

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีเอส ในราโดยไม่ต้อง
ใช้การปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรม

**Process development for fungal alkaline protease without
genetic engineering improvement**

ผู้วิจัย

ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์ (หัวหน้าโครงการ)

วันวิสาข์ กลิ่นศรีสุข (ผู้ร่วมโครงการ)

งบประมาณหมวดอุดหนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาโรงงานต้นแบบ และคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์วิจัย ตลอดจนการวิจัยในโครงการ ฯ โดยโครงการได้รับงบประมาณหมวดอุดหนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2553 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอส ในราโดยไม่ต้องใช้การปรับปรุง ทางพันธุวิศวกรรม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาพัฒนากระบวนการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอส ในการหมักแบบอาหารเหลวของ *Aspergillus oryzae* TISTR3087 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 1.5 ลิตร จำนวนสปอร์เริ่มต้น 1×10^8 สปอร์/50 มิลลิลิตรของอาหาร อุณหภูมิ 30 °C อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ไม่ควบคุม pH และปรับสภาพบรรยากาศในถังหมัก โดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจนในสัดส่วน ($O_2:N_2$) ที่ 50:50 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และ อัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที)

การเลี้ยงรา *A. oryzae* TISTR3087 ในขวดทดลองระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้น มีความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมง 48 โดยได้ปริมาณเอ็นไซม์ 1232 ± 0.22 U/ml ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่เป็นแบบเพลเล็ทมากกว่าเส้นใย และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพลเล็ทเฉลี่ยประมาณ 114.7 ± 52.5 μm เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสในถังหมัก พบว่ามีการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมง 48 เท่ากับ 1068 ± 0.18 และ 1186 ± 0.21 U/ml ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสไม่แตกต่างกันมากนักกับในขวดทดลอง ที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที พบว่าการเจริญส่วนใหญ่เป็นแบบเพลเล็ท โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพลเล็ทใหญ่สุดภายใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 137.0 ± 58.2 μm ส่วนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที พบการงอกของสปอร์เป็นเส้นใยเพียงอย่างเดียวและมีขนาดเส้นใยยาวสุดที่ชั่วโมง 48 เท่ากับ 478.6 ± 141.1 μm และค่าน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.80 ± 0.23 และ 2.74 ± 0.04 g/L ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ

เมื่อใช้หัวเชื้อรูปแบบเพลเล็ททำการหมักภายใต้สภาพบรรยากาศปกติ ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที พบการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสสูงสุดที่ชั่วโมง 48 โดยได้ปริมาณเอ็นไซม์ 810 ± 0.14 และ 922 ± 0.16 U/ml ตามลำดับ และพบการเจริญเป็นแบบเพลเล็ทอย่างเดียว ไม่พบการเจริญเป็นเส้นใยอิสระตลอดระยะเวลาการหมัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเพลเล็ทใหญ่สุดที่ชั่วโมง 48 เท่ากับ 396.4 ± 133.7 และ 322.5 ± 100.2 μm ตามลำดับ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพลเล็ทมีค่าความแตกต่างกันไม่มากนัก และค่าน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 3.18 ± 0.04 และ 2.49 ± 0.17 g/L ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ

เมื่อใช้หัวเชื้อรูปแบบเพลเล็ททำการหมักโดยการปรับสภาพบรรยากาศเมื่อใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจนในอัตราส่วน ($O_2:N_2$) ที่ 50:50 ที่อัตราการกวน 250 และ

700 รอบต่อนาที พบว่ามีการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนสูงสุดที่ชั่วโมง 48 โดยได้ปริมาณเอ็นไซม์ 1244 ± 0.22 และ 1430 ± 0.25 U/ml และพบการเจริญเป็นแบบเพลลียอย่างเดี่ยว โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเพลลียที่ใหญ่ที่สุดที่ชั่วโมง 48 เท่ากับ 307.0 ± 77.1 และ 248.5 ± 91.2 μm ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับและค่าน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 3.62 ± 0.02 และ 3.06 ± 0.00 g/L ที่อัตราการกวน 250 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ

ผลการศึกษาสรุปได้ว่า การใช้หัวเชื้อตั้งต้นที่ต่างกันมีผลต่อสัณฐานวิทยาและการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้น พบการเจริญส่วนใหญ่เป็นเพลลียมากกว่าเส้นใย ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) แต่พบลักษณะที่เป็นเส้นใยที่อัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) เมื่อใช้เพลลียเป็นหัวเชื้อตั้งต้นที่อัตราการกวนต่ำและสูง รมีลักษณะการเจริญเป็นเพลลียอย่างเดี่ยว การปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักช่วยให้เราสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนได้ดีกว่าสภาพบรรยากาศปกติ ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ สามารถนำไปใช้เพิ่มการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* แทนวิธีการทำพันธุ์วิศวกรรมได้ดี

คำสำคัญ : แอสเพอร์จิลลัส ออร์ไรเซซ / อัลคาไลน์โปรตีน / ราเส้นใย / การหมักในอาหารเหลว / การปรับสภาพบรรยากาศ

Process development for fungal alkaline protease without genetic engineering improvement

Abstract

Process development of alkaline protease production in submerged fermentation of *Aspergillus oryzae* TISTR3087 by controlling of atmosphere and agitation rate was proposed in the work. The work was performed in a 2 L fermenter containing 1.5 L working volume. The initial spore inoculums of 1×10^8 spores/50 ml was cultivated and operated at 30°C, 1.0 vvm, uncontrolled pH throughout fermentation. The atmosphere in the fermenter was provided by gas mixtures between oxygen (O₂) and nitrogen (N₂) with a ratio of O₂:N₂ at 50:50 at low agitation (250 rpm) and high agitation speeds (700 rpm).

Cultivation of *A. oryzae* TISTR3087 using spore inoculums in a shake flask and a fermenter is comparable. The maximum alkaline protease of 1232 ± 0.22 U/ml at 48 hours was produced in a 250 ml shake flask and pellet morphology was appeared as major form more than filamentous form, with average diameter of 114.7 ± 52.5 µm. In contrast, the maximum alkaline protease of 1068 ± 0.18 and 1186 ± 0.21 U/ml was produced at 250 and 700 rpm in a fermenter at 48 hours. The pellet morphology was major form at 250 rpm with diameter of 137.0 ± 58.2 µm while the filamentous form of 478.6 ± 141.1 µm in length was found at 700 rpm. Fungal dry cell weight of 2.80 ± 0.23 and 2.74 ± 0.04 g/L was obtained at 250 and 700 rpm, respectively.

When pellet inoculum was used instead of spore inoculum in a fermenter, alkaline protease production was only 810 ± 0.14 and 922 ± 0.16 U/ml at 250 and 700 rpm, respectively at 48 hours. Only pellet morphology was developed in the cultivation process with the maximum diameter and dry cell weight of 396.4 ± 133.7 and 322.5 ± 100.2 µm 3.18 ± 0.04 and 2.49 ± 0.17 g/L at 250 and 700 rpm, respectively at 48 hours.

The pellet inoculum was also used in a modified atmosphere of O₂ and N₂ and the maximum alkaline protease production of 1244 ± 0.22 and 1430 ± 0.25 U/ml was at 250 and 700 rpm, respectively at 48 hours. Only pellet morphology was occurred again in the modified atmosphere with diameter of 307.0 ± 77.1 and 248.5 ± 91.2 µm at 250 and 700 rpm, respectively at 48 hours. The dry cell weight was obtained at 3.62 ± 0.02 and 3.06 ± 0.00 g/L 250 and 700 rpm, respectively at 48 hours.

It is concluded that the initial inoculum form affected the morphology and alkaline protease production. When spore inoculum is used, pellet morphology is major form at low agitation speed (250 rpm) and filament form is major developed at high agitation speed. When pellet inoculum is used, the only pellet form is developed, both at low and high agitation speeds. Higher alkaline protease which produced in the modified atmosphere, comparison to one in normal atmosphere is an alternative method for alkaline protease improvement, instead of genetic engineering strain.

Keywords: *Aspergillus oryzae* / Alkaline Protease / Submerged Fermentation / Modified Atmosphere

สารบัญเรื่อง

	หน้า
หน้าปก	1
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญตาราง	9
สารบัญรูป	10-12
บทที่ 1 บทนำ	13-14
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	15-21
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	22-26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	27-58
4.1 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา <i>A. oryzae</i> TISTR3087 ในขวดทดลอง	27
4.1.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และอัลคาไลน์โปรตีน	27
4.1.2 สันฐานวิทยาของราในขวดทดลอง	28
4.2 รูปแบบหัวเชื้อตั้งต้นระหว่างสปอร์และเพลเลตต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน	29
4.3 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมักที่อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที	30
4.3.1 สันฐานวิทยาของราในอาหารเหลว	30
4.3.1.1 ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกสปอร์	31
4.3.1.2 ชั่วโมงที่ 24 – 48	31
4.3.1.3 ชั่วโมงที่ 48 – 96	31
4.3.2 การละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก	33
4.3.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	34
4.3.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีน	35
4.3.5 ความเป็นกรด – ด่าง (pH)	35

4.4 การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที) เมื่อใช้เพลเล็ทเป็นหัวเชื้อตั้งต้น	36
4.4.1 ผลของอัตราการกวนต่อสัณฐานวิทยาของราในอาหารเหลว	36
4.4.1.1 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง	36
4.4.1.2 ชั่วโมงที่ 24 –48	37
4.4.1.3 ชั่วโมงที่ 48-96	37
4.4.2 การละลายออกซิเจนในน้ำหมัก	40
4.4.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	41
4.4.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีน	43
4.4.5 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	46
4.5 การปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่อัตราการกวนต่ำ (250 รอบต่อนาที) และอัตราการกวนสูง (700 รอบต่อนาที)	47
4.5.1 ผลของอัตราการกวนต่อสัณฐานวิทยาของราในอาหารเหลว	47
4.5.1.1 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง	47
4.5.1.2 ชั่วโมงที่ 24 –48	48
4.5.1.3 ชั่วโมงที่ 48-72	48
4.5.2 การละลายออกซิเจนในน้ำหมัก	52
4.5.3 น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	53
4.5.4 กิจกรรมอัลคาไลน์โปรตีน	56
4.5.5 ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	58
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	60-61
บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง	62-65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยา สัดส่วนที่พบ (%) ความยาวของเส้นใย และเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย ของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกสปอร์ 1×10^8 สปอร์ต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	33
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสัดส่วนที่พบ (%) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลเล็ตในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที	40
4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งที่เวลาต่างๆ ของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที	43
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสที่เวลาต่างๆ รา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที	45
4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสัดส่วนที่พบ (%) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลเล็ตในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที โดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50	51
4.6 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพลเล็ตเฉลี่ยที่เวลาต่างๆ กับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที	52
4.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักแห้งกับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมักความเร็วรอบ 250 และ 700 รอบต่อนาที	55
4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสกับอัตราส่วนของก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium ในถังหมัก ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที	57

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
4.1 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการเลี้ยง <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	27
4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในอาหารเหลว complex medium จำนวน 50 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C pH เริ่มต้น 5.00 ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	28
4.3 สัณฐานวิทยาของรา <i>A. oryzae</i> 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	29
4.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ที่ปลูกสปอร์ 1×10^8 ต่ออาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 0	31
4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 เมื่อใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อตั้งต้น ในอาหารเหลว 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	32
4.6 แสดงค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก (%) ที่เวลาต่างๆ หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 °C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	33
4.7 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และน้ำหนักรากของรา (ข) ที่เวลาต่างๆ หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมักในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 °C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	34
4.8 แสดงค่ากิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส ที่เวลาต่างๆ หลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5	35

ลิตรใน อาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250รอบต่อนาที	
4.9 แสดงค่า pH ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นสปอร์ลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที	36
4.10 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 เมื่อใช้เพลลิตเป็นหัวเชื้อ ตั้งต้นในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 ⁰ C ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), 48 (B), 72 (C) และ 96(D) กำลังขยาย 100 เท่า	38
4.11 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา <i>A.oryzae</i> TISTR 3087 เมื่อใช้เพลลิตเป็นหัวเชื้อ ตั้งต้นในอาหารเหลว complex medium ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 ⁰ C ณ ชั่วโมงที่ 24 (A), 48 (B), 72(C) และ 96(D) กำลังขยาย 200 เท่า	39
4.12 แสดงค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก (%) ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลิตลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที	41
4.13 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ก) และน้ำหนักรีดิวซ์ของรา (ข) ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลิตลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที	42
4.14 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลิตลงในถังหมัก ในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที	44
4.15 แสดงค่า pH ที่เวลาต่างๆหลังจากปลูกหัวเชื้อที่เป็นเพลลิตลงในถังหมักในการเลี้ยงรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตรในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30 ⁰ C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที	46
4.16 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3087 เมื่อใช้เพลลิตเป็นหัวเชื้อ ตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 ⁰ C ณ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ณ ชั่วโมงที่ 0 (A), 24 (B), 48(C) และ 72 (D)	49

- ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 100 เท่า
- 4.17 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของรา *A. oryzae* TISTR 3087 เมื่อใช้เพลเล็ตเป็นหัวเชื้อ 50
ตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30°C ณ
ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที ณ ชั่วโมงที่ 0 (A), 24 (B), 48(C) และ 72 (D)
ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 100 เท่า
- 4.18 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาและการย่อยตัวเอง(บริเวณที่ทำเครื่องหมาย)ของรา 51
A. oryzae TISTR 3087 เมื่อใช้เพลเล็ตเป็นหัวเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว complex medium
อัตราการให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30°C ณ ความเร็วรอบ 250 (A) และ 700 รอบต่อนาที
(B) ณ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนต่อก๊าซ
ไนโตรเจน($O_2:N_2$) ที่อัตราส่วน 50:50 กำลังขยาย 200 เท่า
- 4.19 แสดงค่าการละลายของออกซิเจน (%) ในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดย 53
ใช้ก๊าซออกซิเจนและก๊าซไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง
A. oryzae TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium
อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที
- 4.20 แสดงค่าน้ำหนักแห้ง (ก) และปริมาณน้ำคาร์บริวซ์ (ข) ในปรับสภาพบรรยากาศ 54
ภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ใน
การเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว
complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ
700 (■) รอบต่อนาที
- 4.21 แสดงกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซ 56
ออกซิเจนและไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087
ในถังหมัก ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหารเหลว complex medium อุณหภูมิ 30°C
การให้อากาศ 1 vvm ความเร็วรอบ 250(◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที
- 4.22 แสดงค่า pH ในปรับสภาพบรรยากาศภายในถังหมักโดยใช้ก๊าซออกซิเจนและ 59
ไนโตรเจน ($O_2:N_2$) ในอัตราส่วน 50:50 ในการเลี้ยง *A. oryzae* TISTR 3087 ในถังหมัก
ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร ในอาหาร complex medium อุณหภูมิ 30°C การให้อากาศ
1 vvm ความเร็วรอบ 250 (◆) และ 700 (■) รอบต่อนาที