลูกสปอร์ลงไป ในน้ำหมัก พบว่ามีการงอกของสปอร์ที่ปลูกลงไปเจริญเป็นเส้นใยสั้นๆ ภายใน 12-18 ชั่วโมง โดยมีการเจริญเป็นเส้นใยเกาะตัวพันกันอย่างหลวมๆ จนพันกันมากขึ้นและมีการเจริญที่มีลักษณะเป็นเพลเล็ท (pellet) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง โดยขนาดเพลเล็ทที่พบภายใน 24 ชั่วโมง จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางค่อนข้างเล็กแต่นาจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญเติบโต โดยได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ทเฉลี่ยประมาณ $75.81 \pm 12.77 \mu\text{m}$ (รูปที่ 4.5 A)

4.3.1.2 ชั่วโมงที่ 24 – 48

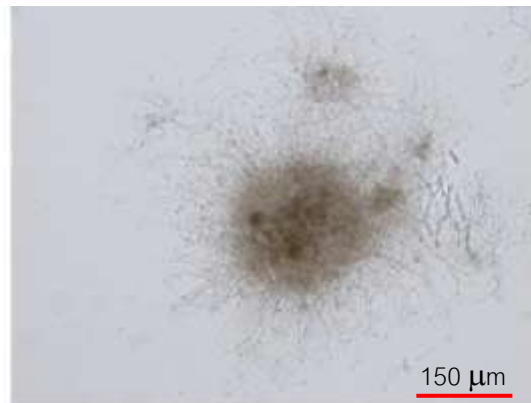
เมื่อพิจารณาพื้นฐานวิทยาของราในอาหารเหลวที่เกิดขึ้น จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ท พบว่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ทภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกสปอร์ และเพลเล็ทที่เกิดขึ้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่สุดภายใน 48 ชั่วโมง โดยได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ทเฉลี่ยประมาณ $137.00 \pm 58.17 \mu\text{m}$ (รูปที่ 4.5 B) และเมื่อพิจารณาสัดส่วนจำนวนเพลเล็ทที่เกิดขึ้นต่อเส้นใยในน้ำหมักโดยสัดส่วนที่พบส่วนใหญ่ในน้ำหมักจะเป็นเพลเล็ท โดยพบเพลเล็ทคิดเป็นร้อยละ 81.79 ± 2.57 (โดยสัดส่วนที่เหลือคือร้อยละของเส้นใย) (ตารางที่ 4.1)

4.3.1.3 ชั่วโมงที่ 48 - 96

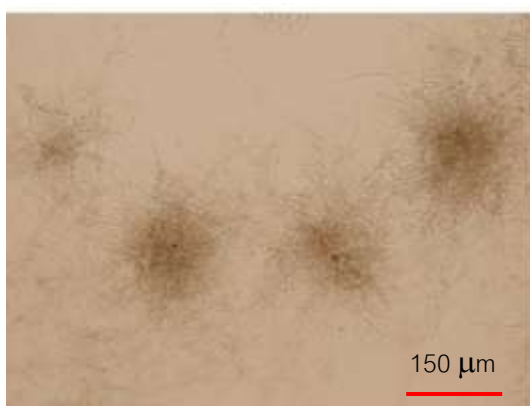
พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป จะพบการหลุดร่วงหรือแตกหักของเส้นใยและการลดลงของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ต (รูปที่ 4.5 C และ D) สาเหตุเกิดจากการเสื่อมสลายของเซลล์เส้นใยเนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของเส้นใย (autolysis) รวมทั้งกิจกรรมการย่อยสลายจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ราชนิดนี้สร้างขึ้น (สุนันทา, 2545)



(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา *A.oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลว complex medium ที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), 48 (B), 72(C) และ 96(D) กำลังขยาย 200 เท่า

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยา สัดส่วนที่พบ (%) ความยาวของเส้นใย และเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ท ของ *A. oryzae* TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกสปอร์ 1×10^8 สปอร์ต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	สัดส่วนที่พบ (%)	ความยาวเส้นใยและ เส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ท (μm)
250	เส้นใย	18.19 ± 2.57	ND
	เพลเล็ท	81.79 ± 2.57	100-250

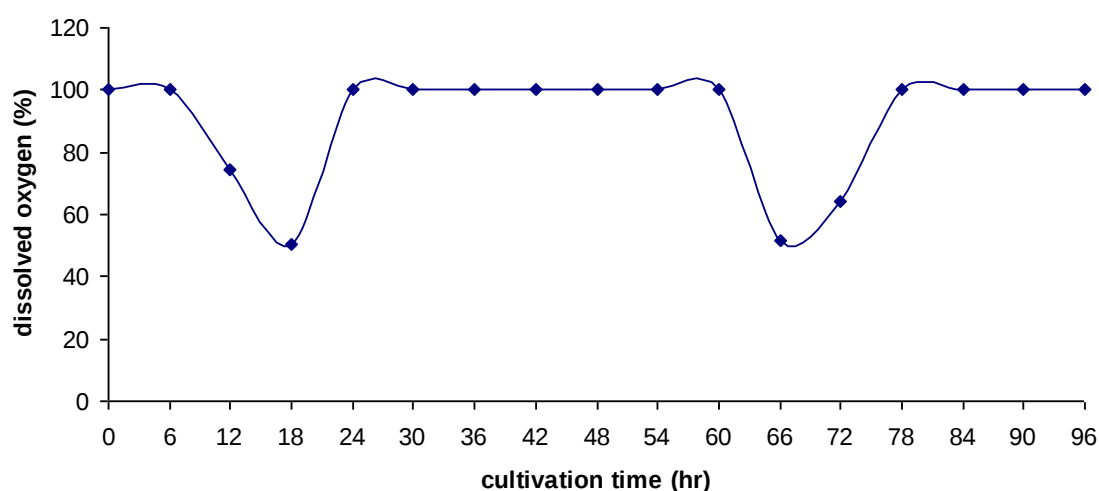
Note

(1) ND = not determined

(2) สัดส่วนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการนับ 3 ครั้ง

4.3.2 การละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก

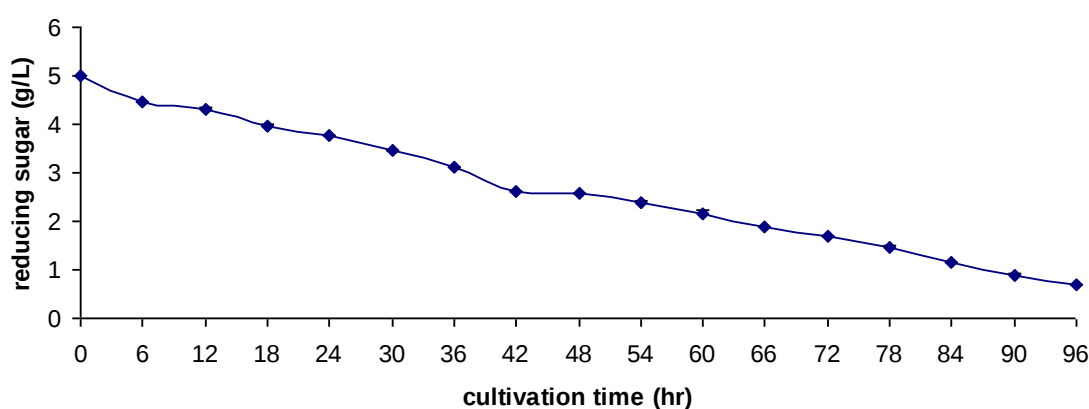
ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักที่เวลาต่างๆ พบว่าการละลายของออกซิเจนลดลงในช่วงเวลาที่ 12-18 และ 66-72 จากนั้นการละลายของออกซิเจนเพิ่มขึ้นจนเท่ากับช่วงแรกของการทดลอง เนื่องจากรามีการใช้ออกซิเจนไปใช้ในการเจริญมากที่สุดในช่วงเวลานี้ โดยในช่วงแรกที่สปอร์ราเริ่มงอก (spore germination) รามีการเจริญพัฒนามาเป็นเส้นใยและเพลเล็ท และหลังจากนั้นการใช้ออกซิเจนของราลดลง (รามีการเจริญสูงที่สุดประมาณชั่วโมงที่ 48) จึงทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.6



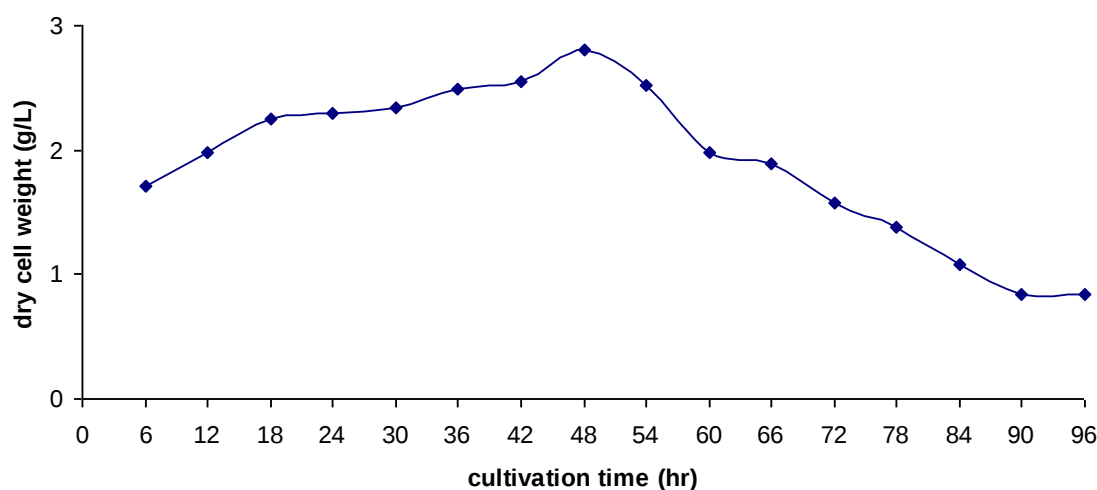
รูปที่ 4.6 แสดงค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก (%) ที่เวลาต่างๆ หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.3.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ค่าน้ำหนักแห้งของราและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยในช่วงเริ่มต้นการทดลองจนถึง 24 ชั่วโมงแรก พบว่ารามีการเจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้นซึ่งสังเกตได้จากค่าน้ำหนักแห้งของราที่เพิ่มขึ้นและในช่วงเวลาต่อมาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วหลังผ่านชั่วโมงที่ 48 ไปแล้วซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญมากที่สุดและยังพบว่าที่ชั่วโมงที่ 48 ผ่านไปแล้วค่าน้ำหนักแห้งของราลดลงเนื่องจากการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอนไซม์ออกมาเป็นปริมาณมากและมีขนาดเพลเลตเล็กกลง ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายตัวเองได้ง่ายทำให้น้ำหนักลดลง (สุนันทา, 2545) ผลแสดงดังรูปที่ 4.7 (ก) และ (ข)



(ก)

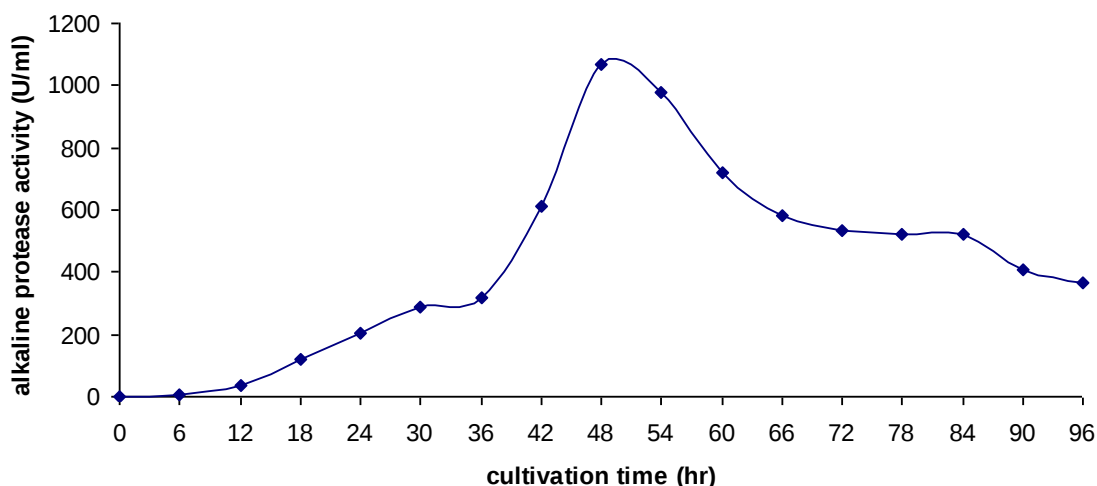


(ข)

รูปที่ 4.7 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และน้ำหนักแห้งของรา (ข) ที่เวลาต่างๆ หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมักในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.3.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส

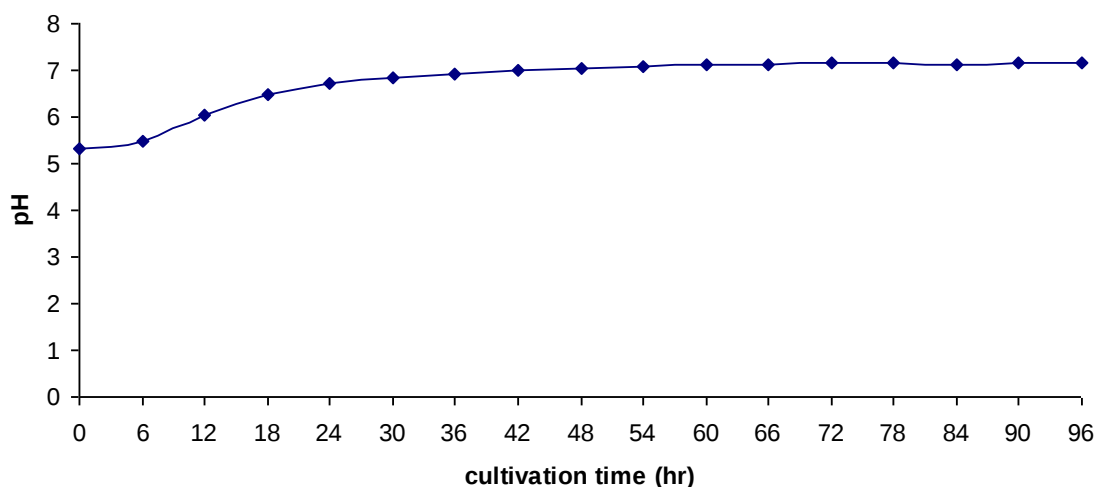
ค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสหลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงแรกไปแล้วและค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อลงไป แล้ว ซึ่งค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1068.00 ± 0.00 Unit/ml และมีค่าลดลงเมื่อผ่าน ชั่วโมงที่ 48 ของการทดลอง ผลแสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 °C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.3.5 ความเป็นกรด – ด่าง (pH)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับเวลาต่างๆ จะเห็นว่าเกิดการเปลี่ยนแปลง pH สูงขึ้นจาก 5.31 ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตเพื่อเข้าสู่ pH ประมาณ 7 (รูปที่ 4.9) ซึ่งเหมาะสมกับการสร้างอัลคาไลน์โปรติเอส ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง เนื่องจากเกิดจากการย่อยสลายกากถั่วเหลือง (defatted soybean) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโตด้วยกระบวนการ deamination ได้แอมโมเนียม (NH_3) ซึ่ง pH มีค่าเป็นด่าง จึงทำให้ค่า pH สูงขึ้น และจากการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสซึ่งมีค่าเป็นด่าง ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ pH ของน้ำหมักสูงขึ้นหมัก (Trinsic และ Righelato, 1970; Harvey และคณะ, 1998; McNeil และคณะ, 1998)



รูปที่ 4.9 แสดงค่า pH ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 °C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

4.4 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) เมื่อใช้เพลเล็ตเป็นหัวเชื้อตั้งต้น

จากการศึกษาเบื้องต้นในรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในถังหมัก พบว่าการเตรียมหัวเชื้อในรูปแบบสปอร์เพื่อปลูกลงไปถังหมักจำนวน 1.5 ลิตร ต้องใช้อาหาร MEA จำนวนมาก เพื่อลดปัญหานี้ จึงได้เตรียมหัวเชื้อในรูปแบบเพลเล็ตเพื่อใช้ทดแทนรูปแบบสปอร์ เพื่อความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนในรา *A. oryzae* TISTR 3087

4.4.1 ผลของอัตราการกวนต่อสัณฐานวิทยาของราในอาหารเหลว

การเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก โดยใช้เพลเล็ตขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-250 μm เป็นหัวเชื้อตั้งต้นที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที

4.4.1.1 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

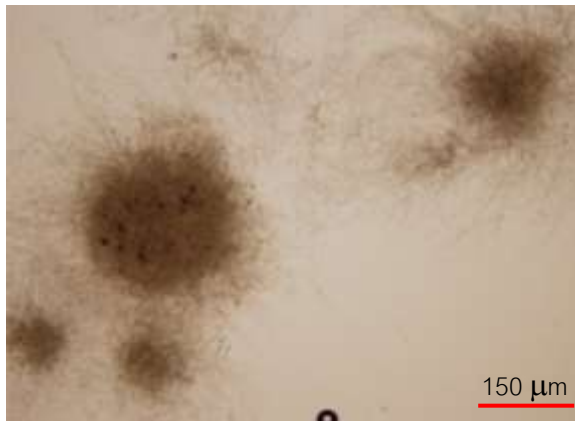
พบการเจริญของรามีลักษณะเป็นเพลเล็ตอย่างเดียวและไม่พบการเจริญเป็นเส้นใยอิสระทั้งในอัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที และพบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ตเฉลี่ยประมาณ 160-300 μm (รูปที่ 4.10A) และ 200-300 μm (รูปที่ 4.11A) ตามลำดับ ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ

4.4.1.2 ชั่วโมงที่ 24 –48

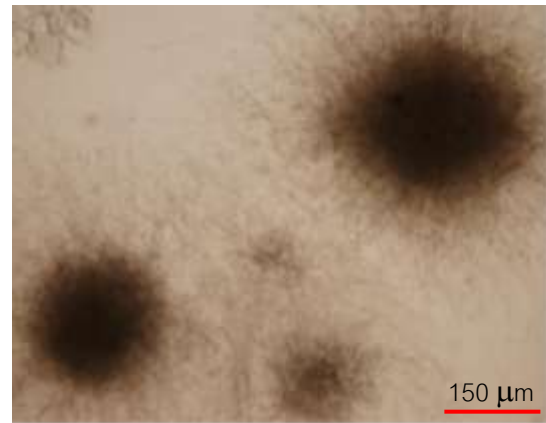
พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิตที่เกิดขึ้นทั้งในอัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง โดยที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิตเฉลี่ยประมาณ 300-400 μm (รูปที่ 4.10B) และ 280-300 μm (รูปที่ 4.11B) ตามลำดับ และแสดงให้เห็นว่าที่อัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิตเล็กกว่าที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที)

4.4.1.3 ชั่วโมงที่ 48-96

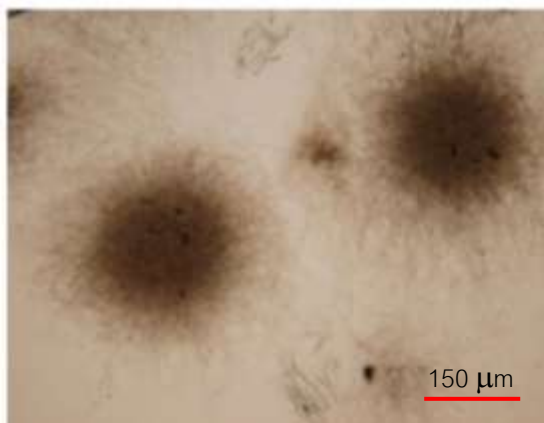
เมื่อทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิตและนับเส้นผ่าศูนย์กลางที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่ามีขนาดและจำนวนเพลลิตที่ต่างกันคือที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิต 300-500 μm (รูปที่ 4.10 C และ D) มีสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 48 (ตารางที่ 4.2) และที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลลิต 250-350 μm (รูปที่ 4.11 C และ D) มีสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 52 (ตารางที่ 4.2) และที่เวลา 48 ชั่วโมง พบการแตกหักของเส้นใยจากเพลลิตทั้งในอัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที แต่ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที พบการแตกหักของเส้นใยมากกว่าที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที เนื่องจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นโดยใช้อัตราการกวนต่ำน้อยกว่าการเลี้ยงราที่อัตราการกวนสูง จึงช่วยลดความเสียหายอันเนื่องมาจากการแตกหักของเส้นใยราเมื่อใช้อัตราการกวนต่ำ (Cui และคณะ, 1998c) คาดว่าอาจเนื่องมาจากการใช้อัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) ส่งผลให้แรงกลที่เกิดขึ้นมีค่ามากกว่าที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) จึงทำให้เกิดความเสียหายให้กับเพลลิตได้มากกว่า ทำให้เกิดการแตกหักของเส้นใยได้มากกว่า



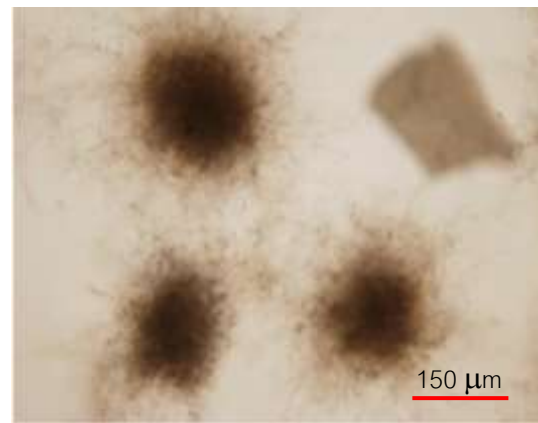
(A)



(B)



(C)

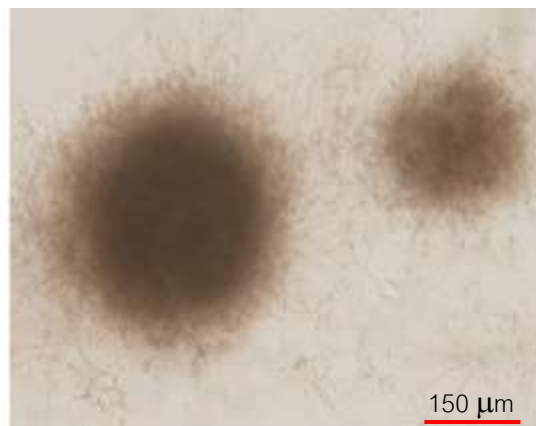


(D)

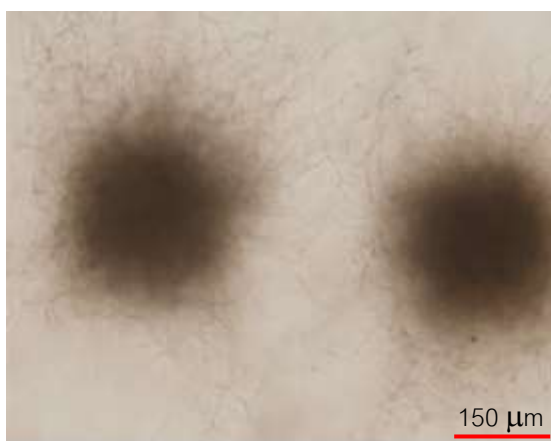
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลลิ่งเป็นหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), 48 (B), 72 (C) และ 96(D) กำลังขยาย 100 เท่า



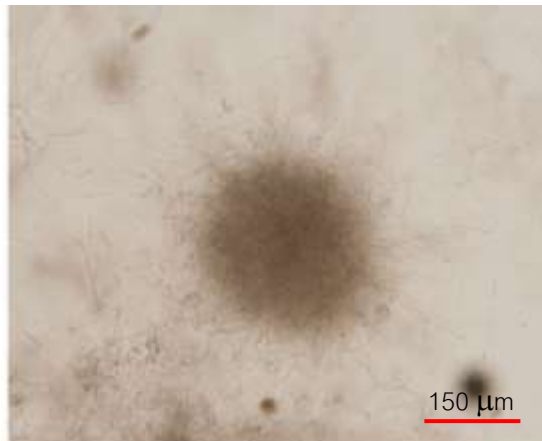
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *A.oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลเล็ทเป็นหัวเชื้อตั้งต้น ในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), 48 (B), 72(C) และ 96(D) กำลังขยาย 200 เท่า

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสัดส่วนที่พบ (%) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ *A.oryzae* TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลเล็ทในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที

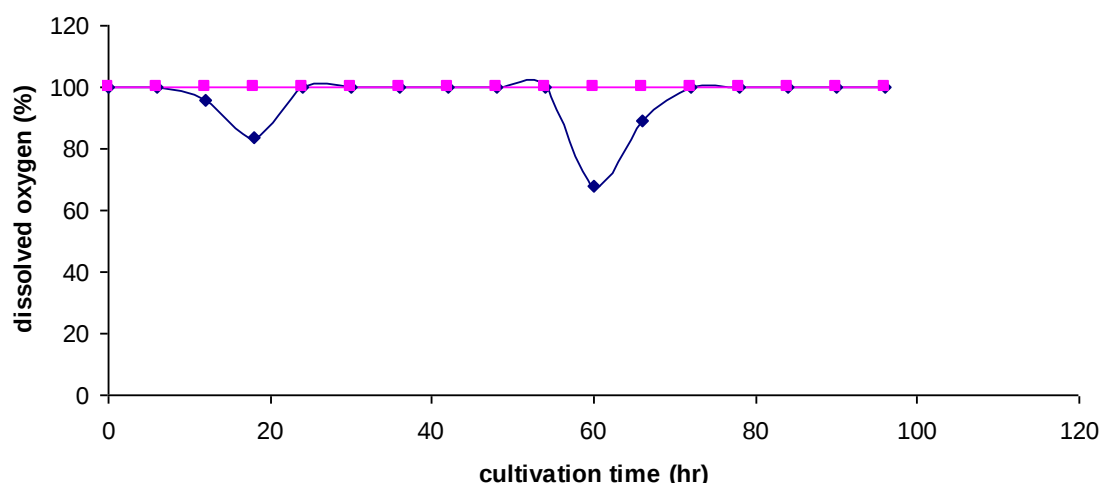
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ท (μm)	สัดส่วนที่พบ (%)
250	เพลเล็ท	$500 < X \leq 700$	20
		$300 < X \leq 500$	48
		$100 < X \leq 300$	32
700	เพลเล็ท	$350 < X \leq 500$	12
		$250 < X \leq 350$	52
		$150 < X \leq 250$	36

Note

- (1) X คือ เส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ท
- (2) สัดส่วนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการนับ 3 ครั้ง

4.4.2 การละลายออกซิเจนในน้ำหมัก

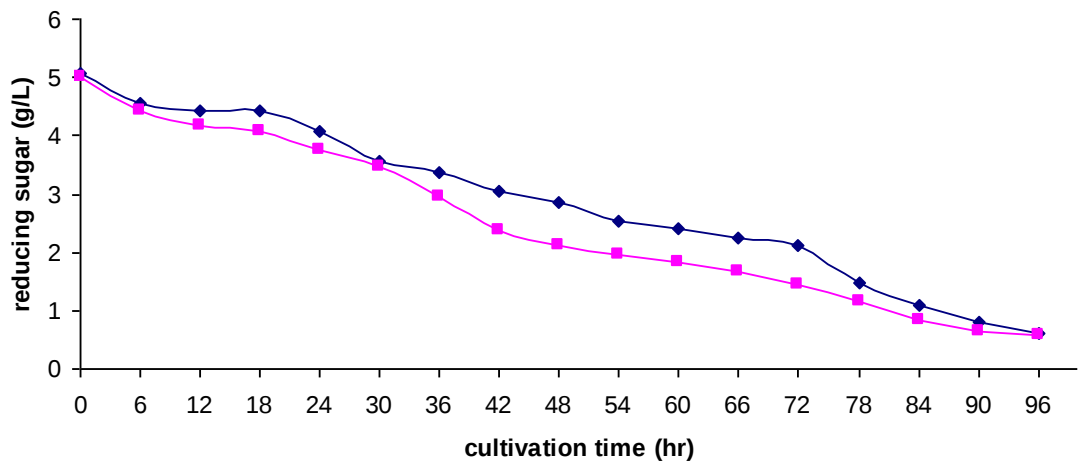
ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักที่เวลาต่างๆพบว่าที่อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของออกซิเจนตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง เนื่องมาจากที่อัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) การละลายของออกซิเจนในน้ำหมักทำได้ดีเพราะว่าที่อัตราการกวนสูงทำให้ฟองอากาศมีการแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ ส่งผลให้มีการสัมผัสและการละลายของออกซิเจนทำได้ง่ายกว่าที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) ส่วนที่อัตราการกวนต่ำพบว่าค่าการละลายของออกซิเจนลดลงในช่วง 12-16 และ 60-66 ชั่วโมงของการทดลอง จากนั้นค่าการละลายของออกซิเจนเพิ่มขึ้นหลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว เนื่องจากรามีการใช้ออกซิเจนไปใช้ในการเจริญเติบโต หลังจากนั้นการใช้ออกซิเจนของราลดลง (ช่วงนี้ราเจริญสูงที่สุดประมาณชั่วโมงที่ 48) จึงทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.12



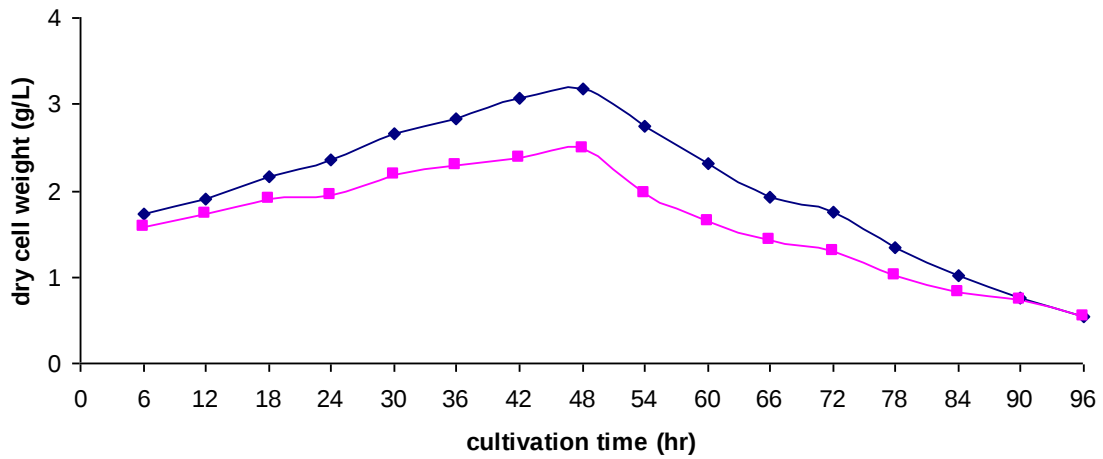
รูปที่ 4.12 แสดงค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก (%) ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลีเทลลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30⁰C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที

4.4.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ค่าน้ำหนักแห้งของราและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆตลอดระยะเวลาการหมักทั้งที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ แสดงให้เห็นว่ารามีการเจริญและใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการสร้างเซลล์และสารเมตาบอไลต์ต่างๆ พบว่ามีการลดลงของน้ำหนักแห้งเมื่อผ่าน 48 ชั่วโมงไปแล้วเนื่องจากการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนออกมาในปริมาณมาก ทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองทำให้น้ำหนักลดลง (สุนันทา, 2545) ผลแสดงดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.3



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.13 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และน้ำหนักแห้งของรา (ข) ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพล็ดทลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งที่เวลาต่างๆ ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ใน อาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที

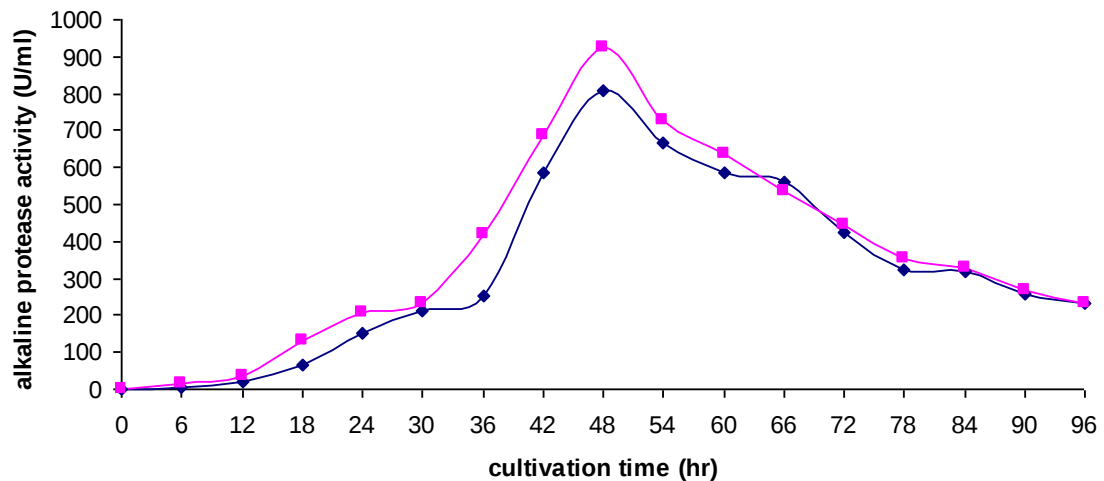
Cultivation time (hr)	Dry cell weight (g/L)	
	250 รอบต่อนาที	700 รอบต่อนาที
0	ND	ND
6	1.577±0.31	1.72 ±0.13
12	1.740±0.11	1.91 ±0.02
18	1.893±0.08	2.17 ±0.05
24	1.945±0.11	2.35 ±0.14
30	2.190±0.22	2.65 ±0. 05
36	2.295±0.12	2.84 ±0.06
42	2.375±0.06	3.07 ± 0.07
48	2.493±0.17	3.18 ±0.04
54	1.968±0.14	2.74 ± 0.20
60	1.633±0.21	2.31 ±0.05
66	1.417±0.08	1.92 ±0.03
72	1.287±0.18	1.75 ±0.10
78	1.017±0.18	1.33 ±0.18
84	0.817±0.28	1.01 ±0.12
90	0.743±0.12	0.75 ±0.15
96	0.540±0.08	0.53 ±0.16

(1) ND = Not Determined

4.4.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส

รูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) พบว่าที่อัตราการกวนสูงและอัตราการกวนต่ำ มีค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 คือ 810.00±0.00 และ 922.00±0.00 U/ml ตามลำดับ สามารถอธิบายได้ว่าที่อัตราการกวนสูงเพลาที่พบส่วนใหญ่มี

ขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการกวนต่ำ ส่งผลให้มีพื้นที่ในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกจากบริเวณปลายของเส้นใยมากกว่า จึงส่งผลให้มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสมากที่สุด



รูปที่ 4.14 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลล์ที่ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที

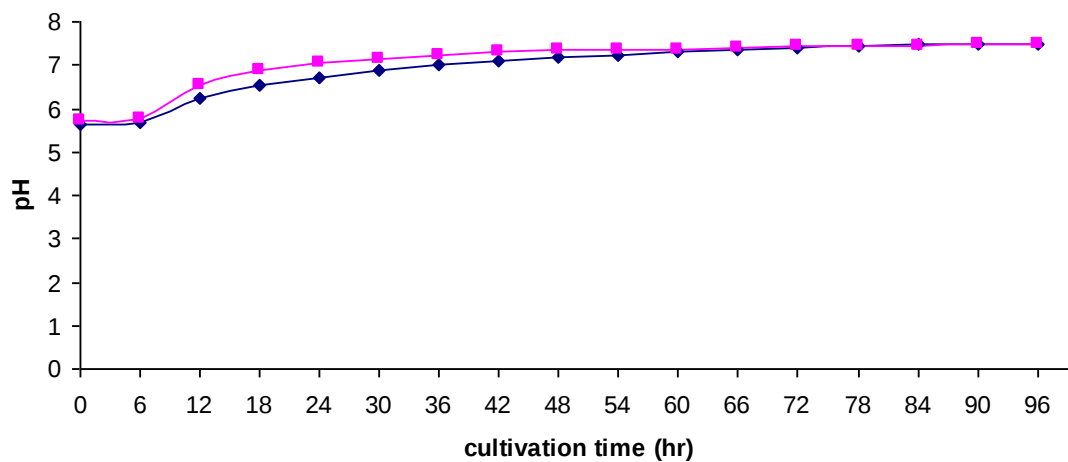
ตารางที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสที่เวลาต่างๆ รา *A. oryzae* TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที

Cultivation time (hr)	Alkaline protease (U/ml)	
	250 รอบต่อนาที	700 รอบต่อนาที
0	1.36±0.02	2.50±0.04
6	5.88±0.05	13.64 ±0.12
12	19.28±0.17	35.80 ±0.19
18	66.40±0.23	130.40 ± 0.23
24	151.00±0.27	208.80 ±0.18
30	210.00±0.19	230.00 ±0.20
36	251.20±0.22	420.60 ±0.25
42	588.00±0.21	686.00 ±0.24
48	810.00±0.14	922.00±0.16
54	667.00±0.24	726.00 ±0.26
60	586.00±0.21	634.00 ±0.22
66	559.00±0.20	533.00 ±0.19
72	423.60±0.25	443.40 ±0.26
78	324.00±0.19	353.40 ± 0.21
84	319.60±0.28	330.00 ± 0.19
90	257.60±0.23	266.40 ±0.16
96	233.00±0.21	230.80 ±0.20

(1) ND = Not Determined

4.4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ที่เวลาต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) พบว่ารา *A. oryzae* TISTR 3087 มีการปรับสภาพสูงขึ้นจาก pH 5 (pH ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 5) ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมกับการเข้าสู่การเจริญเติบโต ซึ่งค่า pH ประมาณ 7 เป็นค่าที่เหมาะสมกับการสร้างอัลคาไลน์โปรตีนตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง ผลแสดงดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงค่า pH ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลีทลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700(■) รอบต่อนาที

4.5 การปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที)

จากการวิจัยที่ผ่านมาในรา *A. oryzae* U1521 (ชานนท์, 2549) พบว่าการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักแบบอาหารเหลวมีผลต่อสัณฐานวิทยาและการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา *A. oryzae* U1521 โดยพบการเจริญเป็นเพลเล็ตทั้งรอบการกวนสูงและต่ำ และเราสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเร็วขึ้นกว่าการหมักภายใต้สภาพบรรยากาศปกติ โดยเราสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนสูงสุดด้วยการปรับสภาพบรรยากาศโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ทั้งที่อัตราการกวนสูงและต่ำ สันนิษฐานว่าการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการมีออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำหมักมากช่วยกระตุ้นให้เกิดเมตาบอลิซึมเร็วขึ้นจึงมีการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเร็วขึ้น ซึ่งการศึกษานี้จึงทำการศึกษาในรา *A. oryzae* TISTR 3087 โดยการปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 เช่นเดียวกับในรา *A. oryzae* U1521 เพื่อดูความสามารถการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนในรา *A. oryzae* TISTR 3087

เลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลเล็ตเป็นหัวเชื้อตั้งต้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-250 μm อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปลูกลงในอาหารเหลวที่มีปริมาตร 1500 มิลลิลิตรในถังหมัก ซึ่งคิดขนาดหัวเชื้อร้อยละ 6.67 (V/V) ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) (รูปที่ 4.16 A และ 4.17 A) ตามลำดับ โดยการปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50

4.5.1 ผลของอัตราการกวนต่อสัณฐานวิทยาของราในอาหารเหลว

ศึกษาที่อัตราส่วน $O_2:N_2$ คือ 50:50 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) ในแต่ละการทดลอง และบันทึกรูปร่างที่เปลี่ยนไปภายใน 72 ชั่วโมง ด้วย Image Analyzer

4.5.1.1 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาราน้ำหมัก ด้วย Image analyzer ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่ารามีการเจริญเป็นเส้นใยเกาะตัวพันกันอย่างหลวมๆ จนพันกันมากขึ้น ไม่พบการเจริญเป็นเส้นใยอิสระและพบการเจริญที่มีลักษณะเป็นเพลเล็ต (pellet) สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนภายใน 24 ชั่วโมง โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ตที่พบภายใน 24 ชั่วโมง จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางค่อนข้างเล็กแต่ขนาดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญ (รูปที่ 4.16 B และ 4.17 B) โดยได้ขนาด

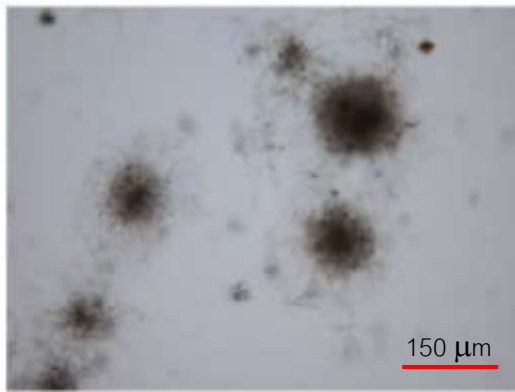
เส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียเฉลี่ยประมาณ 307.04 ± 77.14 และ 248.46 ± 91.22 ตามลำดับ ที่อัตราการกวนต่ำและอัตราการกวนสูง (ตารางที่ 4.6)

4.5.1.2 ชั่วโมงที่ 24 –48

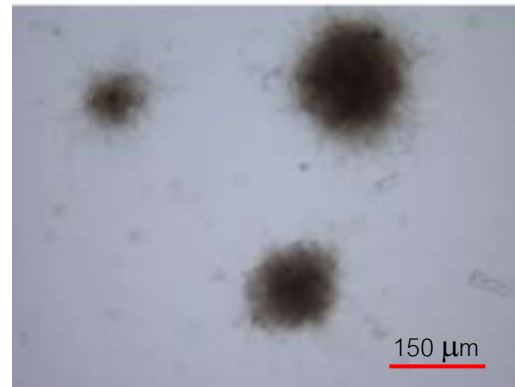
จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าเพลเลียมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์เจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียภายใน 24 ชั่วโมง และพบลักษณะที่เป็นเพลเลียทั้งอัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) และพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียที่ได้ มีขนาดใหญ่สุดภายใน 48 ชั่วโมง โดยได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียเฉลี่ยประมาณ 307.04 ± 77.14 และ 248.46 ± 91.22 ตามลำดับ ที่อัตราการกวนต่ำและอัตราการกวนสูง (ตารางที่ 4.6) และเมื่อทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียและนับเส้นผ่าศูนย์กลางที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่ามีขนาดและจำนวนเพลเลียที่ต่างกันคือที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลีย 300-500 μm มีสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 56 (ตารางที่ 4.5) และที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลีย 250-400 μm มีสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 64 (ตารางที่ 4.5)

4.5.1.3 ชั่วโมงที่ 48-72

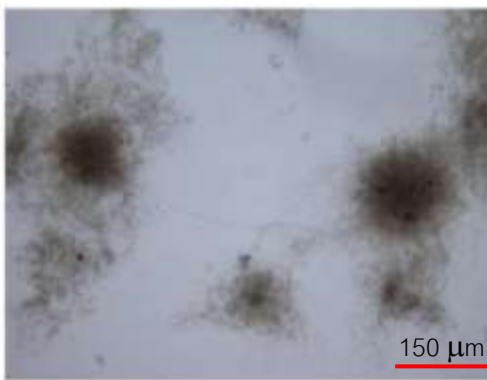
ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเลียเริ่มลดลงภายหลังชั่วโมงที่ 48 (ตารางที่ 4.6) และพบการหลุดร่วงหรือการแตกหักของเส้นใยทั้งในอัตราการกวนต่ำและอัตราการกวนสูง (รูปที่ 4.18 A และ B) ทั้งนี้คาดว่าอาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของรา อันเนื่องมาจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ราชนิดนี้สร้างขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่ Fencel (1978) ได้อธิบายว่าการย่อยตัวเอง (autolysis) เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์มีการปลดปล่อยเอนไซม์ที่เก็บอยู่ภายในเซลล์ออกมาย่อยสลายตัวเอง สำหรับการเลี้ยงราในกระบวนการหมักในอาหารเหลว การเกิดการย่อยตัวเองของเส้นใยราสามารถเกิดขึ้นได้แต่เป็นการยากที่จะจำแนกสภาพการเกิดการย่อยตัวเองก่อนหรือหลังในเส้นใยใดเส้นใยหนึ่ง โดยเฉพาะการชี้ชัดว่าเส้นใยเส้นใดที่กำลังเริ่มเกิดการย่อยตัวเอง หรือเป็นเส้นใยเก่าที่เกิดการย่อยตัวเองแล้ว



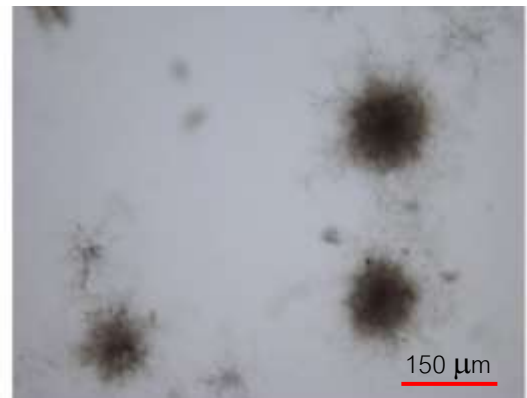
(A)



(B)

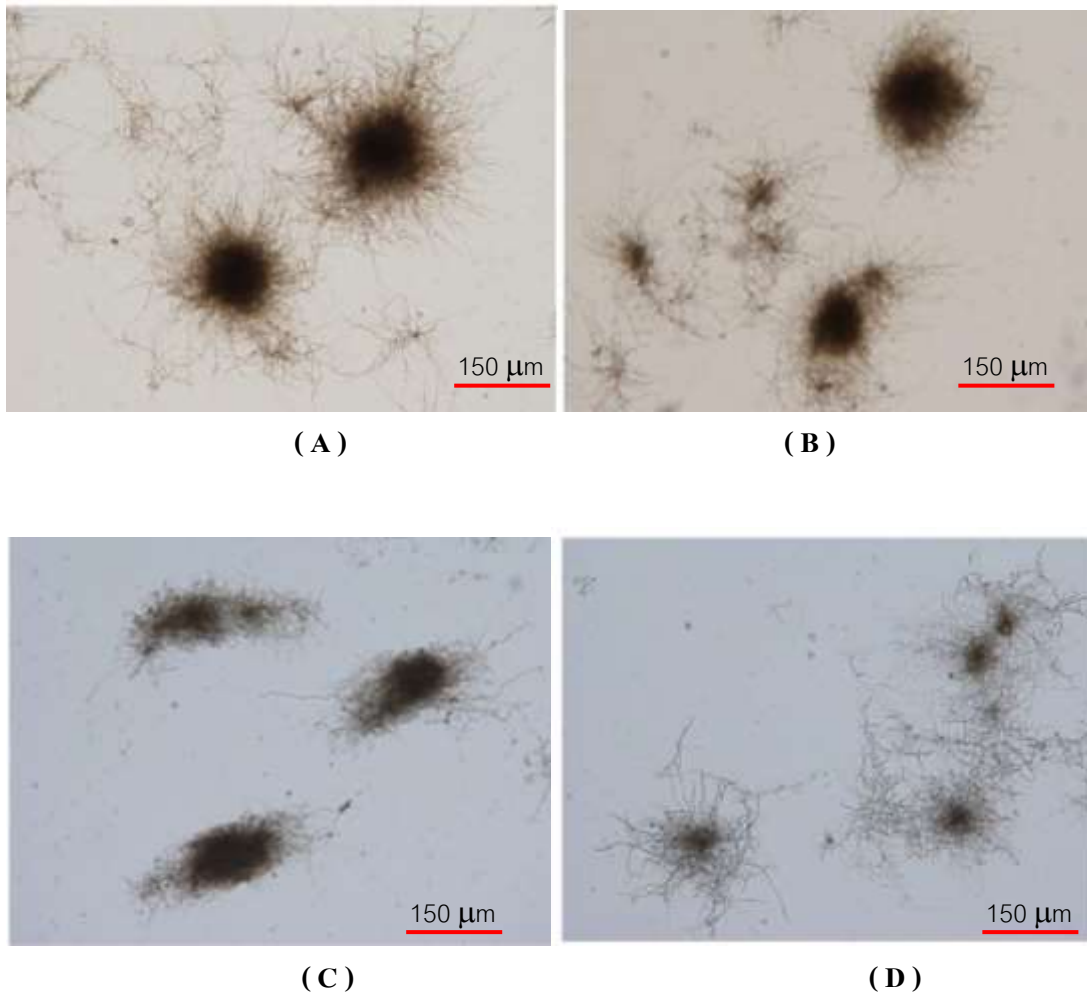


(C)

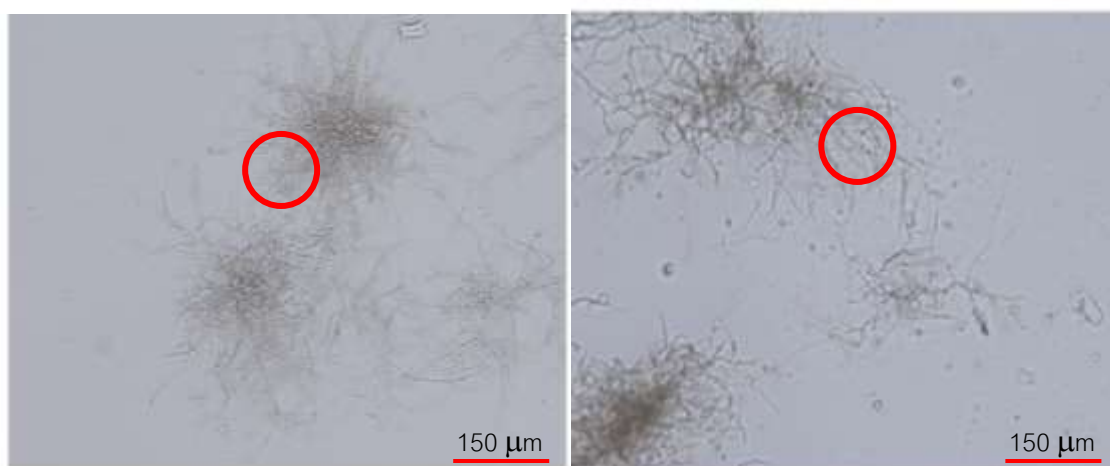


(D)

รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เฟลลิตเป็นหัวเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 °C ณ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ ชั่วโมงที่ 0 (A), 24 (B), 48(C) และ 72 (D) ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลลีสเป็นหัวเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30⁰C ณ ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที ณ ชั่วโมงที่ 0 (A), 24 (B), 48(C) และ 72 (D) ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน (O₂:N₂) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 100 เท่า



(A)

(B)

รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาและการย่อยตัวเอง(บริเวณที่ทำเครื่องหมาย)ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลตเป็นหัวเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30°C ณ ความเร็วรอบ 250 (A) และ 700 รอบต่อนาที (B) ณ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 200 เท่า

ตารางที่ 4.5 แสดงลักษณะทางพื้นฐานวิทยาและสัดส่วนที่พบ (%) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ *A. oryzae* TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลตในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที โดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราส่วนก๊าซผสม ($O_2:N_2$)	ลักษณะทางพื้นฐานวิทยา	ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง เพลต (μm)	สัดส่วนที่พบ (%)
250	50:50	เพลต	$300 < X \leq 500$	56
			$150 < X \leq 300$	44
700	50:50	เพลต	$250 < X \leq 400$	36
			$100 < X \leq 250$	64

Note

(1) X คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลต

(2) สัดส่วนที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการนับ 3 ครั้ง

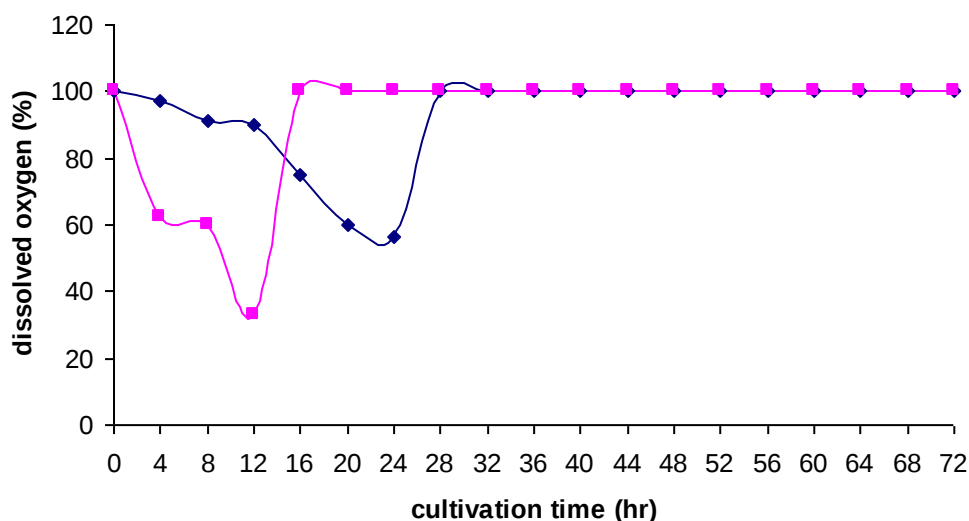
ตารางที่ 4.6 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางpelletเฉลี่ยที่เวลาต่างๆ กับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที

Cultivation time (hr)	Pellet diameter (μm) at ratio of $O_2:N_2=50:50$	
	250 รอบต่อนาที	700 รอบต่อนาที
0	ND	ND
4	184.75 $\pm$ 35.02	120.93 $\pm$ 28.59
8	194.31 $\pm$ 41.35	128.82 $\pm$ 24.64
12	195.41 $\pm$ 45.68	152.05 $\pm$ 52.15
16	230.25 $\pm$ 68.79	155.48 $\pm$ 25.80
20	234.06 $\pm$ 51.64	166.19 $\pm$ 61.03
24	237.39 $\pm$ 67.25	176.41 $\pm$ 49.23
28	248.43 $\pm$ 54.75	178.58 $\pm$ 81.17
32	251.78 $\pm$ 62.05	193.04 $\pm$ 40.14
36	255.65 $\pm$ 50.49	198.90 $\pm$ 59.62
40	256.17 $\pm$ 80.26	200.00 $\pm$ 90.17
44	289.67 $\pm$ 76.98	213.48 $\pm$ 91.52
48	307.04 $\pm$ 77.14	248.46 $\pm$ 91.22
52	296.35 $\pm$ 54.71	208.37 $\pm$ 95.50
56	276.40 $\pm$ 87.73	206.61 $\pm$ 71.27
60	261.86 $\pm$ 44.65	190.49 $\pm$ 43.73
64	257.10 $\pm$ 54.35	178.68 $\pm$ 110.59
68	256.52 $\pm$ 57.86	168.46 $\pm$ 57.10
72	234.59 $\pm$ 45.41	153.28 $\pm$ 53.96

4.5.2 การละลายออกซิเจนในน้ำหมัก

ค่าการละลายของก๊าซออกซิเจนในน้ำหมักที่เวลาต่างๆ ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อมีการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 พบการเปลี่ยนแปลงค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก

ลดลงแบบปกติจากนั้นค่าการละลายของออกซิเจนเพิ่มขึ้นหลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว เนื่องจากรามีการใช้ออกซิเจนไปใช้ในการเจริญเติบโตมากที่สุด หลังจากนั้นการใช้ออกซิเจนของราลดลงจึงทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักปรับค่าสูงขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.19



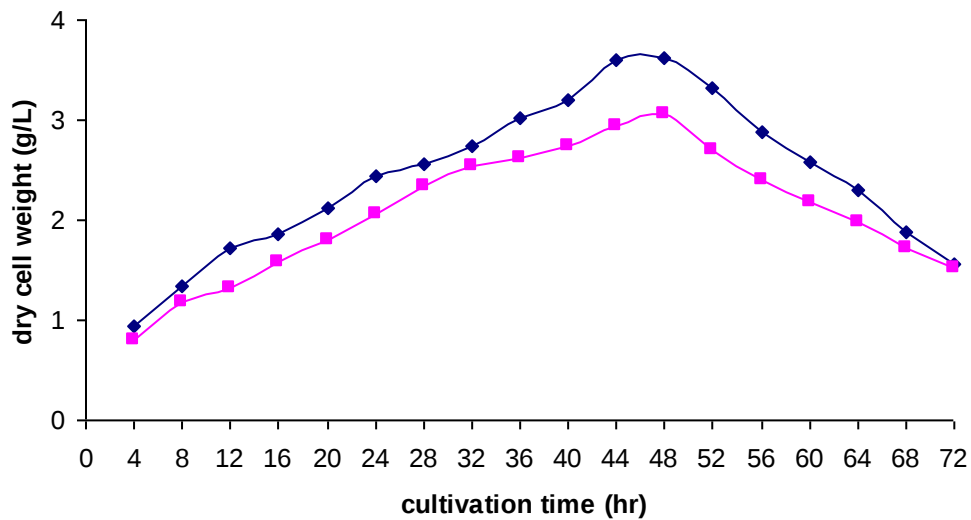
รูปที่ 4.19 แสดงค่าการละลายของออกซิเจน (%) ในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ $30^\circ C$ การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที

4.5.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

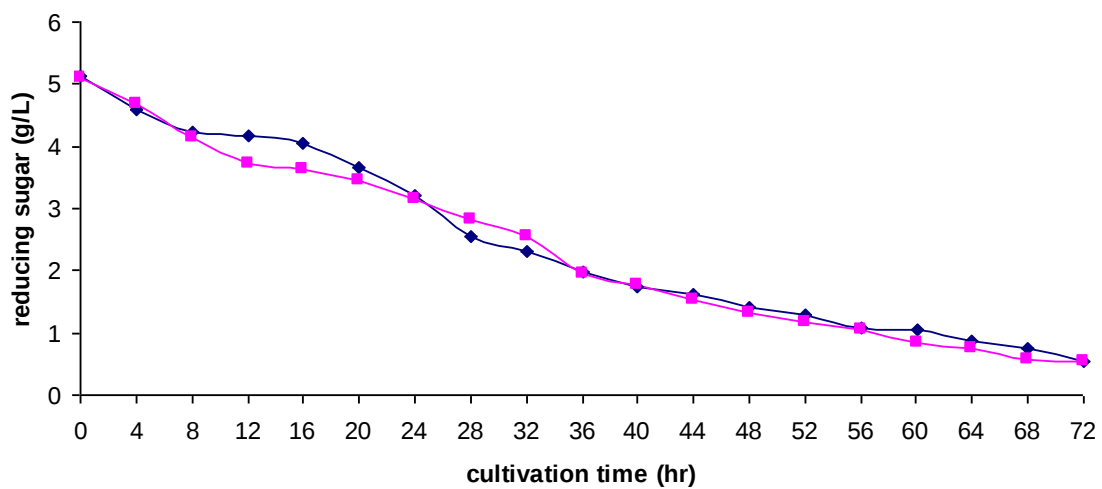
รูปที่ 4.20 (ก) และ (ข) และตารางที่ 4.7 แสดงค่าน้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เวลาต่างๆ ซึ่งเป็นผลจากการปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ในระหว่างการหมักตลอดการทดลองได้พบการเจริญโดยมีการตรวจสอบค่าน้ำหนักแห้งและการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งเนื่องจากรามีการเจริญเติบโต ขณะเดียวกันมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อสร้างองค์ประกอบภายในเซลล์ และสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

รูปที่ 4.20 (ก) ตรวจพบว่าน้ำหนักแห้งของราเริ่มลดลงหลัง 48 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งจากการทดลองในกลุ่มวิจัยที่ผ่านมา (สุนันทา, 2545) พบว่าสาเหตุหนึ่งเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของราชนิดนี้ โดยมีการสร้างอัลคาไลน์โปรตีนอิสระระหว่างการหมัก นอกเหนือจากเอ็นไซม์โปรตีนเอสที่เป็นสาเหตุการย่อยตัวเองในราแล้ว มีรายงานว่าเกิดจากเอ็นไซม์อื่น ๆ เช่น ไคตินเนส หรือกลูคาเนส ซึ่ง

เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายส่วนผนังเซลล์ของราซึ่งประกอบด้วยสารคาร์โบไฮเดรตเช่น ไคติน หรือ กลูแคน เป็นต้น ส่วนการใช้น้ำตาลรีดิคซ์ ในการปรับสภาพบรรยากาศไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 4.20 (ข)) (Reyes และ Lahoz, 1977)



(ก)



(ข)

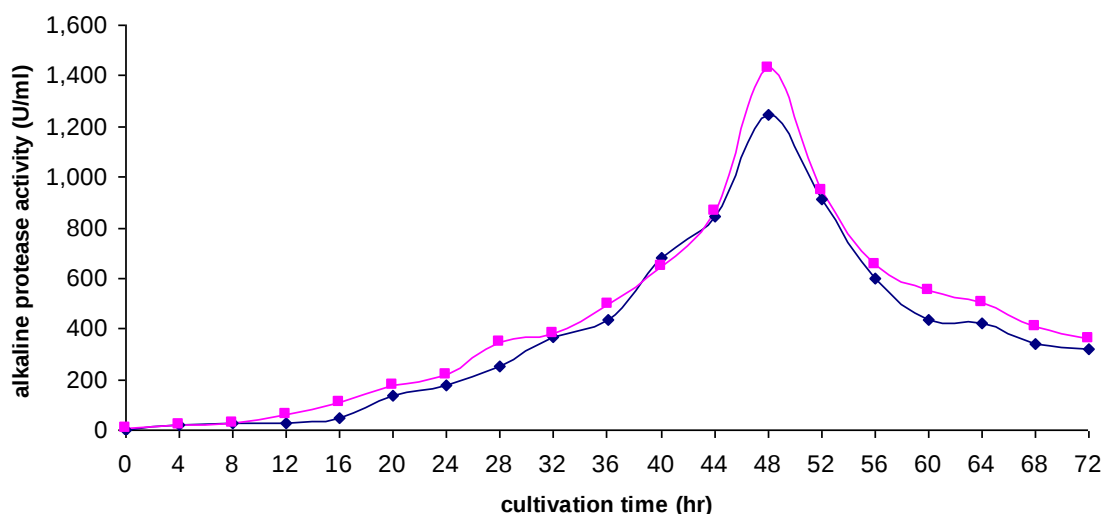
รูปที่ 4.20 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง (ก) และปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ (ข) ในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ $30^\circ C$ การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (♦) และ 700 (■) รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งกับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมักความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที

Cultivation time (hr)	Dry cell weight (g/L) at ratio of $O_2:N_2=50:50$	
	250 รอบต่อนาที	700 รอบต่อนาที
0	ND	ND
4	0.95 ±0.04	0.80 ±0.17
8	1.34±0.16	1.18 ±0.08
12	1.71 ±0.09	1.32 ±0.20
16	1.86 ±0.14	1.59 ±0.04
20	2.12 ±0.12	1.80 ±0.16
24	2.44 ±0.05	2.07 ±0.02
28	2.56 ±0.09	2.35 ±0.06
32	2.74 ±0.10	2.55 ±0.14
36	3.02 ±0.02	2.62 ±0.02
40	3.20±0.09	2.75 ±0.04
44	3.60 ±0.10	2.95 ±0.05
48	3.62 ±0.02	3.06 ±0.00
52	3.33 ±0.07	2.70 ±0.05
56	2.89±0.06	2.40 ±0.17
60	2.59 ±0.21	2.19 ±0.06
64	2.30 ±0.20	1.99 ±0.06
68	1.89 ±0.27	1.73 ±0.10
72	1.57 ±0.08	1.53 ±0.06

4.5.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส

กิจกรรมการผลิตเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสซึ่งเป็นผลจากการปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที โดยพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการทดลองไม่พบการสร้างอัลคาไลน์โปรติเอส แต่จะพบการสร้างเพิ่มขึ้นหลังปลูกสโตร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจพบค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ในสถานะที่มีการปรับสภาพบรรยากาศซึ่งประกอบด้วยก๊าซออกซิเจนต่อไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 ซึ่งเงื่อนไขดังกล่าวนี้เหมือนการหมักที่สภาพบรรยากาศปกติ ซึ่งพบว่าที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ค่ากิจกรรมเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมง 48 ซึ่งอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1244.00 ± 0.00 Units/ml ส่วนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ค่ากิจกรรมเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมง 48 ซึ่งอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1430.00 ± 0.01 Units/ml ผลแสดงดังรูปที่ 4.21 และตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.21 แสดงกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจน($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมักปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสกับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา *A. oryzae* TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที

Cultivation time (hr)	Alkaline protease (U/ml) at ratio of $O_2:N_2=50:50$	
	250 รอบต่อนาที	700 รอบต่อนาที
0	2.32±0.04	3.46±0.06
4	19.60 ±0.17	20.60 ±0.18
8	24.08 ±0.21	26.60 ±0.24
12	29.12 ±0.26	58.30 ±0.21
16	50.50 ±0.18	111.40 ±0.20
20	137.40 ±0.24	180.00 ±0.16
24	175.60 ±0.16	218.40 ±0.19
28	250.80 ±0.15	349.20 ±0.21
32	369.60 ±0.22	383.40 ±0.23
36	437.60 ±0.19	498.00 ±0.18
40	679.00 ±0.24	648.00 ±0.23
44	842.00 ±0.30	868.00 ±0.31
48	1244.00 ±0.22	1430.00 ±0.25
52	913.00 ±0.32	946.00 ±0.33
56	601.00 ±0.21	651.20 ±0.29
60	438.00 ±0.15	548.80 ±0.24
64	423.00 ±0.25	504.60 ±0.30
68	341.40 ±0.20	410.40 ±0.24
72	321.60 ±0.19	360.60 ±0.21

สันนิษฐานว่าการที่ราชนิดนี้สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้เร็วขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง คาดว่าอาจเนื่องมาจากการปรับสภาพบรรยากาศในถังหมักซึ่งมีการให้ออกซิเจนในบรรยากาศมากกว่าสภาพบรรยากาศปกติ โดยทำให้ออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีค่ามากกว่าสภาพบรรยากาศปกติจึง

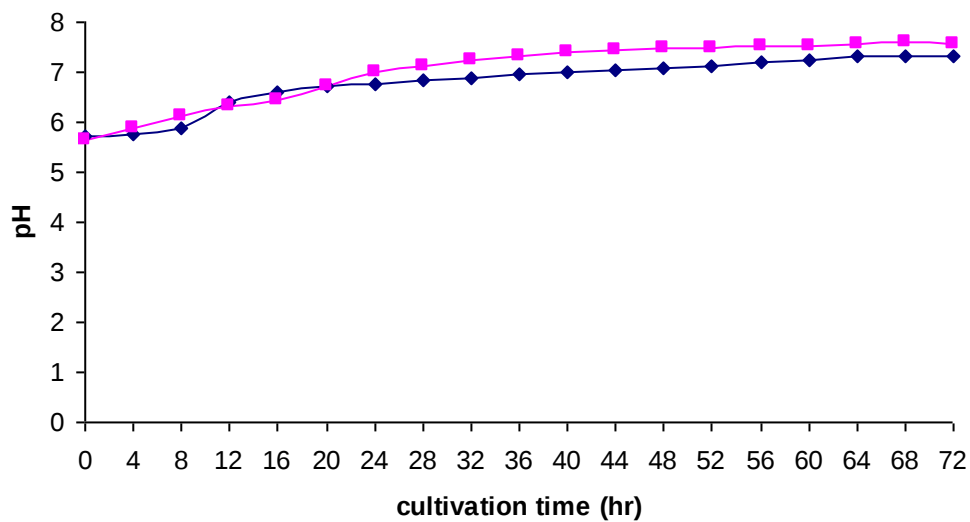
ส่งผลให้รามีการเจริญที่เร็วขึ้นมีเมตาโบลิซึมที่สูงขึ้น และเร่งให้มีการเกิดผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น (Sagantanis และ Karim, 1996; Ya-Jie และ Jian-Jiang, 2003; Issaly และคณะ, 2005; Yovita และคณะ, 2005)

มีรายงานว่าราที่เจริญบนวัสดุที่เป็นเพอร์ไลท์ขนาดเล็กสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนได้ดีกว่าเพอร์ไลท์ขนาดใหญ่ เนื่องจากเพอร์ไลท์ขนาดเล็กมีพื้นที่ในการปลดปล่อยเอ็นไซม์ หรือสารโปรตีนเพิ่มขึ้น จึงทำให้ได้ปริมาณอัลคาไลน์โปรตีนเพิ่มขึ้น (Carlsen และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังแสดงว่ารูปแบบหรือลักษณะการเจริญของราส่งผลต่อปริมาณสารเมตาบอไลต์ด้วย (Braun และ Vecht– Lifshitz, 1991 ; Stanbury และ Whitaker, 1994 ; Pazouki และ Panda, 2000) โดยในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่ารูปแบบที่เป็นเพอร์ไลท์ขนาดเล็กจะให้อัลคาไลน์โปรตีนได้สูงกว่ารูปแบบที่เป็นเพอร์ไลท์ขนาดใหญ่ และรูปร่างที่สม่ำเสมอ (ในช่วง 100-150 μm) ระหว่างการหมักจะให้อัลคาไลน์โปรตีนที่สูงกว่า

4.5.5 ความเป็นกรด - ด่าง (pH)

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลจากการปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($\text{O}_2:\text{N}_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างการหมัก โดยมีค่า pH สูงขึ้นจากเดิมคือ pH 5 (pH ก่อนนำไปนึ่งมาเชื้อ) ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเมื่อเข้าสู่ pH ประมาณ 7 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน ผลแสดงดังรูปที่ 4.22

การเปลี่ยนแปลงค่า pH สามารถพบได้ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกของการทดลอง เนื่องจากมีการย่อยสลายกากถั่วเหลือง (defatted soybean) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ complex medium โดยกากถั่วเหลืองนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับจุลินทรีย์ เมื่อผ่านกระบวนการ deamination ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนียไอออน (NH_4^+) เมื่อละลายน้ำ ทำให้ได้สถานะเป็นด่างจึงทำให้ pH ในน้ำหมักสูงขึ้น (Trinsic และ Righelato, 1970; Harvey และคณะ, 1998; McNeil และคณะ, 1998)



รูปที่ 4.22 แสดงค่า pH ในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหาร complex medium อุณหภูมิ $30^\circ C$ การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที