



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสโดยวิธีทาคุจิจากกาก
เมล็ดสบู่ดำ ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง

Optimization of Protease and Lipases Production by Taguchi Method from *Jatropha*
Curcas Seed Cake in Solid State Fermentation

นามผู้วิจัย นายอำพล เลือดสงคราม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุสิทธิ์ ธนะพิมพ์เมธา, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ผ่องผาย พรรณวดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส
โดยวิธีทาคุชิจากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง

Optimization of Protease and Lipases Production by Taguchi Method from *Jatropha Curcas*
Seed Cake in Solid State Fermentation

โดย

นายอำพล เลือดสงคราม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2553

อำพล เลือดสงคราม 2553: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และไลเปสโดยวิธีทางจุลชีวจากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง ปริญญา วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุสิทธิ์ ธนะพิมพ์เมธา, D.Eng. 122 หน้า

งานวิจัยนี้ ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำ โดยนำมาเป็นวัสดุหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ โปรติเอสและ ไลเปส ด้วยรา 2 ชนิดคือ *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae* พบว่า การหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วยรา *Rhizopus oligosporus* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าการใช้รา *Aspergillus oryzae* คิดเป็น 71.30 เปอร์เซ็นต์ และการหมักกากเมล็ดสบู่ดำด้วย รา *Aspergillus oryzae* จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสสูงกว่ารา *Rhizopus oligosporus* คิดเป็น 10.47 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยรา *Rhizopus oligosporus* และผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติแบบ orthogonal array L²⁷ (3⁵) โดยพิจารณา 5 ปัจจัยคือ ความชื้นของวัสดุหมัก ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิในการหมัก ชนิดของ วัสดุหมัก และเวลาที่ใช้ในการหมัก จากการศึกษาพบว่า ที่ความชื้นของวัสดุหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณดินเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง เป็นสภาวะ ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยรา *Rhizopus oligosporus* โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 278 หน่วยต่อน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง หรือเพิ่มขึ้นเป็น 59 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่ได้ออกแบบการทดลอง และพบว่า ความชื้นของวัสดุหมักที่ 45 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณดินเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก อุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส เมื่อใช้วัสดุหมักเป็น กากเมล็ดสบู่ดำผสมกับ กากมันสำปะหลัง และเวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส ด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสเท่ากับ 14,108 หน่วยต่อน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง หรือเพิ่มขึ้นเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ยังไม่ได้ออกแบบการทดลอง

Ampon Luadsongkram 2010: Optimization of Protease and Lipase Production by Taguchi Method from *Jatropha Curcas* Seed Cake in Solid State Fermentation. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Anusith Thanapimmetha, D.Eng. 122 pages.

The utilization of *Jatropha curcas* seed cake as substrate for protease and lipase productions by *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* was investigated. The result showed that lipase activity from the fermentation of *R. oligosporus* was greater than *A. oryzae* by 71.30%. In contrast, protease activity from the fermentation of *A. oryzae* was greater than *R. oligosporus* by 10.47%. Therefore, the optimum conditions for lipase production by *R. oligosporus* and protease production by *A. oryzae* were further investigated using Taguchi method by orthogonal array L²⁷ (3⁵). In addition, five parameters: moisture content of substrate, inoculum size, fermentation temperature, substrate type and fermentation time were studied in this experiment. The result showed that the optimum condition of the lipase production by *R. oligosporus* was 50% moisture content of substrate, 15% inoculum, 35 °C incubation temperature and 84 hours of incubation time with *Jatropha curcas* seed cake as substrate which obtained 278 unit lipase/ g dry weight substrate. Moreover, lipase production increased 59% comparing to the non-experimental design. Furthermore, the optimum condition of the protease production by *A. oryzae* was 45% moisture content of substrate, 10% inoculum, 30 °C incubation temperature and 84 hours of incubation time with the substrate mixed of *Jatropha curcas* seed cake and cassava baggase at the ratio of 4 to 1 as substrate which obtained 14,108 unit protease/ g dry weight substrate. Likewise, the protease production increased 78% comparing with non-experimental design production.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุสิทธิ์ ฐนะพิมพ์เมธา ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่คอยดูแล ให้คำ แนะนำ และคำ ปรึกษาในการแก้ปัญหา ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดการศึกษาวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจ แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิทธิพันธ์ ท่อแก้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำแนะนำที่ รวมถึงแนวคิดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้จัดทำ

ขอขอบคุณนางสาวธิดาวรรณ ศรีจรูญ และ นายสุริยันต์ วรรณเลิศ นิสิตปริญญาตรีที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บริษัท ลัดดา จำกัด (นครปฐม) ที่ให้ความอนุเคราะห์ กากเมล็ดสับดูดำ มาเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการ และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี รวมถึง เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ าสตร (KURDI) ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านทุนวิจัยและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา -มารดา ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจ ให้เสมอมา จนสำเร็จ การศึกษา

อำพล เลือดสงคราม

มีนาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
สรุป	75
ข้อเสนอแนะ	77
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	80
ภาคผนวก	83
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและกาเตรียมสารเคมี	84
ภาคผนวก ข การสร้างกราฟมาตรฐาน	90
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	96
ภาคผนวก ง การออกแบบการทดลองและวิธีการคำนวณแบบทฤษฎี	104
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบของเมล็ดสับดูดำ	7
2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง	9
3 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าว	10
4 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ด้วยรา <i>Aspergillus oryzae</i>	41
5 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนด ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	42
6 $L_{27} (3^5)$ orthogonal array	43
7 ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตด้วยรา <i>Aspergillus oryzae</i>	59
8 ผลของการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	61
9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	62
10 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	65
11 ค่าจากการคำนวณและผลการยืนยันการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของค่า กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	66
12 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	67
13 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	69
14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	70
15 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	72
16 ค่าจากการคำนวณและผลการยืนยันการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของค่า กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 การเตรียมสารละลายแอล-ไทโรซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ	92
ข2 วิธีการเตรียมสารละลาย <i>p</i> -nitrophenol (pNP) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	93
ค1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	97
ค2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	98
ค3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Aspergillus oeyzae</i>	98
ค4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Aspergillus oeyzae</i>	99
ค5 ปริมาณกลูโคซามีนของวัสดุหมักโดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	99
ค6 ปริมาณกลูโคซามีนของวัสดุหมักโดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>Aspergillus oeyzae</i>	100
ค7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ	100
ค8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	101

สารบัญภาพ

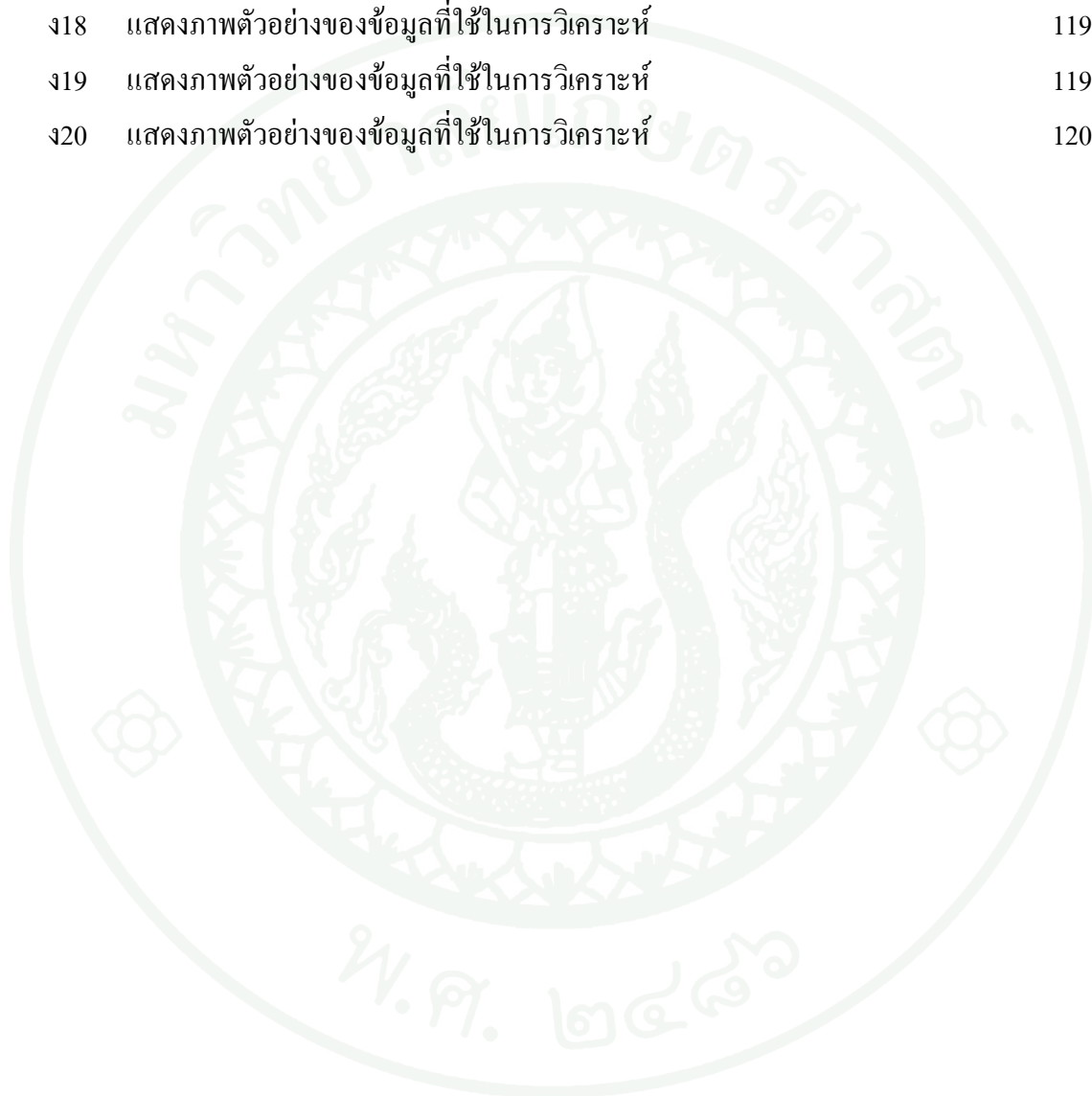
ภาพที่	หน้า
1 ผลของสบูดำเมื่อแก่เต็มที่	6
2 ประโยชน์ของสบูดำ	8
3 วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์	16
4 โครงสร้างของรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	17
5 รา <i>Aspergillus oryzae</i>	19
6 กากเมล็ดสบูดำ	35
7 กากมันสำปะหลัง	35
8 กากมะพร้าว	36
9 ก: ก่อนการคลุกให้เข้ากัน, ข: หลังการคลุกให้เข้ากัน	44
10 แผนผังแสดงการทดลอง	45
11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบูดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>R. oligosporus</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์	50
12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบูดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>R. oligosporus</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์	51
13 อัตราการเจริญจำเพาะที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบูดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>R. oligosporus</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์	53
14 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบูดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>A.oryzae</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์	55
15 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบูดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>A.oryzae</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	อัตราการเจริญจำเพาะที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสนูปดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา <i>A.oryzae</i> ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์	57
17	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	64
18	สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	71
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอสกราฟมาตรฐานในการกราฟ	92
ข2	มาตรฐานของ <i>p</i> -nitrophenol กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน วัสดุหมัก	94
ง1	แสดงการออกแบบการทดลองแบบ Taguchi	108
ง2	แสดงการกำหนดระดับและปัจจัย	109
ง3	แสดงการเลือก Taguchi Design	109
ง4	แสดงค่าปัจจัยและระดับที่ใช้ในการศึกษา	110
ง5	แสดงผลการออกแบบการทดลองและใส่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	110
ง6	แสดงการเลือก Define Custom Taguchi Design	111
ง7	แสดงการเลือกปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาใน Define Custom Taguchi Design	112
ง8	แสดงการเลือก Analyze Taguchi Design	112
ง9	แสดงการเลือกค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่จะใช้ในการวิเคราะห์	113
ง10	แสดงการเลือกฟังก์ชัน Graph	114
ง11	แสดงการออกแบบการทดลองแบบ Taguchi	114
ง12	แสดงการเลือกฟังก์ชัน Terms	115
ง13	แสดงการเลือกฟังก์ชัน Analysis Graphs	116
ง14	แสดงการเลือกฟังก์ชัน Options	116
ง15	แสดงการเลือกฟังก์ชัน Storage	117
ง16	แสดงกด OK เพื่อให้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	117
ง17	แสดงกราฟ Main Effects Plot (data means) for SN ratios	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง18 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์	119
ง19 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์	119
ง20 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์	120



การหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสโดยวิธีทาคุจิ จากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง

Optimization of Protease and Lipases Production by Taguchi Method from *Jatropha curcas* Seed Cake in Solid State Fermentation

คำนำ

สบู่ดำนั้นจัดได้ว่าเป็นพืชน้ำมันที่เป็นทางเลือกสำคัญในการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง เพื่อเป็นพลังงานทางเลือกใหม่เนื่องจากน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลรอบต่ำได้ ซึ่งเป็นลักษณะของเครื่องยนต์การเกษตร น้ำมันสบู่ดำยังมีปริมาณค่าน้อยกว่าน้ำมันดีเซล และไม่มีผลกระทบต่อเครื่องยนต์ นอกจากนี้ราคาน้ำมันสบู่ดำ ไม่แปรปรวนเหมือนพืชน้ำมันอื่นเนื่องจากไม่ใช่ น้ำมันที่ใช้บริโภคเป็นอาหาร (สุกัญญา, 2007)

ผลผลิตที่ได้จากสบู่ดำต่อพื้นที่ 10,000 ตารางเมตรจะให้เมล็ดสบู่ดำ 2,500 กิโลกรัม เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของไขมันที่มีอยู่ในเมล็ดสบู่ดำ 40-50 เปอร์เซ็นต์ (Akintayo, 2004) เมื่อสกัดน้ำมันออกพบว่าจะได้กากเมล็ดสบู่ดำ 1,000 กิโลกรัมต่อ 10,000 ตารางเมตร ซึ่งกากเมล็ด สบู่ดำนี้ไม่สามารถ บริโภคหรือใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากเป็นพืชที่มีพิษ (Mahunta *et al.*, 2008) ฉะนั้นการพัฒนาเพื่อนำกากเมล็ดสบู่ดำนั้นมาใช้ประโยชน์จึงเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่ง

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่อยู่ในเมล็ดสบู่ดำพบว่าองค์ประกอบหลักที่พบคือไขมันและโปรตีนประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Munch and Kiefer, 1986) งานวิจัยนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกากเมล็ดสบู่ดำมาผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนั้นเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนและไขมันตามลำดับ ส่วนการผลิตเอนไซม์นั้นสามารถผลิตได้จากการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) เนื่องจากการหมักแบบแห้ง จะสามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากเมื่อเทียบกับการผลิตในรูปแบบอื่น เช่น เมื่อเปรียบเทียบกับ การหมักแบบเปียก (submerged fermentation) การหมักแบบแห้งสามารถทำได้ง่ายกว่า ลงทุนต่ำ มีความสามารถในการผลิตสูง ใช้พลังงานต่ำกว่า ใช้น้ำน้อยกว่าทำให้เกิดของเสียปริมาณน้อย ไม่ต้อง

ควบคุมตัวแปรมากนัก ตลอดจนสามารถควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย เป็นต้น (Panday *et al.*, 2000)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ใช้อย่างโปรตีน ได้ถูกใช้เป็นตัวสกัดในทางอุตสาหกรรม คิดเป็นร้อยละ 60 ของโลกเมื่อเทียบกับเอนไซม์ ตัวอื่นๆ (Rao , 1998) เอนไซม์ โปรติเอส สามารถนำไปใช้ทางอุตสาหกรรมได้หลายประเภท อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรม ทำความสะอาด และอุตสาหกรรมหนัง เป็นต้น (Laxman and Sonawane , 2005) ซึ่งในปัจจุบัน ประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์โปรติเอสจากต่างประเทศเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่ใช้อย่างไขมันสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้านด้วยกัน อาทิ ด้าน อุตสาหกรรมอาหาร (Arnold *et al.*, 1975) ใช้ในการผลิตกรดไขมันแทนการผลิตกรดไขมันทางเคมี (Linfield *et al.*, 1984) อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ตลอดจนอุตสาหกรรมหนัง เป็นต้น (Seitz, 1974)

กระบวนการหมักแบบแห้ง เป็นระบบการหมักที่อาศัยการเจริญ ของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพที่ไม่มีน้ำอิสระอยู่ในระบบ น้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับวัสดุหมัก เท่านั้น (วรารุติและรุ่งนภา ,2532) กระบวนการ หมักแบบแห้งได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตซีอิ๊ว การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ เป็นต้น การที่ จุลินทรีย์จะสามารถนำสารอาหารจากวัสดุหมักมาใช้ได้ จุลินทรีย์จะต้องผลิตเอนไซม์ออกมาเพื่อใช้ย่อยสลายวัสดุหมัก ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็น โมเลกุลขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เพื่อการเจริญของเซลล์ได้

โครงการวิจัย นี้จึงมีความสนใจ ศึกษา การนำกากเมล็ดสบู่ดำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่ง นับเป็นการนำของเสียจากอุตสาหกรรมมาใช้เพื่อก่อให้เกิดมูลค่า โดยงาน วิจัยนี้จะนำกากเมล็ดสบู่ดำ มาเป็น วัสดุหมัก ในการหมักแบบแห้งด้วยราสองชนิดคือ *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งราทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส (Pandey *et al.*, 2000) โดยจะศึกษาผลของปัจจัยที่มี ต่อการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสและไลเปส เช่น ความชื้นของวัสดุหมัก ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิ วัสดุ ของวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก โดยอาศัย การออกแบบการทดลอง (experimental design) ซึ่งวิธีที่นำมาใช้คือ ทากูชิ (Taguchi) ซึ่งเป็นวิธีการที่ช่วยลดจำนวนครั้งในการทดลองได้อย่างมาก และสามารถหาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้ยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในอุตสาหกรรมเอนไซม์

ของไทย ถ้าหากสามารถผลิตขึ้นเองได้ภายในประเทศ ก็จะเป็นการลดต้นทุนในอุตสาหกรรมอื่นที่มี
การใช้เอนไซม์โปรติเอสและไลเปส



วัตถุประสงค์

1. ศึกษาและเปรียบเทียบ การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากสบู่ดำที่ผ่านการสกัดน้ำมันออก ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง ด้วยรา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae*
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae* และผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rhizopus oligosporus* โดยอาศัยการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูจิ

ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยกากเมล็ดสบู่ดำ โดยกากเมล็ดสบู่ดำได้มาจากการสกัดด้วยวิธีบีบอัด (screw press) และนำไปตากแดดก่อนนำไปใช้ในการทดลอง โดยใช้รา 2 ชนิดคือ *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 10^{10} และ 10^9 ตามลำดับ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม ในแต่ละจุลินทรีย์ ในการหมัก จากนั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้วิธีของ Keay และ Wildi (1970) และค่ากิจกรรมเอนไซม์ เอนไซม์ ไลเปส โดยใช้วิธีของ Hoshino (1992) จากนั้นเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิด ในแต่ละจุลินทรีย์ จากนั้นเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้สูงสุด เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูจิ ต่อไปโดยมีสภาวะที่ศึกษาคือ ความชื้นในการหมัก ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิในการหมัก เวลาในการหมัก ชนิดของวัสดุหมักคือกากเมล็ดสบู่ดำ 100 เปอร์เซ็นต์ กากเมล็ดสบู่ดำผสมกากมันสำปะหลัง(80:20) กากเมล็ดสบู่ดำผสม กากมะพร้าว (80:20) โดยกากมันสำปะหลังได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ส่วนกากมะพร้าวได้จากการสกัดกะทิ

การตรวจเอกสาร

วัสดุหมัก

งานวิจัยนี้ได้ ศึกษาถึงการใช้วัสดุหมัก ต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ ได้แก่ กากเมล็ดสบู่ดำ กาก มันสำปะหลัง และกากมะพร้าว แต่เน้นการใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสบู่ดำ เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการเพิ่มมูลค่าให้กับกากเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งกากเมล็ดสบู่ดำไม่สามารถนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ได้เหมือนกับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดอื่นๆ เนื่องจากความเป็นพิษของเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งมีรายละเอียดเกี่ยวกับสบู่ดำมีดังนี้

1. เมล็ดสบู่ดำ

เมล็ดมีลักษณะกลมรี มีสีดำน้ำตาล แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.6 กรัม ดังภาพที่ 1ก ในเมล็ดสบู่ดำยังมีสารพิษรุนแรงและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์คือ curcin, curcasin, phytosterols, resin และสารในกลุ่ม phorbol esters ทำให้มีผลต่อระบบทางเดินอาหารและการหายใจ แต่ทั้งนี้ประโยชน์หลักของเมล็ดสบู่ดำคือการนำไปสกัดเพื่อให้ได้น้ำมัน โดยองค์ประกอบที่อยู่ในเมล็ดสบู่ดำนั้นส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยไขมัน และโปรตีน ดังตารางที่ 1 ในการสกัดน้ำมันสบู่ดำนั้น มีวิธีการสกัดที่ต่างกันไป แต่ที่นิยม ทำกันมากคือ วิธีการบีบอัด ซึ่งสามารถใช้เครื่องอัดไฮดรอลิก หรือเครื่องอัดเกลียว โดยปริมาณน้ำมัน ที่ได้ นั้น ขึ้นอยู่กับแรงอัด โดยทั่วไปแล้วเมล็ด สบู่ดำ 1 กิโลกรัม มีประมาณ 1,300 – 1,500 เมล็ด (อนุวัฒน์, 2550) ถ้าเป็นการใช้เครื่องบีบอัดในการสกัด สามารถสกัดน้ำมันที่มีอยู่ในเมล็ดได้ประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำมันตกค้างอยู่ในกาก 10-15 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดสบู่ดำ 4 กิโลกรัม สามารถสกัดน้ำมันสบู่ดำได้ 1 ลิตร (วรพล, 2551) ดังแสดงในภาพที่ 1ข ซึ่งเป็นกากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว



ก.

ข.

ภาพที่ 1 ก. คือผลของเมล็ดสับดำเมื่อแก่เต็มที่
 ข. คือเมล็ดสับดำที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว

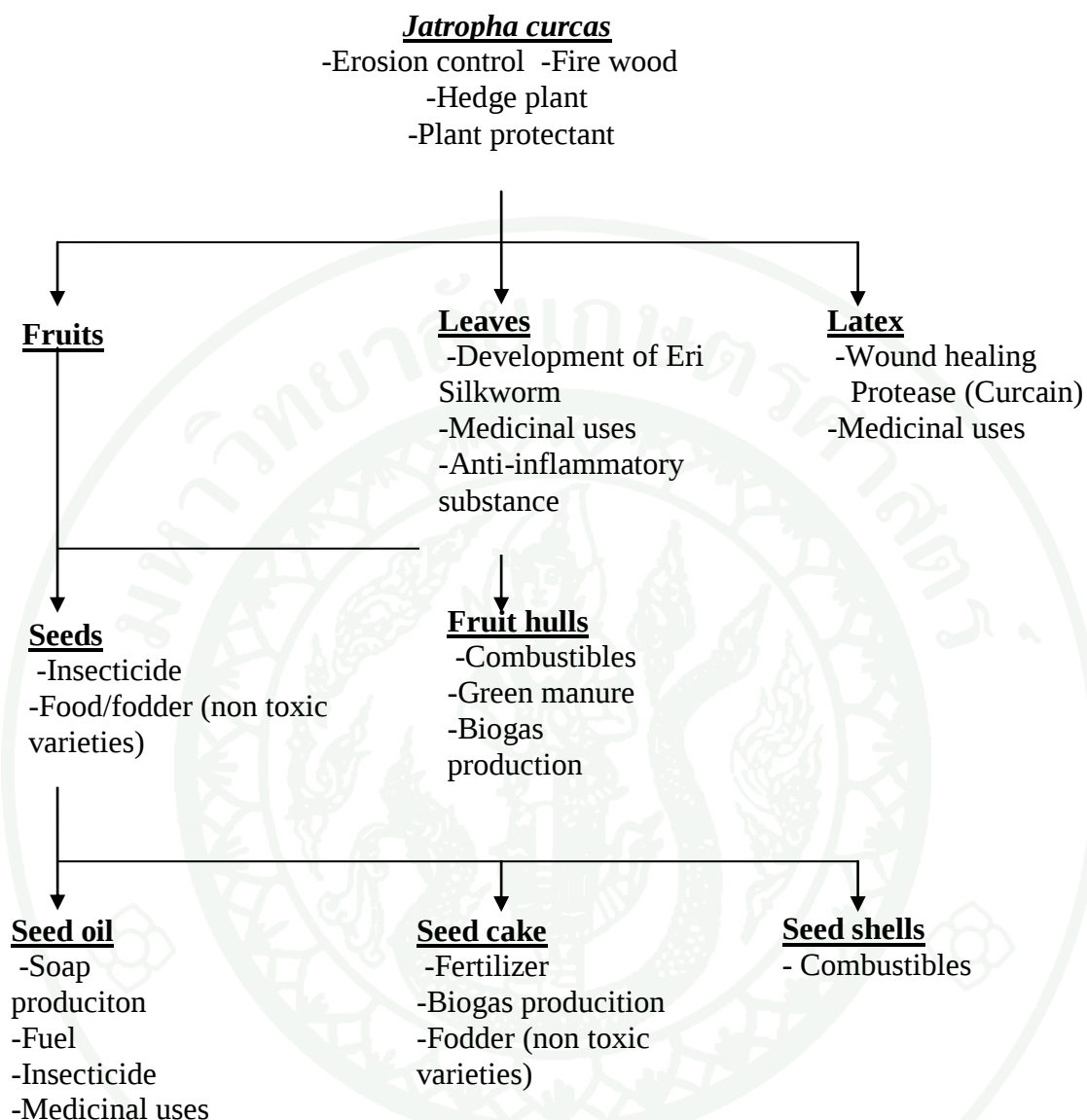
1) การใช้งานของเมล็ดสับดำ

ทุกส่วนของลำต้นรวมทั้งเมล็ดของสับดำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายดังแผนภาพที่ 2 นอกจากนี้ รากของต้นสับดำ สามารถนำไปต้มเป็นยาแก้ท้องเสีย ใช้ทานวดถูแก้ปวดตามข้อ (อวยพร, 2548) ซึ่งใบและเปลือกไม้ สามารถนำมาฉีกหรือต้มไปรับประทานได้อย่างปลอดภัย ส่วนเปลือกไม้สามารถนำมาสกัดแทนนิน ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังได้ เมล็ดของสับดำยังใช้เป็นยาระบาย แต่ถ้ารับประทานเกินขนาดอาจทำให้เกิดอันตรายได้ ทั้งนี้เนื่องจากในเมล็ดมีสารที่เรียกว่า เคอร์ซิน (curcin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดพิษเช่นเดียวกับไรซิน (ricin) ในละหุ่ง ซึ่งไม่เหมาะในการนำไปเลี้ยงสัตว์ ทั้งนี้ ประโยชน์หลักของสับดำ คือการนำไปสกัดเป็นน้ำมันสับดำ เพื่อใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง ตลอดจนนำไปทำสบู่

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของเมล็ดสับดำ

องค์ประกอบ	(เปอร์เซ็นต์)
ไขมัน	45.91 - 48.59
โปรตีน	23.20 - 26.00
เส้นใย	9.60 - 10.64
ความชื้น	5.34 - 5.74
เถ้า	4.36 - 4.64
คาร์โบไฮเดรต	7.99

ที่มา: Akintayo (2004)



ภาพที่ 2 ประโยชน์ของสบู่ดำ

ที่มา: Gubitz *et al.* (1999)

นอกจากกากเมล็ดสบู่ดำที่ใช้เป็นวัสดุหลักในการหมักแล้ว ยังมีวัสดุหมักอีก 2 ชนิดที่ใช้ในการหมักคือ กากมันสำปะหลังและกากมะพร้าว โดย คาดหวังว่าวัสดุหมักทั้งสอง ชนิดจะสามารถเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน และเสริมให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้ในปริมาณสูง ดังรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

2. กากมันสำปะหลัง

ในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังที่เหลือจากกระบวนการซึ่งถูกแยกออกมาในระหว่างกระบวนการ สกัดและบีบอัด สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยปกติกากมันสำปะหลังสดจะมีความชื้นประมาณ 75 – 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบางครั้งจะนำไปตากแดดก่อนการจำหน่าย กากมันสำปะหลังเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลัง และมีน้ำหนักคิดเป็น 25 – 32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักของหัวมันสำปะหลังสดที่นำมาผลิตแป้งมันสำปะหลัง (ทรงศักดิ์, 2543)

องค์ประกอบ ส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลัง คือ คาร์โบไฮเดรต และยังมีโปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า สถานที่ปลูกยังมีผลต่อองค์ประกอบในกากมันสำปะหลัง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์
แป้ง	74.45
ความชื้น	13.03
เถ้า	1.36
โปรตีน	1.77
เส้นใย	8.20
ไขมัน	0.18

ที่มา: ชลดา (2546)

3. กากมะพร้าว

กากมะพร้าวเป็นผลพลอยได้จากการคั้นกะทิ โดยปกติแล้วกากมะพร้าวสามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากกากมะพร้าวมี ปริมาณเยื่อใยสูง จึงสามารถนำไปใช้ได้เล็กน้อยในสูตรอาหาร สัตว์ ตลอดจนมีไขมันสูงซึ่งทำให้เกิดการหื่น ได้ง่าย และยังเป็นประเภทไขมันอิ่มตัว จากปริมาณของเยื่อใยที่มีสัดส่วนในปริมาณสูง จึงทำให้กากมะพร้าวเป็นวัสดุทางการเกษตรที่สามารถเพิ่มความพรุนได้ดี (Ramachandran *et al.*, 2003)

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมะพร้าวคือ โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุ ต่างๆปริมาณต่ำ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ได้

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าว

องค์ประกอบ	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)
ความชื้น	10
โปรตีน	21
ไขมัน	6
เยื่อใย	12
เถ้า	7
แคลเซียม	0.20
ฟอสฟอรัส	0.20

ที่มา: สารานุกรม (2547)

การหมัก

กระบวนการหมักในอุตสาหกรรม หมายถึง กระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ทางชีวเคมีของอินทรีย์สาร โดยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ เอนไซม์ทำให้อินทรีย์สารสลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์หรือมีค่าทางเศรษฐกิจ ผลิตภัณฑ์ในที่นี่อาจ เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่หรือได้จากการย่อยสลายทางชีวเคมีก็ได้ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศเต็มที่ให้อากาศเพียงเล็กน้อย หรือปราศจากอากาศก็ได้

1. ขั้นตอนพื้นฐานของการหมัก

สามารถแบ่งได้เป็น 4 ขั้นตอนคือ

- 1) การเตรียมต้นเชื้อ เป็นการเตรียมจุลินทรีย์ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก และจุลินทรีย์นั้นต้องแข็งแรงพอที่จะสามารถเจริญได้ในวัสดุหมัก รวมทั้งต้องปราศจากจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการ
- 2) การเตรียมวัตถุดิบ เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบ หรือ (substrate) ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์
- 3) การหมัก เป็นการนำวัสดุหมัก และต้น เชื้อที่เตรียมไว้มาถ่ายลงสู่ถังหมัก และทำการปรับสภาวะถังหมักให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น การเติมอากาศ การกวน การควบคุมอุณหภูมิ การปรับค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น
- 4) การแยกผลิตภัณฑ์และ การทำให้บริสุทธิ์ เป็นกระบวนการ แยกผลิตภัณฑ์หลังจาก การหมักเสร็จแล้วออกจากวัสดุหมัก โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น การกรอง การเหวี่ยงเหินศูนย์กลาง การตกตะกอน การสกัดด้วยตัวทำละลาย การระเหย การทำให้แห้ง เป็นต้น เมื่อแยกผลิตภัณฑ์ได้แล้ว จึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ หรือแบบแลกเปลี่ยนไอออน โครมาโตกราฟีแบบเจล

2. การหมักแบบแห้ง

ประเภทของการหมักสามารถแบ่งได้หลายประเภท ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน เช่น แบ่งตามความต้องการอากาศ แบ่งตามสภาพ การควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ แบ่งตาม กระบวนการที่ใช้ และแบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่ เติมลงไป ในกระบวนการหมัก ใน งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้การหมักในประเภทของการแบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่ เติมลงไปในการหมักหมัก ก็คือ การหมักแบบแห้ง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

การหมักแบบ แห้ง เป็นกระบวนการหมัก ซึ่งไม่มีน้ำอิสระเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ ลักษณะของน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักแบบนี้จะมีสภาพความ ชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับ วัสดุหมัก เท่านั้นและการเจริญของจุลินทรีย์จะหยุด ชะงักลงถ้าปริมาณความชื้นของ วัสดุหมักมีประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมัก ที่ใช้มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้น้อย มีปริมาณ มาก สามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และสารอาหาร ที่เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งโ ตรเจน วิตามินใน ปริมาณ มาก การหมักแบบแห้งส่วนใหญ่เหมาะสำหรับราที่สร้างเส้นใย ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด (Hesseltine ,1977)

ตัวอย่างของการหมักแบบแห้ง เช่น ในประเทศญี่ปุ่นทำการผลิตโคจิ โดยใช้การหมักด้วยรา *Aspergillus oryzae* ประเทศอินเดียผลิตเท มเป้ โดยใช้ถั่วบดเป็นวัตถุดิบโดยใช้รา *Rizopus oligosporus* นอกจากนี้ ยังมีอุตสาหกรรมพอกยาปฏิชีวนะ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ และอาหาร เสริมต่าง ๆ (Shuler et al., 2002) เป็นต้น

3. ลักษณะของการหมักแบบแห้ง

แบ่งตามลักษณะของการหมักแบบแห้งทั่วไปตาม Hesseltine (1977) ดังนี้

1) วัสดุหมักที่นิยมใช้หมักต้องเป็นวัสดุหมักที่หาได้ง่าย ราคาถูก ซึ่งส่วนใหญ่ เป็นผลผลิต และผลพลอยได้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ข้าวโพด รำข้าวสาลี ชานอ้อย เป็นต้น หรือได้จากผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น กากน้ำตาล หางนม เยื่อกระดาษ เป็นต้น (Raimbault, 1998)

2) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ น้ำ นอกจากนี้คือ เกลือแร่ และวิตามินอื่นๆ เช่น เหล็ก ไนโตรเจน หรือ แคลเซียม เป็นต้น

3) การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการในระหว่างการหมักแบบแห้งลดน้อยลง เนื่องจากความชื้นระบบค่อนข้างต่ำ จึงเหมาะสมกับการเจริญของรา แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ในระหว่างการหมักแบบแห้งมักเกิดปัญหาความร้อนสะสม อยู่มา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิในระบบไม่ให้สูงเกินไปจนเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้

4. ข้อดีและข้อเสียของการหมักแบบแห้ง

1) ข้อดี

อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์สามารถเตรียมได้ง่าย ใช้พื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มากนัก ซึ่งเครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยาก และไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนต้นทุนเชื้อที่ใช้ อยู่ในรูปของ สปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับเตรียมเชื้อ ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้สภาพการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น รา ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้มีระยะเวลาการปรับตัว (lag phase) ของจุลินทรีย์นั้นสั้นลง ผลผลิตแห้งที่ได้สามารถสกัดออก ได้โดยตรง โดยใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก สภาพ การปนเปื้อนเกิดขึ้นเนื่องจากมีความชื้นต่ำ ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย (วรารุณี, 2529)

2) ข้อเสีย

การหมักแบบแห้งมีข้อจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (โดยส่วนใหญ่เป็นรา นอกจากนั้นได้แก่ ยีสต์ แบคทีเรีย และ สเตรปโตมัยซีตบางสายพันธุ์) ซึ่งจุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ และการหมักแบบแห้งมีปัญหาในด้านการสะสมของความร้อนเมื่อหมักในปริมาณมาก ซึ่งเกิดจากกระบวนการเผาผลาญอาหารของจุลินทรีย์ มีผลทำให้ อุณหภูมิในระบบเพิ่มสูงขึ้น และไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์รวมไปถึงการทำงานของ เอนไซม์ และมีผลจากวัสดุหมักมีค่าการนำความร้อนค่อนข้างต่ำ ทำให้การถ่ายเทความร้อนออกจาก วัสดุหมักเกิดขึ้นได้ยาก

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักดังที่กล่าวไว้ในเนื้อหาของการหมัก ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์นั้น จะขึ้นกับลักษณะและชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้จุลินทรีย์ประเภทรา ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทั่วไปของรา

รา เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต คือสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถจำแนกออกได้ว่าส่วนไหนเป็นลำต้น ราก หรือใบ ไม่มีระบบท่อน้ำ ท่ออาหารเหมือนพืชชั้นสูง ไม่มีคลอโรฟิลล์แต่มีผนังเซลล์ ปกติพบว่าเคลื่อนที่ไม่ได้ นอกจากพวกเซลล์ที่ทำหน้าที่สืบพันธุ์ มีการสืบพันธุ์โดยสปอร์ ส่วนมากเป็นเส้นใยแตกกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์มีนิวเคลียส

รา มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) แต่ละเส้นเรียกว่า ไฮฟา (hypha) เมื่ออยู่รวมกับเส้นอื่นรวมเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) นอกจากนี้อาจมีรูปร่างแบบอื่นๆ คือ ในราชั้นต่ำมีรูปร่างเป็นก้อนกลม หรือ แดกแขนง มีไรซอยด์ (rhizoid) เป็นตัวยึดกับอาหารและดูดอาหาร ส่วนในพวกราเมือก จะมีรูปร่างไม่แน่นอนมีรูปร่างคล้ายอะมีบา ส่วนประกอบที่สำคัญอีกส่วนหนึ่งนอกจากไมซีเลียมคือ สปอร์ ซึ่งมีขนาด รูปร่าง สี แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของรา (ปัญญาดี, 2539)

เส้นใยของรามีการเจริญได้สองทิศทาง ในตามขวางจะเจริญไปอย่างเต็มที่แล้วจึงหยุดเจริญ ส่วนการเจริญตามยาวของเส้นใยจะขยายยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัดราบเท่าที่สภาวะแวดล้อมยังเหมาะสม ราบางชนิดจะมีการเจริญของเส้นใยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 15 เมตร เส้นใยที่มารวมกันเป็นไมซีเลียมจะประกอบด้วยสองส่วน ส่วนแรกเป็นไมซีเลียมที่ยึดเกาะกับอาหาร ทำหน้าที่ดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ส่วนที่สองเป็นไมซีเลียมที่ยื่นไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ (พิไลพรรณ, 2525)

2. การสืบพันธุ์ของรา

ราส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ สปอร์ของราที่พบส่วนใหญ่เป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ แต่มีราบางชนิดที่สามารถสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศด้วย

1) การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ กล่าวคือ ราที่สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นจำนวนมาก มีขนาดเล็ก เบา และทนต่อความแห้ง สามารถแพร่กระจายไปโดยลม และเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมจะงอกและเติบโตต่อไป

2) สปอร์แบบอาศัยเพศ กล่าวคือ ราบางชนิดสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ แต่พบน้อยกว่าไม่อาศัยเพศ สปอร์แบบนี้เกิดจากการรวมตัวกันของนิวเคลียสของเซลล์สองเซลล์ การรวมตัวกันนี้แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ พลาสโมแกมี (plasmogamy) เป็นการรวมตัวของไซโทพลาซึมเข้ามาอยู่ด้วยกัน ให้นิวเคลียส 2 อันอยู่ใกล้กัน เรียกเซลล์ที่มีนิวเคลียสทั้งสองรวมกัน ได้เป็นดิพลอยด์ ไซโกต ในราชันสูงระยะที่ 1 และ 2 ห่างกันมาก จึงมีช่วงไคคาริออนนาน ระยะที่ 3 ไมโอซิส ได้เฮพลอยด์นิวเคลียส 4 อัน

3. การเจริญของจุลินทรีย์

การเจริญของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (สารโจนและประวิทย์, 2538)

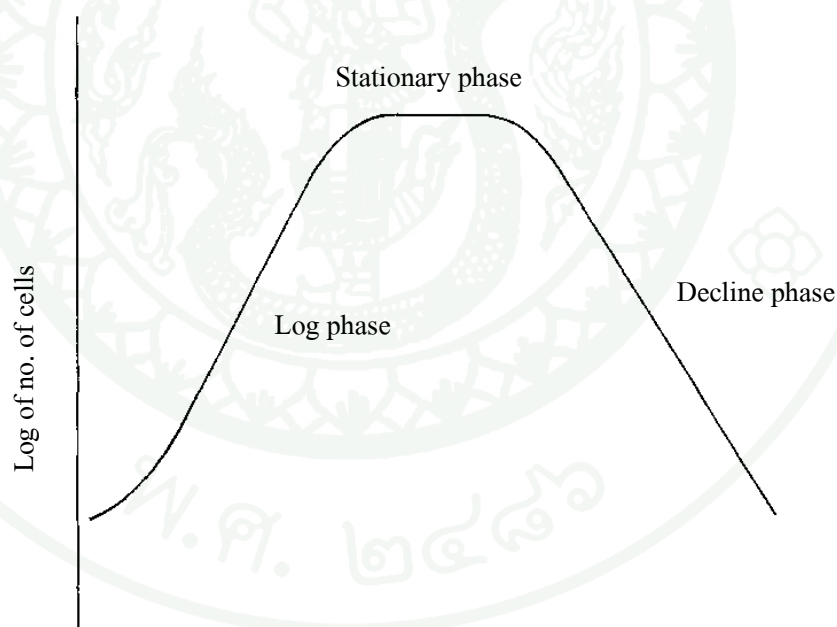
1) ระยะปรับตัว (lag phase) จุลินทรีย์ที่ถูกเติมลงไปเป็นครั้งแรก จะไม่มีการเจริญและแพร่พันธุ์ แต่จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ในช่วงนี้อัตราการขยายขนาด (rate of growth) สูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (rate of multiplication) ในกระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จระดับอุตสาหกรรมแล้ว ระยะปรับตัวของจุลินทรีย์นี้จะถูกกำหนดให้มีช่วงระยะเวลาสั้นที่สุด โดยอาศัยปัจจัยช่วย คือ อายุ ความเข้มข้น และปริมาณของส่าหมัก (inoculum) ที่ถูกต้องตลอดจนสารช่วยการเติบโต (growth factors) และสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ในช่วงท้ายของระยะปรับตัวเซลล์จะมีการแบ่งตัวประมาณ 4-5 ครั้ง ก่อนเข้าสู่ช่วงระยะการเติบโตต่อไป เรียกระยะนี้ว่า ระยะเร่งตัว (acceleration phase) ดังแสดงดังภาพที่ 3

2) ระยะเติบโตทวีคูณ (logarithmic or exponential phase) เป็นระยะที่การเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในสภาพสมดุล (balance growth) เรียกระยะนี้ว่า ระยะคงที่ (steady state period) แต่ความเป็นจริงสภาวะนี้เป็นเพียงทฤษฎีเท่านั้น เพราะในทางปฏิบัติสภาวะเช่นนี้ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากส่วนประกอบและขนาดของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาในระหว่างการหมักสภาวะเช่นนี้จึงเป็นสมมติฐานที่เกิดขึ้นและสามารถรักษาให้คงที่ได้ในระยะเจริญทวีคูณเท่านั้น ในตอน

ทำอาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ หมกหรือสภาวะแวดล้อมรอบจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม มีการสะสมสารพิษ จากกระบวนการเมตาบอลิซึมมากขึ้น ดังนั้นอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จึงต่ำลง การเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หรือเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ก็ได้ ซึ่งช่วงนี้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มจะลดลง โดยที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เรียกช่วงนี้ว่า าระยะถดถอย (deceleration or retardation phase)

3) ะยะคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงที่จำนวนเซลล์ค่อนข้างคงที่ที่จุดสูงสุด เพราะเป็นระยะที่อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับอัตราการตายของเซลล์ จำนวนเซลล์จึงมีค่าคงที่ ซึ่งระยะนี้มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ

4) ะยะตาย (death or declining phase) ระยะนี้เซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว อัตราการเพิ่มของเซลล์ต่ำกว่าอัตราการตาย รวมทั้งมีการแตกของเซลล์เกิดขึ้นด้วย



ภาพที่ 3 วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

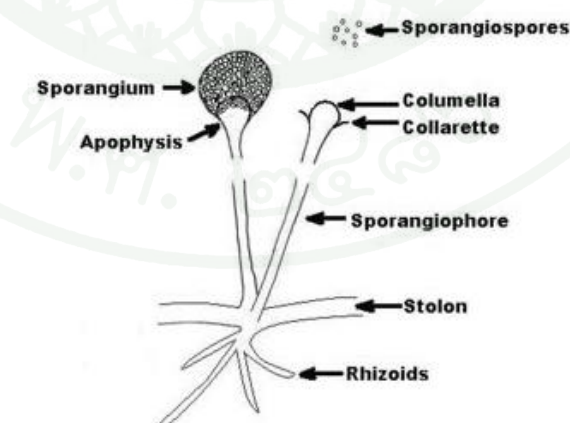
ที่มา: วราวุฒิ (2529)

4. รา *Rhizopus oligosporus*

รา *Rhizopus oligosporus* เป็นราที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมัก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการหมักแบบแข็ง เช่น การใช้เป็นจุลินทรีย์ในการผลิตเทมเป้ โดยใช้วัสดุหมักคือกากถั่วเหลือง เนื่องจากการใช้ ราชนิดนี้ในการผลิต จะทำให้ได้เทมเป้ที่มีคุณภาพดี (Fakultas *et al.*, 1992) นอกจากการผลิตเทมเป้แล้ว รา *Rhizopus oligosporus* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลาย ชนิด เช่น ไลเปส ฟอสฟาเตส โปรเนส เอ็นโดเซลลูเลส ไซเลนเนส อะราบิเนส เป็นต้น (Wang and Hessesltine, 1965)

ลักษณะของรา *Rhizopus oligosporus* เป็นราที่มีโครงสร้าง เป็นเส้นใย โดยเส้นใยจะมีกา รเพิ่มจำนวนและ รวมกลุ่มกันจนมีขนาดใหญ่และมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเรียกว่า ไมซีเลียม ซึ่งมีลักษณะคล้ายฟู้ายแผ่กระจายเต็มภาชนะนี้เรียกว่า fluffy (Frazier, 1967) เส้นใยของราชนิดนี้เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกัน ทำให้เส้นใยมีลักษณะเป็นท่อทะลุถึงกันโดยตลอดหรือเป็นเซลล์ที่ยาวและมีหลายนิวเคลียส โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 4 (Bilgrami Verma, 1978)

เส้นใยของราชนิดนี้ มีการเจริญได้สองทิศทางคือ ตามขวางและตามยาว ในตามขวางจะเจริญได้อย่างเต็มที่และจึงจะหยุดเจริญ ส่วนการเจริญตามขวาง เส้นใยจะขยายออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัดราบเท่าที่อาหารและสภาวะยังเอื้อต่อการเจริญ (Bilgrami Verma, 1978)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของรา *Rhizopus oligosporus*

ที่มา: สมใจ (2550)

ราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ ซึ่งถือเป็นสารเมแทบอลิซึมที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของรา โดยชนิดของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นในระหว่างเจริญจะขึ้นกับชนิดของวัสดุหมักที่ใช้ เนื่องจากราจะสร้างเอนไซม์และขับออกมานอกเซลล์เพื่อช่วยย่อยวัสดุหมักซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ตัวอย่างเช่น เมื่อเลี้ยงราบางชนิดบนวัสดุหมักที่เป็นแป้ง จะสามารถตรวจพบผลผลิตของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยแป้ง ได้แก่ อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรือแอลฟาอะไมเลส เป็นต้น (Reid, 1989) ทั้งนี้ปริมาณและประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ได้จากการหมักจะได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมอย่างมาก ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง ความชื้น และอุณหภูมิ

5. รา *Aspergillus oryzae*

ราสายพันธุ์พวก *Aspergillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มักพบอยู่ในพวกผักผลไม้ และแหล่งอาหารอื่นๆ ราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย รา *Aspergillus oryzae* มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในทางอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ เช่น การผลิตกรดซิตริก การหมักซีอิ๊ว การผลิตเอนไซม์ เช่น ไซเลนเนส อะไมเลส เซลลูเลส เบต้ากลูคาเนส และการผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

รูปร่างสัณฐานวิทยาของรา *Aspergillus oryzae* จะมีไมซีเลียมที่สามารถแตกแขนงได้และมีผนังกัน เซลล์จะจมอยู่ในอาหาร มีโคนิดิโอเฟอร์ (conidiophore) มีไฮฟาเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ซึ่งเกิดขึ้นที่ foot cell โคนิดิโอเฟอร์อาจจะมีหรือไม่มีผนังกันแบ่ง ที่ยอดของโคนิดิโอเฟอร์จะพองออกเป็นวิสิเคิล (vesicle) ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันไป และมี ก้านเล็กๆ โผล่ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เรียกว่า สตรีกมาต้า (Carlsen *et al.*, 1996) ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 รา *Aspergillus oryzae*

ที่มา: สมใจ (2550)

รา *Aspergillus oryzae* ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางเพราะเป็นราที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิต โคจิ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลสได้สูง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไลเปส และอินเวอร์เทส (Panday *et al.*, 2000)

ราชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (Francis *et al.*, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานของ Ramachandran *et al.*, (2003) โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของรา *Aspergillus oryzae* ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ เนื้อมะพร้าวเป็นวัสดุหมัก นอกจากนั้นยังพบว่า หากอุณหภูมิเพิ่มเป็น 45 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลงถึง 3 เท่า เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดอันตรายต่อเส้นใยและระบบเมตาบอลิซึมของรา ทำให้ราตายได้

เอนไซม์

เอนไซม์จัดเป็นสารอินทรีย์ประเภทโปรตีน ที่มีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตของพืชและสัตว์ ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของกรรมวิธีทางชีววิทยา เช่น การย่อยอาหาร เป็นต้น เอนไซม์ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในกรรมวิธีการผลิตในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมประเภทอาหารและเครื่องดื่ม แหล่งของเอนไซม์เชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ มักได้มาจากจุลินทรีย์เช่น รา ยีสต์ สเตรปโทมัยซิส และแบคทีเรีย

สิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ได้แก่ จุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ (สมใจ, 2550) ดังนี้

- 1) จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ ได้ในปริมาณมากๆ และใช้ระยะเวลาสั้น โดยใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็ก จึงใช้พื้นที่น้อย นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก และผลิตได้ตลอดเวลาโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล
- 2) การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ ทำได้โดยวิธีการง่ายๆ และใช้เวลาไม่นานนัก
- 3) จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันได้ แต่มีสมบัติบางอย่างต่างกัน จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม ในสภาวะที่แตกต่างกันได้ตามต้องการ
- 4) สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยการปรับปรุงพันธุกรรม หรือโดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น

1. เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสสามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ไลเปสได้รับความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทั้งทางด้านสรีรวิทยา และการนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยมีน้ำ

เข้าร่วมทำปฏิกิริยา (hydrolysis) นอกจากเอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยสลายไขมันที่มีโค รงสร้างทางเคมีจำเพาะเจาะจงแล้ว เอนไซม์ไลเปสยังสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับความ ต่างกันของสารตั้งต้น

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon *et al.*, 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มี ความเป็นกรดต่ำ ที่เหมาะสมต่อการ ทำงานในช่วงที่ เป็นด่างอ่อนๆ แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น (Malcata *et al.*, 1992) ส่วน ไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงความเป็นกรดต่ำ ที่เป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยง ลูกด้วยนม สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่ำ 5.6-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงกรดต่ำ ที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และ ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและ สัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gilbert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับ สารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำกัมน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของ เอนไซม์ได้ (Malcata *et al.*, 1992)

การใช้งานเอนไซม์ไลเปส

- 1) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมัก เพราะเอนไซม์ไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่น รส ให้แก่อาหารนั้นๆให้มีกลิ่น รส เฉพาะตัวเช่น การผลิตชีสโกแลตนม และเนยแข็ง เป็นต้น
- 2) ใช้ในอุตสาหกรรมการแพทย์ โดยใช้เป็นตัว ทำลายไขมันตามท่อน้ำ เครื่องมืออุปกรณ์ แพทย์ต่างๆ
- 3) ใช้ในอุตสาหกรรมความสะอาด เช่น ผสมผงซักฟอก ซึ่งช่วยย่อยไขมันที่อยู่ในเนื้อผ้า ที่มาจากเหงื่อไคล โดยเฉพาะสำหรับผ้าฝ้ายและลินิน

4) ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ เช่นนำมาใช้ในการผลิต isopropyl myristate, isopropyl palmitate และ 2-ethyhexyl palmitate ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับร่างกาย เช่น ครีมทาผิว และครีมกันแดด

5) ใช้ในอุตสาหกรรมผลิต สารเคมี เช่นนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันแทนกระบวนการผลิตกรดไขมันทางเคมี เพราะการผลิตกรดไขมันทางเคมีใช้ความร้อนและความดันสูง ซึ่งมีผลให้กรดไขมันที่ผลิตได้มีสีคล้ำและมีการสลายของสารที่ไม่ต้องการ ผลิตกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ

2. เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ของสารจำพวกโปรตีน จึงมักถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อย โปรตีน (นิลวรรณ, 2548) โดยย่อย โปรตีน ให้กลายเป็น สารโมเลกุลเล็กๆ เอนไซม์หลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสและสามารถแบ่งออกเป็นประเภทย่อยๆ ได้อีก โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่ง ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนใน วัสดุหมัก ที่มีโครงสร้างซับซ้อนต่างๆ เอนไซม์ต่างชนิดกันจะย่อยพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน

เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ พืชที่สามารถนำมาสกัดเอนไซม์โปรติเอสเช่น มะละกอ สับปะรด และถั่วเหลือง เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากพืชนั้นมีหมู่ sulfhydryl ตรงบริเวณเร่งเป็นสมบัติเฉพาะ เอนไซม์ที่ผลิตจากพืชเช่น เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์ไซโมปาเปน เอนไซม์โบรมิเลน หรือสามารถสกัดโปรติเอสได้จากสัตว์จำพวกเลี้ยงลูกด้วยนมเช่น รกสัตว์ เอนไซม์ที่ผลิตได้จากสัตว์ส่วนมากในตอนแรกจะอยู่ในรูปที่ไม่เร่งปฏิกิริยา (proenzyme) จนกว่าอยู่ในสถานะที่เอนไซม์เริ่มทำงานเช่น ได้รับความเป็นกรดจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร คือ ความเป็นกรดต่ำ จะเริ่มต่ำลง ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูป active ซึ่งสามารถทำงานได้ดีใน ความเป็นกรดต่ำๆ เรียกเอนไซม์ประเภทนี้ว่า endoprotease เช่น ปาเปน ทริปซิน เป็นต้น การใช้งานเอนไซม์โปรติเอสเช่น ทำให้เนื้ออ่อน การผลิตเบียร์ เบเกอรี่ หรืออุตสาหกรรมที่ย่อยโปรตีน ฟอกหนัง หรือ ยารักษาโรค (เป็นตัวย่อยเตรียมการย่อย) (Anwar and Saleemuddin, 1998)

นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสยังสามารถผลิตพวกจุลินทรีย์ต่างๆแต่มีแค่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้เพราะให้ผลได้ (yield) จากการผลิตที่สูงและ

เอนไซม์ที่ผลิตได้จะออกมาอยู่นอกเซลล์ ทำให้สามารถสกัดแยกได้ง่าย ไม่ได้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วอยู่ในเซลล์จึงไม่ต้องทำการแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ ใช้ผลิตได้เช่น แบคทีเรีย (*Bactobacillus lichenniformis*) รา (*Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavor*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Niger*) หรือพวกยีสต์เป็นต้น (นิลวรรณ, 2548)

การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส (นิลวรรณ, 2548)

1) ใช้ในการผลิตเนยแข็ง ใช้เอนไซม์เรนเนส ใส่ลงไปในส่วนน้ำนมเพื่อให้ เคซีนตกตะกอนจับตัวเป็นก้อน ความจริงเอนไซม์เรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากกระเพาะที่สี่ของลูกวัว แต่มักมีไม่เพียงพอในการผลิตเนยแข็ง จึงมีการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากราที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ เรนเนส จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ คือ *Mucor persillus*

2) ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์ เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรม ฟอกหนังสัตว์สมัยก่อนใช้เอนไซม์แพนเครติน แต่ในปัจจุบันใช้เอนไซม์ alkaline protease ที่ผลิตจากแบคทีเรีย

3) อุตสาหกรรมอาหารอื่นๆเอนไซม์โปรติเอสใช้ในการทำขนมปังเพื่อช่วยให้มีคุณภาพดีขึ้น ถ้าใส่ลงใน wheat gluten จะทำให้ขนมหวาน หรือทำให้ขนมปังกรอบเค็มมีรสชาติดีขึ้น ส่วนในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์มักใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อป้องกันการขุ่นของเบียร์

4) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่น ในการเตรียมโคจิ สำหรับการทำ มิโสะ (miso) และชีอิ้ว มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจากราเพื่อช่วยในกระบวนการหมัก หรือใช้ในการทำให้เนื้อนุ่ม โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อให้เนื้อมีความอ่อนนุ่ม เช่น เอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์ ปาเปนจากราและแบคทีเรีย

5) ใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ ใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียในอุตสาหกรรมปลาป่นเพื่อผสมเลี้ยงสัตว์และผลิต fish soluble เพื่อช่วยในการย่อยและการดูดซึมอาหารของสัตว์ดีขึ้น ส่วนธัญพืชที่สัตว์กินนั้นจะผสมด้วยเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และเซลลูโลส

6) ใช้ในกระบวนการอื่นๆ เอนไซม์ alkaline protease จากแบคทีเรียใช้ผสมในผงซักฟอก ใช้ในกิจการล้างฟิล์ม มีเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดใช้เติมเป็นตัวย่อยอาหาร

การออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ

การออกแบบการทดลองเป็นวิธีทางสถิติด้านหนึ่งที่ดีได้ว่ามีประสิทธิภาพมาก ๆ ในแง่ของการปรับปรุงคุณภาพและการเพิ่มผลผลิต ผลลัพธ์ของการออกแบบการทดลอง จะช่วยให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อผลลัพธ์ของกระบวนการว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และถ้ามีความสัมพันธ์กัน มีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และถ้ามีความสัมพันธ์กัน มีความสัมพันธ์กันมากน้อยเพียงใด การออกแบบการทดลองต่างๆ ซึ่งจัดได้ว่าการออกแบบการทดลองต่างๆ ซึ่งจัดได้ว่าการออกแบบการทดลอง เป็นเทคนิคในการหาค่าผลลัพธ์ที่ดีที่สุด และนำมาผสมผสานกับการใช้เทคนิคการใช้เทคนิคทางคณิตศาสตร์เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดตามทฤษฎี (optimization theory) ให้ได้ค่าตัวแปรตอบสนองที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ

การออกแบบการทดลองแบบ ทาคุชิ มีแนวความคิดมาจาก Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ.1980 ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ที่ได้อุทิศเวลา ส่วนใหญ่ให้กับงานวิจัยทางด้านการพัฒนาคุณภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ การออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิเริ่มนำมาใช้เป็นครั้งแรกในการออกแบบการทดลองผลิตอุปกรณ์ การติดต่อสื่อสารทางอิเล็กทรอนิกส์ ได้แก่ โทรศัพท์ โทรสาร ซึ่งต่อมามีผู้นำแนวความคิดนี้มาปรับใช้หลายๆบริษัทในประเทศญี่ปุ่น ส่วนมากใช้ในงานทางด้านวิศวกรรม เนื่องจากวิธีนี้สามารถลดจำนวนการทดลอง ส่งผลให้ราคาการลงทุนต่ำ แต่ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการออกแบบการทดลองแบบทาคุชิ มาประยุกต์ใช้ในหลายๆด้าน (Roy, 2001)

เทคนิคในการหาสถานะที่เหมาะสมที่สุดโดยการใช้วิธีทาคุชิ มีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนการทดลองของปัจจัยดังกล่าว โดยใช้การวางปัจจัยที่ต้องการ ศึกษาแบบ orthogonal array สำหรับ outer array และ inner array และนำข้อมูลของตัวแปรที่ต้องการทดลอง (design variable) และตัวแปรรบกวน (noise variable) มาจัดวางลงในการทดลองเพื่อคำนวณหาค่าตอบสนองที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการออกแบบการทดลองของทาคุชิสามารถวิเคราะห์ผลการทดลองโดย แปลงรูปแบบค่าการตอบสนอง (response) อัตราส่วนหรือค่าที่ได้จากการเปลี่ยนรูปของค่าตอบสนอง (signal to noise ratio) จากนั้นจึงนำการเลือกตัวแปร ออกแบบให้ตรงกับค่าเป้าหมายมากที่สุด วิธี

ทางวิชาการออกแบบการทดลองโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al.*, 1951) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยการทดลองและระดับของตัวแปรในแต่ละการทดลอง มีหลายประเภทขึ้นกับจำนวนตัวแปรและระดับของตัวแปรนั้น

1. ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติ

ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001) ดังนี้

1.1) การวางแผนการทดลอง (planning experiment) เป็นขั้นตอนกำหนดจุดประสงค์ที่ต้องการ รวมทั้งพิจารณาตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ

1.2) การออกแบบการทดลอง (designing experiment) เป็นขั้นตอนของการกำหนดหรือเลือก OA ที่เหมาะสมกับระบบ รวมทั้งกำหนดตัวแปรและระดับของตัวแปร

1.3) การทดลอง (conducting experiment) เป็นขั้นตอนของการทำการทดลองตามสภาวะของตัวแปรและระดับของตัวแปรที่กำหนดใน Orthogonal array

1.4) การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analyzing experiment) เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลของตัวแปรและ ระดับของ ตัวแปร ว่า ตัวแปร ไດมีผลความสำคัญกับระบบ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ทำให้ได้ผลได้สูงที่สุด

1.5) การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming or predicted) เป็นขั้นตอนของการพิสูจน์ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้น มีความเหมาะสม และได้ผลๆได้ตามที่ต้องการจริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สภาวะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

ในการวิเคราะห์ผลโดยวิธีทางสถิติ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนซึ่งในการออกแบบการทดลอง (DOE) เป็นการกล่าวถึงการนำผลการทดลองมาวิเคราะห์เพื่อให้ได้ค่าที่ต้องการ และหลังจากผลการทดลองเสร็จสิ้นจะได้ค่าที่ต้องการจากสภาวะของสิ่งที่ทดลอง (treatment) ที่กำหนดได้ (Roy, 2001)

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลการทดลองของวิธีทางสถิติ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการวิเคราะห์อย่างง่าย ในส่วนนี้จะเป็นการวิเคราะห์ค่าที่ได้จากการคำนวณค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง และค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละปัจจัย การคำนวณในส่วนนี้จะรวมถึงการคำนวณค่าทางคณิตศาสตร์อย่างง่าย เพื่อช่วยสรุปผลได้ตรงตามวัตถุประสงค์ในการคำนวณส่วนแรกของวิธีทางสถิติสามารถอธิบาย ปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- อิทธิพลของปัจจัยหลัก
- สภาพที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการทดลอง
- การคาดหมายถึงสภาพที่เหมาะสมในการทดลอง

ในการคำนวณและการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติทั้งหมด สามารถคำนวณได้โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel หรือใช้โปรแกรม Qualitek-4 Software (QT4) ตลอดจนโปรแกรม MINITAB ในการวิเคราะห์ได้ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยคอมพิวเตอร์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ในส่วนแรกนี้ ต้องทำการกำหนด QC (quality characteristic) ขึ้นมาก่อน ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ กระบวนการ หรือระบบ ซึ่งการวัดค่านี้จะมาจากค่าตอบสนอง ผลการทดลอง output ของระบบ ซึ่ง QC แบ่งออกเป็น 3 แบบดังต่อไปนี้

1. QC = B Bigger is better คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่ามากที่สุด โดยคำนวณได้จากสมการที่ 1

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right) \quad (1)$$

2. QC = S Smaller is better คือค่าตอบสนองที่เราต้องการมีค่าน้อยกว่าค่าอื่น ๆ โดยคำนวณได้จากสมการที่ 2

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum y^2}{N} \right) \quad (2)$$

3. QC = N Nominal is better โดยในการวัดประเภทยี้มักจะกำหนดค่าที่เราต้องการ หรือ กำหนด ระดับที่ต้องการทำให้สำเร็จ เราเรียกว่าเป้าหมาย (target) หรือ nominal value สำหรับการเปรียบเทียบ คือ ผลการทดลองที่เบี่ยงเบนไปจากค่าเป้าหมายน้อยที่สุดจะดีที่สุด ซึ่งอาจจะเบี่ยงเบนไปทางบวกหรือลบนั้น จะขึ้นอยู่กับพิจารณาความสำคัญเป็นหลัก โดยคำนวณได้จากสมการที่ 3

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum (y - y_0)^2}{N} \right) \quad (3)$$

จากทั้งสามสมการ y , y_0 และ N หมายถึงผลการทดลอง ผลการทดลองที่กำหนด และ จำนวนการทดลองตามลำดับ

เมื่อเรากำหนด QC แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่า MSD ซึ่ง MSD คือ Mean Squared Deviation มี 2 ประเภท คือ

1) จะเป็นการเปรียบเทียบตัวอย่างเฉพาะของการทดลอง เปรียบเทียบจากการทดลองที่วัดได้โดยตรง

2) เป็นการเปรียบเทียบ MSD ของกลุ่มว่า target มีความผันแปรในระดับใด (ANOVA) ซึ่งการหาค่า MSD ประเภทแรกจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ (QC ของแต่ละประเภท) ดังสมการที่ (4)-(6)

$$QC = N ; MSD = [(y_1 - m)^2 + (y_2 - m)^2 + \dots (y_n - m)^2] / n \quad (4)$$

$$QC = S ; MSD = [(y_1^2 + y_2^2 + \dots (y_n^2)] / n \quad (5)$$

$$QC = B ; MSD = [(1/y_1)^2 + (1/y_2)^2 + \dots (1/y_n)^2] / n \quad (6)$$

ค่า MSD ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการคำนวณหาค่า signal to noise ratio แสดงออกมา ในรูปของการใส่ $\log_{10}$ ในค่า MSD ดังรูปสมการที่ (7)

$$S/N = -10 \log_{10} MSD \quad (7)$$

ค่า S/N ratio ใช้สูตรการคำนวณเหมือนกันในแต่ละ QC สามารถคำนวณจากโปรแกรมสำเร็จรูป QT4 หรือสามารถคำนวณ โดยใช้สูตรได้ เมื่อได้ค่า S/N ratio ของแต่ละ treatment นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟ เพื่อเปรียบเทียบค่า S/N ratio หาปัจจัยที่กำหนดจาก QC เช่นค่าที่มากที่สุด คือค่าที่ดีที่สุด เราจึงเลือกกระดับที่สูงที่สุดของแต่ละปัจจัย เป็นสถานะที่เหมาะสม และนำระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยมาทำการทดลองใหม่อีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางทฤษฎี และวิเคราะห์ค่าที่ได้จากการทำนายผลของ ทฤษฎี โดยใช้สมการที่ (8) ซึ่งจากการยืนยันผลการทดลอง จะต้องมามีค่าใกล้เคียงกับค่า Y_{expected} ที่คำนวณได้

$$Y_{\text{expected}} = (\text{MSD})^{1/2} \quad (8)$$

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์หาความแปรปรวนของผลการทดลอง การคำนวณในส่วนนี้ส่วนใหญ่สามารถทำการวิเคราะห์โดยคำนวณจากสูตรได้สะดวก รวมทั้งรูปแบบสี่เหลี่ยมจัตุรัส (squaring) และการถอดรากที่สอง การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) จะเป็นการคำนวณเพื่อใช้ในการสนับสนุนผลการทดลอง ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย และสังเกตค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

- 1) ความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ระหว่างความแปรปรวนของผลการทดลอง
- 2) การทดสอบนัยสำคัญของปัจจัยและปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอลัมน์ที่กำหนด
- 3) การหาช่วงความเชื่อมั่นของสถานะที่เหมาะสมจากการทดลอง
- 4) การหาช่วงความเชื่อมั่นภายในของปัจจัยหลักแต่ละปัจจัย
- 5) อธิบายปัจจัยที่ผิดพลาด ซึ่งประกอบด้วยอิทธิพลของปัจจัยทั้งหมด และปัจจัยที่ไม่รวมอยู่ในผลการทดลอง และผลของการทดลองที่ผิดพลาด

วิธีการคำนวณความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA)

วัตถุประสงค์หลักของการวิเคราะห์โดยใช้ตาราง ANOVA คือ ต้องการกำจัดผลจากความแปรปรวนของแต่ละปัจจัยออกไป ซึ่งมาจากผลของความแปรปรวนที่เราได้รับมาจากการทดลอง และสามารถอธิบายความแปรปรวนของแต่ละปัจจัย (หรือปฏิสัมพันธ์ระหว่างคอลัมน์) เพื่อให้ทราบว่า มีปัจจัยใด มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตมากกว่ากัน เป็นสาเหตุสำคัญของความแปรปรวนทั้งหมดที่สังเกตได้จากผลการทดลอง ซึ่งรูปแบบของความแปรปรวนบ่งบอกได้โดยการอธิบายในรูปแบบทางคณิตศาสตร์ ซึ่งสามารถนำค่าที่ได้ไปใช้ได้ หรืออาจพิจารณาได้จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

3. ข้อดีของวิธีทากูชิ

วิธีทากูชิสามารถใช้จำนวนการทดลองน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี one-factor-at-a-time และ full factorial combination ทำให้ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย สามารถบอกถึงปัจจัยที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ และกระบวนการผลิต ทำให้แก้ปัญหาได้เร็วและตรงจุดยิ่งขึ้น นอกจากนี้พบว่าวิธี ทากูชิสามารถนำมาใช้ในการวางแผนการทดลองของกระบวนการทางการเกษตรและกระบวนการทางชีวภาพ (Tsui, 1988)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mahunta *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาและทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PseA ด้วยการหมักแบบแห้งบนวัสดุหมักคือ กากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการหีบน้ำมันออกแล้ว โดยทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสคือ ค่าความชื้นเริ่มต้นในการหมัก ค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ของหนักรวสุมักแห้ง ค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 6 แหล่งไนโตรเจนคือ เปปโตน แหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลมอลโตส ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจะสูงสุดที่ ค่าความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ของหนักรวสุมักแห้ง ค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 7 แหล่งไนโตรเจนคือ โซเดียมไนเตรท แหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลมอลโตส ซึ่งพบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ สูงสุดคือ มอลโตสนั้น ช่วยให้สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเป็น 6.3 เท่าและช่วยให้สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเป็น 1.6 เท่า

Gaur *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาถึงความสามารถของเอนไซม์ไลเปสกับการทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรติเอส และทนต่อการสารตรึงผิวและรีเอเจนต์ต่างๆ ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PseA ด้วยการหมักแบบแห้งบนวัสดุหมักคือ กากเมล็ดสบู่ดำที่ผ่านการหีบน้ำมันออกแล้ว โดยทำการหมักกากสบู่ดำ ด้วย *Pseudomonas aeruginosa* PseA แล้วทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส พบว่าในระหว่างการหมักเมื่อค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก็จะเพิ่ม ขึ้นเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่า การหมักด้วย *Pseudomonas aeruginosa* PseA เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้สามารถต้านทานการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสได้ จากนั้นทำการศึกษาอิทธิพลของการสารตรึงผิวและรีเอเจนต์ต่างๆต่อเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ ยังสามารถทนต่อสารตรึงผิวและรีเอเจนต์ต่างๆได้อีกด้วย จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณการผลิตโดยใช้ RSM (Response Surface Methodology) ในการหาจุดเหมาะสมของการผลิตโดยใช้ Plackett-Burman design เพื่อแยกตัวแปร จะได้ตัวแปรที่ดีที่สุดคือ ทรีปโตน สารสกัดยีสต์ กำมะถัน และแมกนีเซียมซัลเฟต จากนั้นใช้ CCD (Central Composite Design) ซึ่งเป็นวิธีที่ละเอียดมากเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าค่ากิจกรรมไลเปสจะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ ทรีปโตน สารสกัดยีสต์ กำมะถัน และแมกนีเซียมซัลเฟต เป็น 1.01 เปอร์เซ็นต์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ 1.21 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก ตามลำดับ

Ul-Haq *et al.* (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยการหมักแบบแห้งโดยใช้เชื้อรา 10 ชนิด พบว่า *Rizopus oligosporus* GCBR-3 ให้ค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุด (48.0 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง จากสถานะการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุด โดยคัดเลือกราที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพสูงสุด การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักแบบแห้งที่ดีที่สุดได้แก่ เมล็ดพันธุ์อัลมอนต์บด จากวัสดุหมักหลายชนิด ปริมาณราที่ใช้หมัก สารที่ใช้สกัดหรือใช้เป็นตัวละลายและระยะเวลาในการหมัก โดยจะจับเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ และเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้นั้นมีปริมาณสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นอาจใช้ราที่ได้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

Pandey *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาและสำรวจเกี่ยวกับอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบแห้ง ซึ่งได้อธิบายข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับการผลิต อาทิ ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตในอุตสาหกรรมเอนไซม์ ซึ่งได้มีหลักการเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ว่า จุลินทรีย์ใดสามารถผลิตเอนไซม์อะไรได้บ้าง วัสดุหมักที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ด้วยการหมักแบบแห้ง ตลอดจนอธิบายเกี่ยวกับการผลิต ลักษณะการใช้งาน พัฒนาการเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์นั้นๆ อันได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไคลาเนส เอนไซม์ไซโลซิเนส เอนไซม์ลิกนินเนส เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์แพคติเนส เอนไซม์กาแลคโตซิเนส เอนไซม์กลูตามิเนส เอนไซม์อะไมเลส เป็นต้น จากการสำรวจพบว่า จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งสองชนิดคือ รา *Rizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae* บนวัสดุหมักที่แตกต่างกัน

Nahas (1988) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rizopus oligosporus* โดยทำการศึกษาการเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน อาทิ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส ทวีน เป็นต้น แหล่งไขมันเช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันจากเมล็ดฝ้าย ทวีน เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจน อาทิ แอมโมเนียมไนเตรท เคซีน กากถั่วเหลือง ยูเรีย เป็นต้น สถานะการบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 9 วัน พบว่า ในอาหารที่มี ทวีน และกากถั่วเหลือง ทำให้การเจริญของรา และการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น โดยสารพวกคาร์โบไฮเดรต มันมันพืช โปรตีน ไม่ช่วยในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส และพบว่าเชื้อมีการเจริญดีที่สุด 35-40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 4 วัน ส่วนการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีสถานะที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 3 วัน

สุนทร (2549) ได้ทดลองผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบแพนเบด โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกต้องการศึกษาอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการหมักโดยใช้รำข้าวเจ้าต่อรำข้าวสาลีในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าที่อัตราส่วนรำข้าวเจ้าต่อรำข้าวสาลีเป็น 75:25 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด เมื่อใช้แป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 5 วัน จากนั้นนำมาขยายผลต่อลงในแพนเบดโดยเปลี่ยนแปลงค่าความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 55 และ 65 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรม โปรติเอสเท่ากันและมีค่ามากกว่าที่ 60 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาความชื้นที่ 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ มาทดลองต่อโดยจะศึกษาเวลาในการเริ่มเติมอากาศในช่วงเวลาที่ 12 และ 24 เป็นระยะเวลานาน 5 วัน ที่ความเร็วอากาศเป็น 0.1 เมตรต่อวินาที พบว่าที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเริ่มให้อากาศในช่วงเวลาที่ 24 มีค่ากิจกรรมโปรติเอสมากที่สุด

ธรรธร (2549) ทดลองการหาวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งในระดับห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาค้นคว้าหาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของวัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ใช้ปริมาณต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* 5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ทำการเปรียบเทียบเมื่อใช้ ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 50 55 และ 60 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 7.83 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในช่วงเวลาที่ 96 ต่อมาทำการหมักด้วยวัสดุหมักต่างๆ ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน รำข้าวสาลี ถั่วเหลือง งา ถั่วลิสง รำละเอียด อย่างละ 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อ งาเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ และวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อถั่วเหลืองเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 55 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุดเป็น 1.97 (ในช่วงเวลาการหมักที่ 48) และ 7.83 4.85 3.34 2.13 0.58 และ 2.21 (ในช่วงเวลาการหมักที่ 96) และ 5.42 (ในช่วงเวลาการหมักที่ 72) ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ

ธีรวัช และ ภาสนันท์ (2548) ได้ทำการทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย *Aspergillus oryzae* โดยการหมักแบบแห้ง โดยใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวเจ้าต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วนเป็น 3:1 , 1:1 และ 1:3 ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาสัดส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอส โดยใช้รา *Aspergillus oryzae* 0.3 เปอร์เซ็นต์ แป้งสาลี 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า

เมื่อใช้วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวเจ้าต่อรำข้าวสาลีเป็น 1:1 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก มีค่ากิจกรรม เอนไซม์อะไมเลสเป็น 10,908 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนัก วัสดุหมักแห้ง ส่วนการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าวัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวเจ้าต่อรำข้าว สาลีเป็น 3:1 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก มีค่ากิจกรรม เอนไซม์โปรติเอสเป็น 909 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และพบว่าปริมาณดินเชื้อที่สามารถ ผลิตเอนไซม์ โปรติเอสในระดับห้องปฏิบัติการได้มากที่สุดคือ รา *Aspergillus oryzae* 3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1) รา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 (ATCC22959) มีความเข้มข้นของสปอร์ เท่ากับ 10^{10} สปอร์ต่อกรัม เพื่อให้เราสามารถเจริญบนวัสดุหมักและผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ โดยทำการวัดความเข้มข้นสปอร์ด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

2) รา *Aspergillus oryzae* มีชื่อทางการค้าว่า Ozykat-1 มีความเข้มข้นของสปอร์ต้นเชื้อ เท่ากับ 10^9 สปอร์ต่อกรัม โดยตั้งชื่อจากคุณราตรี มงคลวัย จังหวัด อ่างทอง

2. วัสดุหมัก

1) วัสดุหมัก คือ กากเมล็ดสบู่ดำ ที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว นำไปตากแดดเพื่อไล่ความชื้นที่อยู่ในกากเมล็ดสบู่ดำ เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในเบื้องต้น จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดลอง ในการทดลองนั้น กากเมล็ดสบู่ดำต้องผ่านกระบวนการปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่น โดยนำกากเมล็ดสบู่ดำไปทำการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นเชื้อ ก่อนทำการถ่ายต้นเชื้อ ลงในกากสบู่ดำ ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากเมล็ดสบู่ดำจากบริษัทลัดดา จำกัด (นครปฐม)



ภาพที่ 6 กากเมล็ดสนุ่นดำ

2) กากมันสำปะหลัง โดยปกติกากมันสำปะหลังมักจะมีความชื้นสูง ก่อนการใช้งานจะต้องนำไปทำให้ความชื้นมีค่าลดลงก่อน และจากนั้นปรับเพื่อให้ได้ความชื้นตามที่ต้องการ การเก็บรักษา กากมันสำปะหลังจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญบนกากมันสำปะหลัง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กากมันสำปะหลัง

3) กากมะพร้าว เป็นส่วนที่ได้จากสกัดน้ำกะทิออก ถ้าหากทิ้งไว้ที่อุณหภูมิปกติที่ความชื้นสูง จะทำให้เกิดกลิ่นหืน ฉะนั้นก่อนการทดลองควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญบนกากมะพร้าว เช่นเดียวกับกากเมล็ดสบู่ดำและ กากมันสำปะหลัง กากมะพร้าวที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ชื้อจากตลาดสดบางเขน ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 กากมะพร้าว

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์

- 1) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2) บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 150, 250 และ 1,000
- 3) หลอดทดลองขนาดกลาง และขนาดใหญ่ มิลลิลิตร
- 4) ปิเปต และออดิเปต
- 5) กระดาษกรอง
- 7) ถาดสแตนเลส
- 8) แท่งแก้วคน
- 9) ช้อนตักสาร
- 10) กรวยกรอง
- 11) สำลี
- 12) ขาง
- 13) ตู้เย็น

- 14) ตู้แช่แข็ง
- 15) ถังพลาสติก
- 16) กระดาษฟอยล์
- 17) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 18) เครื่องให้ความร้อน
- 19) เทอร์โมมิเตอร์
- 20) นาฬิกาจับเวลา
- 21) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น LM6100 บริษัท Mettler Toledo ประเทศ
สวิตเซอร์แลนด์
- 22) ตู้อบลมร้อน Memmert air รุ่น 500 , ประเทศเยอรมัน
- 23) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BL210S ยี่ห้อ Sartorius บริษัท Goettingen
ประเทศเยอรมนี
- 24) หม้อนึ่งความดันมาเชื้อ speedy autoclave-vertical type รุ่น HL-340
- 25) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส รุ่น Memmert IPP 400 บริษัท Schwabach
ประเทศเยอรมัน
- 26) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น SBD 50 – Cold ยี่ห้อ Heto บริษัท Scientific
promotion ประเทศไทย
- 27) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น Anthekie advanced บริษัท
Secomam ประเทศฝรั่งเศส
- 28) เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Moisture analyzer) รุ่น AMB 50 บริษัท Adam Equipment
ประเทศอังกฤษ
- 29) เครื่องวัดค่า ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 420A ยี่ห้อ Orion ประเทศ
สหรัฐอเมริกา
- 30) เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น KMC-1300V บริษัท Vision ประเทศเกาหลี

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 1) มันฝรั่ง
- 2) น้ำกลั่น
- 3) Agar
- 4) Iodine
- 5) Kasine
- 6) Tween 80
- 7) Dextrose
- 8) Toluene
- 9) Acetic acid
- 10) L-tyrosine
- 11) Folin reagent
- 12) Sodium acetate
- 13) Potasium iodide
- 14) Hydrochloric acid
- 15) Sodium hydroxide
- 16) Sodium hydroxide
- 17) Sodium carbonate
- 18) Trichloroacetic acid
- 19) Gum arabic ethanol
- 20) Sodium deoxycholate
- 21) Acetyl acetone reagent
- 22) Dibasic sodium phosphate
- 23) Monobasic sodium phosphate
- 24) Para-dimethylaminobenzaldehyde

วิธีการ

1. ศึกษาและเปรียบเทียบการใช้ รา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสับดูดำ โดยวิธีการหมักแบบแห้ง

1) ศึกษา การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสับดูดำ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

นำกากเมล็ดสับดูดำ ซึ่งวัสดุหมักลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 25 กรัม น้ำหนักแห้ง แล้วนำมา ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก ปิดปากขวดด้วยสำลี และหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีก นำไปทำการปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 1.4 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นถ่ายสปอร์ต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ลงไป 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และปริมาณกลูโคซามีน

2) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสับดูดำ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae*

นำกากเมล็ดสับดูดำ ซึ่งวัสดุหมักลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 25 กรัม น้ำหนักแห้ง แล้วนำมา ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก ปิดปากขวดด้วยสำลี และหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์อีก นำไปทำการปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 1.4 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นถ่ายสปอร์ต้นเชื้อรา *Aspergillus oeyzae* ลงไป 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัสดุหมักทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และปริมาณกลูโคซามีน

จากนั้นเปรียบเทียบผลของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ในจุลินทรีย์ที่ 2 ชนิด เพื่อหาว่าชนิดใดเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดใด เมื่อใช้วัสดุเป็นกากเมล็ดสนับดำและนำผลการทดลองที่ได้ ไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

2. การออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีทาคุชิ (Taguchi)

1) การออกแบบการทดลองเพื่อ การผลิตเอนไซม์ โปรติเอส จากกากเมล็ดสนับดำ ด้วยรา *Aspergillus oryzae*

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเอกสารที่เกี่ยวข้องต่างๆ ตลอดจนการพิจารณาจากการสังเกตในระหว่างการทดลอง จึงได้เลือกปัจจัยที่คาดว่าจะ จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้รา *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีจำนวน 5 ปัจจัยประกอบด้วย ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิ ชนิดของวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก โดยแต่ละปัจจัยจะมี 3 ระดับ แสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งวิธีทาคุชิจะแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง ปัจจัย และระดับของปัจจัย ในรูปของ Orthogonal Array ที่ประกอบด้วย 5 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ สามารถใช้ Orthogonal Array แบบ $L_{27}(3^5)$ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองทั้งหมด 27 การทดลอง ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะมีระดับของปัจจัย และปัจจัยที่ต่างกันไปได้ ดังแสดงในตารางที่ 6

เมื่อออกแบบการทดลองแล้ว ทำการทดลองตามที่ออกแบบได้ โดยชั่งวัสดุหมักปริมาณ 25 กรัมในสัดส่วนต่างๆคือ วัสดุผสมระหว่างกากเมล็ดสนับดำต่อกากมะพร้าว และวัสดุผสมระหว่างกากเมล็ดสนับดำต่อกากมันสำปะหลัง ในสัดส่วน 80:20 ปริมาณ 25 กรัม และกากเมล็ดสนับดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำวัสดุหมักในแต่ละพลาสติก มาปรับความชื้นเริ่มต้น เป็น 45 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละลำดับการทดลอง ตามลำดับ ปิดด้วยจุกสำลีและฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 1.4 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นถ่ายดินเชื้อรา *Aspergillus oryzae* จำนวน 1 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมัก ในแต่ละลำดับการทดลอง ตามลำดับคลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียสในแต่ละลำดับการทดลองตามลำดับ ในตู้บ่ม เป็นเวลานาน 108 ชั่วโมง หรือ 5 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมัก ก็น้ำชั่วโมงที่ 84 96 และ 108 ในแต่ละลำดับการทดลองตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

ตารางที่ 4 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนด ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae*

ปัจจัย	ระดับของปัจจัย		
	1	2	3
A. ความชื้นเริ่มต้น(เปอร์เซ็นต์)	45	50	55
B. ปริมาณดินเชื้อ(เปอร์เซ็นต์)	1	5	10
C. อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	25	30	35
D. ชนิดของวัสดุหมัก (สัปดาห์, เปอร์เซ็นต์)	กากเมล็ดสับดูดำ	กากเมล็ดสับดูดำต่อ กากมะพร้าว	กากเมล็ดสับดูดำต่อ กากมันสำปะหลัง
	100	80:20	80:20
E. เวลาในการหมัก(ชั่วโมง)	84	96	108

2) การออกแบบการทดลองเพื่อ การผลิตเอนไซม์ผลิตเอนไซม์ไลเปส จากกากเมล็ดสับดูดำด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ในการศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้ศึกษาจากเอกสารที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนการพิจารณาจากการสังเกตในระหว่างการทดลอง จึงได้เลือกปัจจัยที่คาดว่า จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สุด ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้รา *Rhizopus oligosporus* ซึ่งมีจำนวน 5 ปัจจัย ประกอบด้วย ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิชนิดของวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก โดยแต่ละปัจจัยจะมี 3 ระดับ แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งวิธีทางสถิติจะแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนการทดลอง ปัจจัย และระดับของปัจจัย ในรูปของ Orthogonal Array ที่ประกอบด้วย 5 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ สามารถใช้ Orthogonal Array แบบ $L_{27}(3^5)$ ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองทั้งหมด 27 การทดลอง ซึ่งแต่ละชุดการทดลองจะมีระดับของปัจจัย และปัจจัยที่ต่างกัน ไป ดังแสดงในตารางที่ 6

เมื่อออกแบบการทดลองแล้ว ทำการทดลองตามที่ออกแบบได้ โดย ชั่งวัสดุหมักปริมาณ 25 กรัมในสัดส่วนต่างๆคือ วัสดุผสมระหว่างกากเมล็ดสับดูดำต่อกากมะพร้าว และวัสดุผสมระหว่างกากเมล็ดสับดูดำต่อกากมันสำปะหลัง ในสัดส่วน 80:20 ปริมาณ 25 กรัม และกากเมล็ดสับดูดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำวัสดุหมักในแต่ละพลาสติกมาปรับความชื้นเริ่มต้น เป็น 45 50 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ในแต่ละลำดับการทดลองตามลำดับ ปิดด้วยจุกสำลีและฟอยล์ นำไป

ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ด้วยความดัน 1.4 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นถ่ายต้นเชื้อรา รา *Rhizopus oligosporus* จำนวน 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ในแต่ละลำดับการทดลอง ตามลำดับ คลุกให้เข้ากันกับวัสดุหมักด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียสในตู้บ่ม เป็นเวลานาน 84 ชั่วโมง หรือ 4 วัน เก็บตัวอย่างวัสดุหมักในชั่วโมงที่ 60 72 และ 84 ในแต่ละลำดับการทดลอง ตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

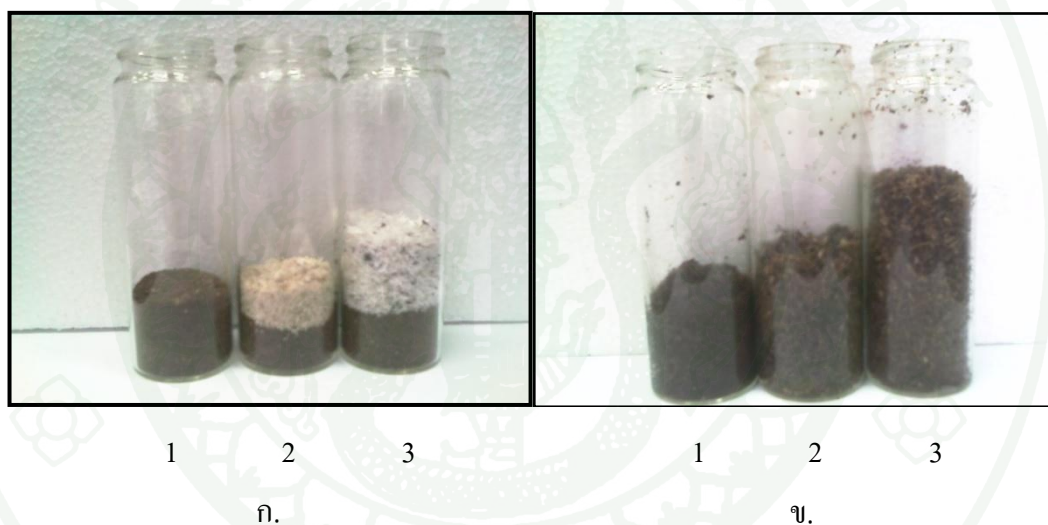
ตารางที่ 5 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนด ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ปัจจัย	ระดับของปัจจัย		
	1	2	3
A. ความชื้นเริ่มต้น(เปอร์เซ็นต์)	45	50	55
B. ปริมาณต้นเชื้อ(เปอร์เซ็นต์)	5	10	15
C. อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	25	30	35
D. ชนิดของวัสดุหมัก (สัดส่วน, เปอร์เซ็นต์)	กากเมล็ดสับดูดำ	กากเมล็ดสับดูดำต่อ กากมะพร้าว	กากเมล็ดสับดูดำ ต่อ กากมันสำปะหลัง
E. เวลาในการหมัก(ชั่วโมง)	60	72	80:20 84

ตารางที่ 6 $L_{27}(3^5)$ orthogonal array คัดแปลงจาก Ross (1996)

การทดลอง	ปัจจัย					การทดลอง	ปัจจัย				
	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
1	1	1	1	1	1	15	2	2	1	3	3
2	1	1	1	1	2	16	2	3	1	2	1
3	1	1	1	1	3	17	2	3	1	2	2
4	1	2	2	2	1	18	2	3	1	2	3
5	1	2	2	2	2	19	3	1	3	2	1
6	1	2	2	2	3	20	3	1	3	2	2
7	1	3	3	3	1	21	3	1	3	2	3
8	1	3	3	3	2	22	3	2	1	3	1
9	1	3	3	3	3	23	3	2	1	3	2
10	2	1	2	3	1	24	3	2	1	3	3
11	2	1	2	3	2	25	3	3	2	1	1
12	2	1	2	3	3	26	3	3	2	1	2
13	2	2	3	1	1	27	3	3	2	1	3
14	2	2	3	1	2						

สาเหตุในงานวิจัยที่ศึกษาความแตกต่างของวัสดุหมักคือ กากเมล็ดสับดำ กากเมล็ดสับดำผสมกากมันสำปะหลัง กากเมล็ดสับดำผสมกากมะพร้าว เนื่องจากลักษณะของ กากเมล็ดสับดำ มีขนาดของอนุภาคที่ละเอียด เมื่อทำการเติมน้ำเพื่อปรับความชื้นลงไปแล้วจะทำให้เนื้อของวัสดุหมักอัดตัวกันแน่นขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีแนวทางในการใส่วัสดุเพิ่มความพรุนคือ กากมะพร้าวแล้ว กากมันสำปะหลังลงในวัสดุหมัก จากภาพที่ 9 นั้นเป็นตัวอย่างการใส่วัสดุเพิ่มความพรุนลงในการกากสับดำในอัตราส่วน กากเมล็ดสับดำ 100 เปอร์เซ็นต์ และกากเมล็ดสับดำต่อวัสดุเพิ่มความพรุน 80: 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการคลุกให้เข้ากัน โดย 1 คือ กากเมล็ดสับดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน 2 และ 3 คือกากเมล็ดสับดำที่เติมกากมันสำปะหลังและ กากมะพร้าว ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละชุดการศึกษาจะมีน้ำหนักรวมของวัสดุหมักเท่ากัน

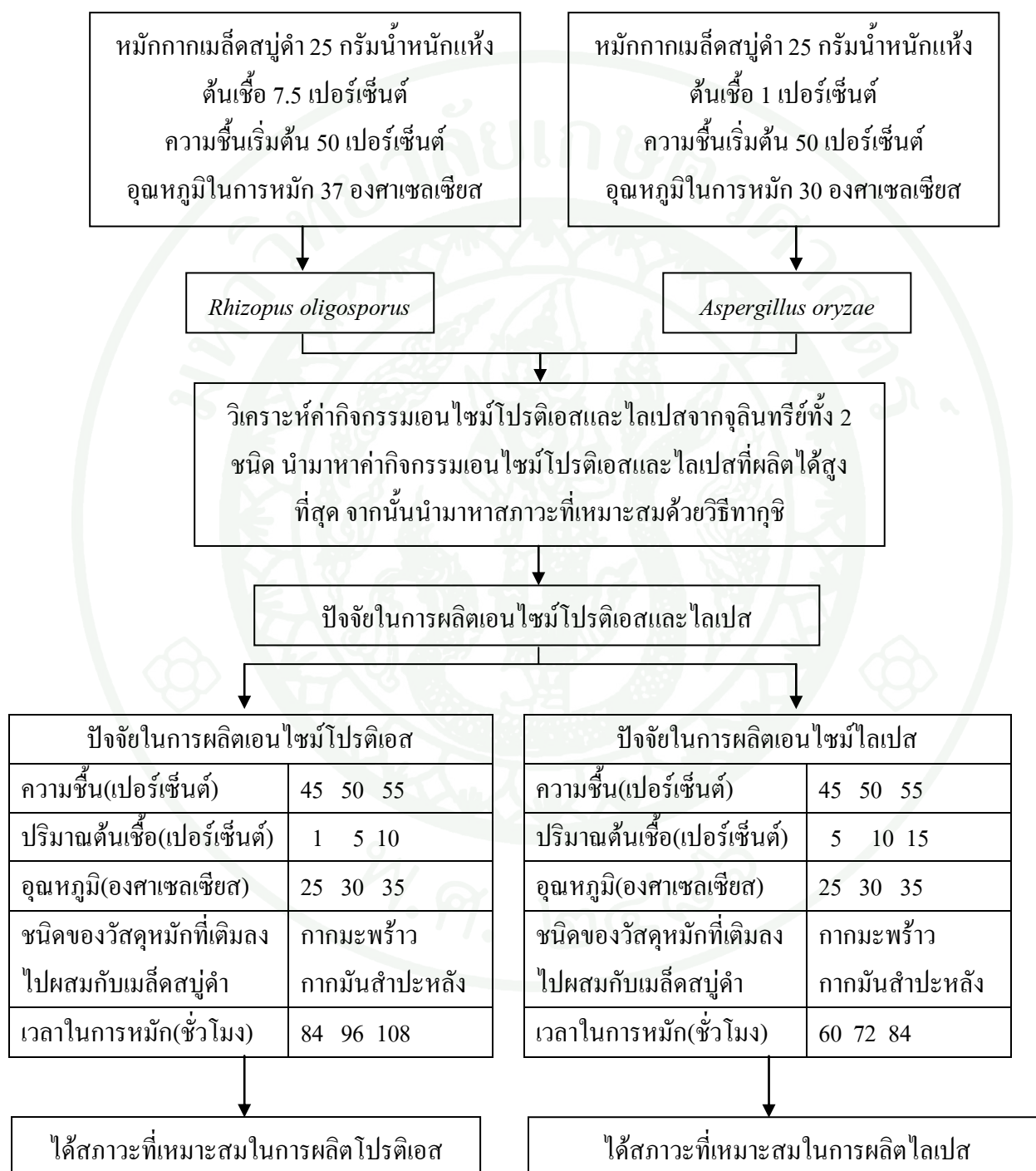


ภาพที่ 9 ก. ก่อนการคลุกให้เข้ากัน, ข. หลังการคลุกให้เข้ากัน (มีการเติมน้ำเพิ่มปรับความชื้น)

จะสังเกตเห็นว่า การใส่วัสดุเพิ่มความพรุนลงไปจะทำให้วัสดุหมักที่ผสมกับกับวัสดุเพิ่มความพรุนมีความสูงเพิ่มขึ้น กล่าวคือสามารถเพิ่มช่องว่างในระบบการหมักได้

นอกจากประโยชน์ของชนิดของวัสดุหมักที่เติมลงไปในการหมัก เพื่อเพิ่มความพรุนแล้ว กากมันสำปะหลัง และ กากมะพร้าวที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น สามารถเขียนแผนผังแสดงการทดลองเพื่อให้เข้าใจได้ง่าย ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แผนผังแสดงการทดลอง

3. การวิเคราะห์ค่าต่างๆ

1) การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Keay และ Wildi, 1970)

นำสารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียม(ภาคผนวก)ได้แช่ในน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส ก่อนใช้มากกว่า 3 นาที จากนั้นใส่สารละลายเอนไซม์ที่กรองได้จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ส่วนหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ นำหลอดทดลองไปอุ่นในอ่างน้ำที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานกว่า 3 นาที เติมน้ำสารละลายเคซีนเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที จึงเติมน้ำสารละลายกรดไทรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 0.4 M ลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในน้ำอุ่นเป็นเวลา 30 นาที นำมากรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษ กรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดส่วนใสที่กรองได้อย่างละ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่ง และเติมน้ำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4 M ลงในหลอดทดลองในข้อ 6 จำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำสารละลายตัวกระทำฟอลินจำนวน 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอดทดลอง และทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยานาน 10 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยทำการหาปริมาณไทโรซีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน ที่มีเข้มข้นตั้งแต่ 18.1-181 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยเคซีนให้ได้สารใหม่ ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับการเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส(ภาคผนวก ข)

2) การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Hoshino และคณะ, 1992)

นำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมน้ำสารละลาย *p*-nitrophenol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมน้ำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร หากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้น 0-0.1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์

หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate แล้วให้ *p*-nitrophenol เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส(ภาคผนวก ข)

3) การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (Cochran และ Vercellotti, 1978)

ใส่สารละลายตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลองแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Ehrlich reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

4) การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1984)

อบกระทองลูมิเนียม ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นลง โถดูดความชื้น ซึ่งและจดน้ำหนักที่แน่นอนไว้ และเก็บในโถดูดความชื้นจนกว่าจะใช้ ซึ่งผงตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ความชื้น ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2-3 กรัม ใส่ลงในกระทองลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดฝาขณะอบ จากนั้นนำกระทองลูมิเนียมออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ซึ่งหาน้ำหนักแล้ว นำไปอบซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนได้น้ำหนักที่คงที่ น้ำหนักส่วนที่หายไปคือน้ำหนักน้ำหรือความชื้นซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาณความชื้นได้จาก สมการที่ 9

$$\text{ปริมาณความชื้น(\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}} \times 100 \quad (9)$$

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำกากเมล็ดสับดูมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาเป็นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีในกากเมล็ดสับดูนั้น ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยไขมัน และโปรตีนเมื่อเทียบกับองค์ประกอบ ด้วยองค์ประกอบดังกล่าวของกากเมล็ดสับดู งานวิจัยนี้ จึงมีแนวคิดในการใช้กากเมล็ดสับดูให้เกิดประโยชน์ เนื่องจาก กากเมล็ดสับดูจัดเป็นวัสดุทางการเกษตรเหลือทิ้ง ที่ได้จากการสกัดน้ำมันสับดู เพื่อใช้เป็นน้ำมันในการขับเคลื่อนให้กับเครื่องกล ที่มีรอบต่ำ ซึ่งกากเมล็ดสับดูเองก็ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้ เพราะมีความเป็นพิษที่มีในเมล็ดสับดู เช่น ไม่สามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์เช่นเดียวกับวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่น ที่เหลือจึงเพียงแค่นำไปเป็นปุ๋ย งานวิจัยนี้ จึงได้เล็งเห็นถึง การเพิ่มมูลค่าให้กับกากเมล็ดสับดู โดยการนำมาผลิตเอนไซม์ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

การทดลองนี้จึงได้นำกากเมล็ดสับดู มาทำการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้นั้นเป็นรา 2 ชนิดคือ *Aspergillus oryzae* และ *Rizopus oligosporus* ราทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตได้ทั้งเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ที่แตกต่างกัน (Pandey *et al.*, 2000) แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ทั้งสองชนิดนี้จะมากหรือน้อยเพียงใด ก็ไม่สามารถทราบได้ ในการทดลองนี้จึงได้พิจารณาและเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ ทั้งสองชนิดในแต่ละจุลินทรีย์ เพื่อให้ทราบว่า เอนไซม์ชนิดใดเหมาะสมกับจุลินทรีย์ใด และได้นำหลักการ การออกแบบการทดลองเข้ามาช่วย เพื่อให้ผลของการผลิตเอนไซม์นั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

1. ผลศึกษาและเปรียบเทียบการใช้ รา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสับดู โดยวิธีการหมักแบบแห้ง

การศึกษการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสด้วยกากเมล็ดสับดูในประเทศไทยนั้น ยังไม่มีการพบรายงานดังกล่าว แต่ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเรื่องการผลิต เอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยกากสับดูในประเทศอินเดียเท่านั้น ซึ่ง Mahunta *et al.*, (2008) ได้ทำการศึกษาและทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยและไลเปส ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PseA แต่ข้อมีข้อจำกัดในเรื่องของการก่อโรคของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PseA ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) กล่าวคือ ลักษณะของจุลินทรีย์นี้ไม่เกิดให้เกิดโรค ในคนปกติทั่วไป แต่จะ

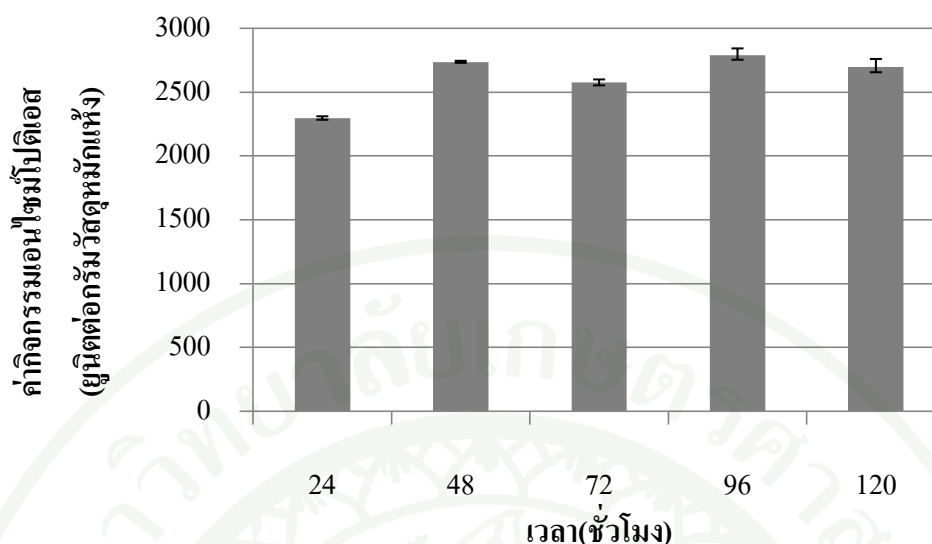
เกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิดอื่น ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ฉะนั้น ถ้าหากสามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอสและไลเปสด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Rizopus oligosporus* ซึ่งทั้งราทั้ง 2 นี้เป็นราชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงและ นิยมใช้ ในอุตสาหกรรม ทั้งนี้ งานวิจัยนี้ ยังเป็นการพัฒนาไปอีกก้าวหนึ่งของอุตสาหกรรมเอนไซม์ในประเทศไทย

1) ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนไซม์ โปรติเอสและ ไลเปส ด้วยรา *Rizopus oligosporus* โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ซึ่งราจะใช้องค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในวัสดุหมักเป็นแหล่งอาหารในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ โดยราจะผลิตเอนไซม์ขึ้นภายในเซลล์แล้วขับออกมาออกเซลล์ เพื่อย่อยสลายอาหารที่อยู่ภายนอกเซลล์ จากนั้นจะดูดซึมสารอาหารนั้นเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งการเลือกใช้แหล่งอาหารของจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันไป ในงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าวัสดุหมักที่ใช้ในที่นี้คือกากเมล็ดสบู่ดำ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยไขมันและโปรตีน จึงได้สังเกตเห็นถึงความเป็นไปได้ ในการทำให้จุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส

จากการทดลองพบว่าลักษณะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Rizopus oligosporus* จะมีลักษณะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากชั่วโมงเริ่มต้นในการหมักและสูงสุด ในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 2,770 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง หรือ มีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น 1.74 เท่า จากชั่วโมงเริ่มต้นจากนั้นค่ากิจกรรมจะมีค่าลดลงในชั่วโมงการหมักที่ 120 ดังภาพที่ 11

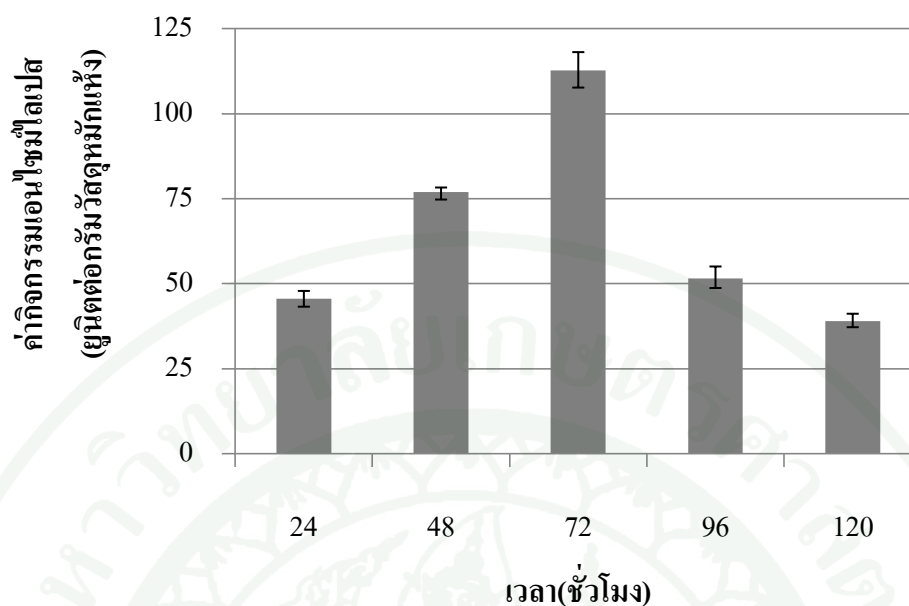
จากภาพที่ 11 สามารถสังเกตเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของรา *Rizopus oligosporus* มีลักษณะของการผลิต เอนไซม์โดยพิจารณาจาก ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมง ที่ 120 ที่ไม่ได้มีความแตกต่างกันมาก อย่างมีนัยสำคัญและเมื่อพิจารณาจากชั่วโมง ที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 อัตราการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะ มีค่าสูงมาก เมื่อเทียบกับช่วงเวลาการหมักอื่นๆ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ความต้องการโปรตีนของจุลินทรีย์ที่ใช้ในช่วงของการเพิ่มจำนวนเซลล์ใน ระยะของการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) จะมีการแบ่งเซลล์ อย่างรวดเร็ว เพราะฉะนั้น เซลล์จึงปล่อยเอนไซม์โปรติเอส ออกมาในปริมาณมากเพื่อทำการย่อยโปรตีนให้ได้เป็นกรดอะมิโน เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของเซลล์ (Ramachandran,2003)



ภาพที่ 11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rizopus oligosporus* ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์

ในช่วงเวลาต่อมาคือหลังจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไปค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่อัตราการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนั้นไม่สูงมากนัก และสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมาค่าเท่ากับ 2,770 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง และมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 120 แต่สามารถสังเกตเห็นได้ว่า เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสในชั่วโมงที่ 48 และ 96 เห็นได้ว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งมีความแตกต่างกันเพียง 1.8 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเทียบเวลาในการหมักแล้ว เห็นว่าควรพิจารณาในชั่วโมงการหมักที่ 48 มากกว่าช่วงเวลาอื่นๆ เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่า

สำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rizopus oligosporus* ลักษณะของการผลิตเอนไซม์ไลเปสในช่วงเวลาการหมักทั้งหมด 120 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยใช้วัสดุหมักคือกากเมล็ดสับดำ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส มีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 115 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง จากนั้นจะมีค่าลดลงตลอดจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120 ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ค่ากิจกรรม เอนไซม์ไคเนส ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rizopus oligosporus* ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์

จากภาพที่ 12 จะเห็นได้ว่าลักษณะการผลิตเอนไซม์ไคเนสของ *Rizopus oligosporus* จากชั่วโมงเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 120 นั้น พบว่า มีอัตราการผลิตเอนไซม์ไคเนส ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถสังเกตได้ว่า ในชั่วโมงการหมักที่ 72 ซึ่งเป็นเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์ไคเนสสูงสุด

เมื่อพิจารณาลักษณะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยรา *Rizopus oligosporus* จะเห็นได้ว่า ในชั่วโมงที่ 72 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคเนสจะมีค่าสูงสุด และเป็นช่วงเดียวกับที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีค่าลดลง จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้ง และสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคเนสมีค่าลดลง

ทั้งนี้การลดลงและการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสอาจมีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ เมื่อค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคเนสจะมีค่าลดลง ซึ่งสามารถสันนิษฐานได้ว่า เอนไซม์โปรติเอส อาจจะย่อยเอนไซม์ไคเนส เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอส

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เอนไซม์ไลเปสเองก็เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งเหตุผลดังกล่าวจึงอาจทำให้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าลดลงก็เป็นได้ (Ruchi *et al.*, 2008)

นอกจากนี้ ยังได้มี การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ อีกด้วย ซึ่ง สามารถวัดค่า การเจริญในรูปของปริมาณกลูโคซามีน ซึ่งกลูโคซามีนเป็นสารที่อยู่ในผนังเซลล์ ของจุลินทรีย์ สามารถแสดงถึงจำนวนชีวมวลของรา ได้ (Sakurai *et al.*, 1997) จากค่าของ ปริมาณกลูโคซามีนทำให้สามารถหาอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ได้ จากการทดลองนี้ พบว่าเมื่อพิจารณาในลักษณะของการเจริญของจุลินทรีย์ในรูปแบบของอัตราการเจริญจำเพาะซึ่งหาได้จากความสัมพันธ์ ดังสมการที่ 10

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (10)$$

อินทิเกรตสมการที่ 10 จะได้

$$\mu = \frac{[\ln x - \ln x_0]}{t - t_0} \quad (11)$$

โดย x คือ ปริมาณชีวมวล (ปริมาณกลูโคซามีน)

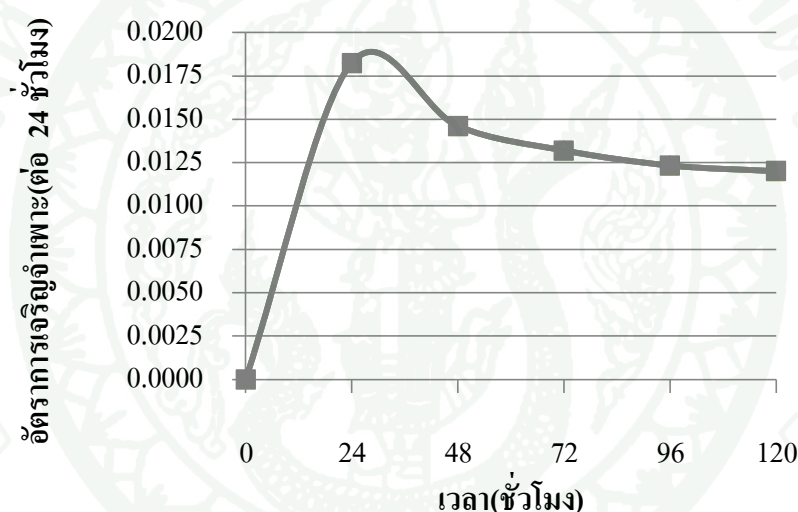
x_0 คือ ชีวมวลเริ่มต้น

t, t_0 คือ เวลาที่ใดๆและเวลาเริ่มต้นใช้ในการเปลี่ยนแปลงชีวมวล

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ

จากนั้นนำผลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับที่เวลาต่างๆ ดังรูปที่ 13 พบว่า การใช้รา *Rizopus oligosporus* เป็นจุลินทรีย์ในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดประมาณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.01839 ต่อ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น อัตราการเจริญจำเพาะจะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 120

จากภาพที่ 13 เมื่อพิจารณา อัตราการเจริญจำเพาะ เทียบกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส พบว่าในช่วงเวลาที่ค่าอัตราการเจริญจำเพาะลดลงจากจุดสูงสุด (ที่ 24 ชั่วโมง) จุลินทรีย์จะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้สูงสุด การลดลงจากชั่วโมงที่ 24 นี้ อาจเนื่องมาจากการลดลงของจำนวนเซลล์ หรือเซลล์ที่เกิดการเสียหาย ด้วยเหตุผล ดังกล่าวจึงทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมา เพื่อทำการย่อยโปรตีนที่อยู่ในวัสดุหมัก ให้ได้เป็นกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้ในการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ (Michael *et al.*, 2002) และในส่วนของความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์ไลเปสของรา *Rizopus oligosporus* กับอัตราการเจริญจำเพาะนั้นพบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในช่วงที่มีค่าสูง สุด (ชั่วโมงที่ 72) อัตราการเจริญจำเพาะจะมีค่าลดลงเช่นเดียวกัน แต่อัตราลดลงในลักษณะแนวโน้มนิ่งที่คงที่



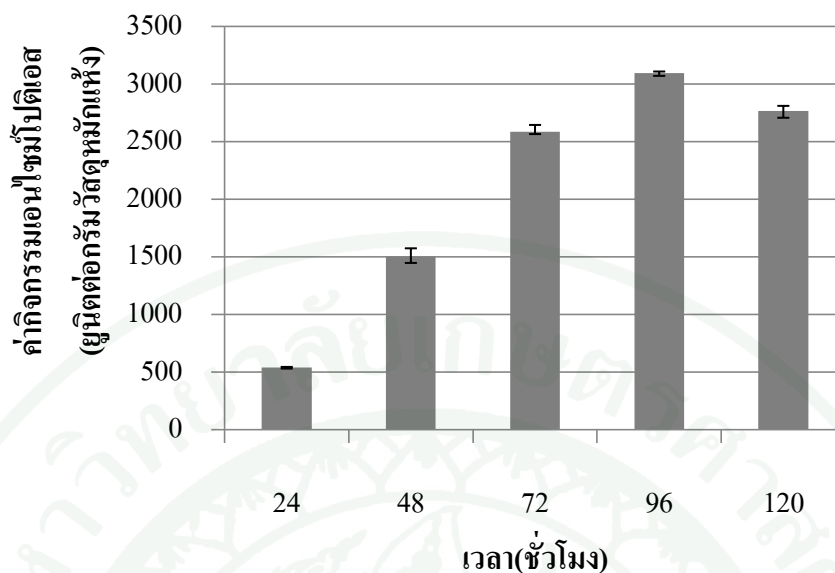
ภาพที่ 13 อัตราการเจริญจำเพาะ ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสบู่ดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rizopus oligosporus* ในปริมาณต้นเชื้อ 7.5 เปอร์เซ็นต์

เหตุผลที่ทำให้เอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดผลิตไม่พร้อมกัน ซึ่งเอนไซม์ ไลเปสถูกผลิตขึ้นในช่วงหลังของหลังของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อาจเนื่องมาจากความยากง่ายของการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์กล่าวคือ โครงสร้างของของโปรตีนนั้นประกอบด้วย กรดอะมิโนที่มาเรียงต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์เราเรียกว่า เปปไทด์ และเมื่อมีสายยาวขึ้นเรียกว่า พอลิเปปไทด์ ซึ่งพันธะเปปไทด์ถูกสลายได้ด้วยปฏิกิริยาเอไมด์ไฮโดรไลซิส(amide hydrolysis) พันธะเปปไทด์ในโปรตีนจะมีความคงตัวปานกลาง หมายความว่าเมื่อมีน้ำอยู่จะสลายตัวได้ทันที ในสิ่งมีชีวิต กระบวนการเกิดขึ้นด้วยการ

เร่งของเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ เปปไทด์ (Michael *et al.*, 2002) จะเห็นได้ว่าเพียงแค่น้ำอยู่ในระบบและทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส ก็จะสามารถสลายพันธะเปปไทด์ได้ เหตุผลดังกล่าวจึงอาจทำให้เอนไซม์โปรติเอสถูกผลิตขึ้นก่อน ส่วนเหตุผลที่เอนไซม์ไลเปสถูกผลิตขึ้นในภายหลังนั้น อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของไขมันเองกล่าวคือ ไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งต่างจากโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ในด้านคุณสมบัติการละลาย ไขมันส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble หรือ hydrophobic) แต่ละลายได้ดีใน non-polar solvents หรือ ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอม และ เบนซีน เป็นต้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงอาจทำให้เอนไซม์ไลเปสนั้น ถูกผลิตในภายหลัง แต่ทั้งนี้การศึกษาเรื่องการเจริญของจุลินทรีย์ ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส นั้น ทำให้สามารถทราบถึงช่วงเวลาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้

2) ผลการศึกษา การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae*

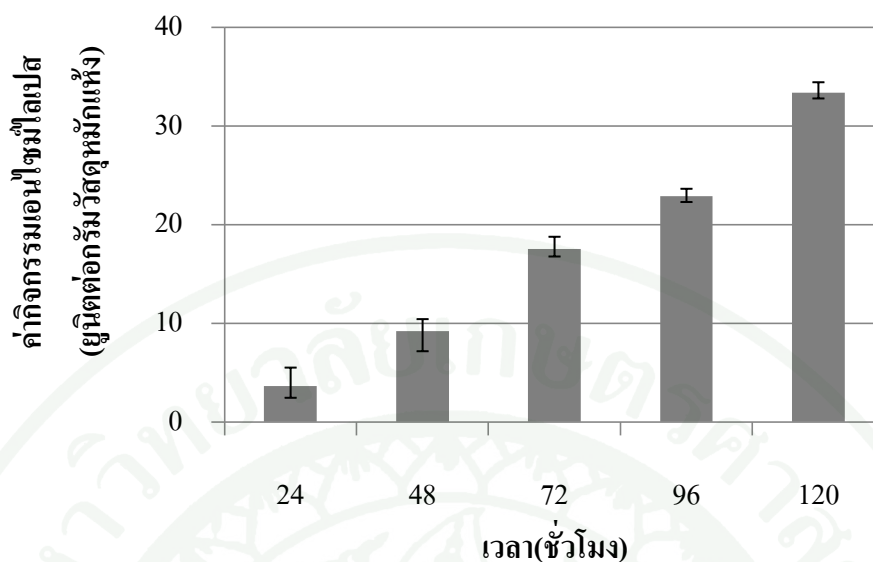
หลังจากการทดลองข้างต้นเป็นการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยรา *Rizopus oligosporus* ในการทดลองนี้จะเป็นการทดลองในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน เพียงแต่ทำการเปลี่ยนจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเป็นรา *Aspergillus oeyzae* เพื่อดูลักษณะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากการทดลองพบว่า ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oeyzae* โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากชั่วโมงเริ่มต้น และสูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3,094 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งและหลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ดังภาพที่ 14 หรือมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น 1.86 เท่าเมื่อเทียบกับชั่วโมงเริ่มต้น



ภาพที่ 14 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับดำ ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae* ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์

หลังจากชั่วโมงที่ 96 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมีปริมาณการผลิตลดลงนั้น อาจเนื่องมาจาก การหมดไปของสารอาหารที่เป็นโปรตีน หรือสภาวะในระบบการเปลี่ยนแปลงเช่น สารเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก รวมถึงความชื้นที่เปลี่ยนไป สิ่งเหล่านี้อาจมีผลทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง (Wang *et al.*, 2005)

ในส่วนของการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Aspergillus oeyzae* โดยใช้กากเมล็ดสับดำเป็นวัสดุหมัก ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากชั่วโมงเริ่มต้น และสูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 33 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งดังภาพที่ 15

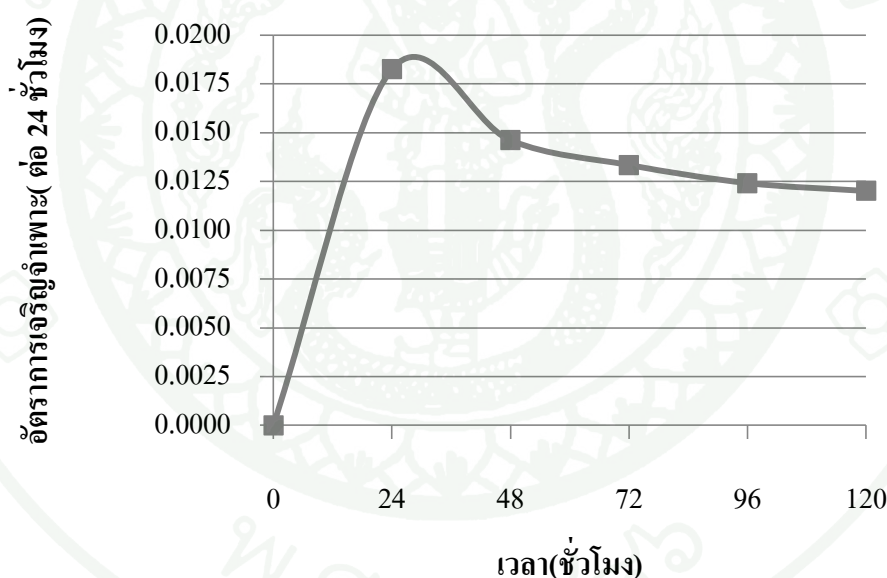


ภาพที่ 15 ค่ากิจกรรม เอนไซม์ไลเปส ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับดู ค่าความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oyezae* ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์

จะสังเกตเห็นได้ว่า ลักษณะการผลิตเอนไซม์ไลเปสของรา *Aspergillus oyezae* นั้นจะมีการผลิตขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ยังสามารถใช้องค์ประกอบที่เป็นไขมันที่อยู่ในกากเมล็ดสับดูได้อยู่ จึงทำให้จุลินทรีย์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ตลอดการหมัก ในทำนองเดียวกัน เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าในการลงทุนนั้น ระยะเวลาที่ยาวนานจนเกินไป ยังคงเป็นกำหนดว่า การผลิตนั้นเหมาะสมที่จะผลิตผลผลิตที่เราต้องการขึ้นหรือไม่ และในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบเอนไซม์ไลเปสที่ถูกผลิตขึ้นจากรา 2 ชนิด จึงได้มีการเปรียบเทียบความสามารถ และความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

เมื่อพิจารณาลักษณะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ด้วยรา *Aspergillus oyezae* จะเห็นว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตลอดระยะเวลาการหมัก และลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเองก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยใช้รา *Aspergillus oyezae* ทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้นั้น ทนต่อการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสได้ หรืออาจเนื่องมาจาก การผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย *Aspergillus oyezae* จะให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่มากพอ จึงทำให้ดูเหมือนกับ ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสก็เป็นได้

นอกจากนี้ยังได้ทดลองดูลักษณะของการเจริญของรา *Aspergillus oeyzae* โดยนำเสนอในรูปแบบของอัตราการเจริญจำเพาะเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น โดยนำผลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง μ กับที่เวลาต่างๆ ดังรูปที่ 16 พบว่า การใช้รา *Aspergillus oeyzae* เป็นจุลินทรีย์ในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ โปรติเอสและไลเปสที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับคั่ว ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ สูงสุดประมาณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0135 ต่อ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 และลดลงเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการหมักในสัดส่วนที่ช้าลงเมื่อเทียบกับเวลาในช่วงระหว่างชั่วโมงเริ่มต้นถึงชั่วโมงที่ 24 หรือระหว่างชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 จากนั้นจะลดลงในลักษณะที่คงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งรูปแบบของอัตราการเจริญจำเพาะของรา *Aspergillus oeyzae* มีลักษณะคล้ายกับรา *Rizopus oligosporus*



ภาพที่ 16 อัตราการเจริญจำเพาะ ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ โดยใช้วัสดุหมักเป็นกากเมล็ดสับคั่ว ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae* ในปริมาณต้นเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์

ผลจากการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น เมื่อได้พิจารณาความเหมาะสมในการเลือกกราฟที่จะผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดพบว่า ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของรา *Rizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่สูงสุดในชั่วโมง เดียวกันคือ ในชั่วโมงที่ 48

ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,770 และ 3,094 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ โดย รา *Aspergillus oeyzae* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่สูงกว่า คิดเป็น 10.47 เปอร์เซ็นต์ และในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* พบว่าจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 115 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงการหมักที่ 72 และ 33 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ในชั่วโมงการหมักที่ 120 ตามลำดับ ซึ่งรา *Rizopus oligosporus* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่สูงกว่าคิดเป็น 71.30 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลอง สามารถสรุปได้ว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ที่ใช้กากเมล็ดสนับดำเป็นวัสดุหมัก ควรใช้จุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oeyzae* และการผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ใช้กากเมล็ดสนับดำเป็นวัสดุหมัก ควรใช้จุลินทรีย์ชนิด *Rizopus oligosporus*

เมื่อทราบความเหมาะสมของการเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ในแต่ละชนิดแล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด โดยการใช้การออกแบบการทดลองเข้ามาช่วยเพื่อให้การทดลองนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งวิธีที่เลือกมาใช้คือ ทากูชิ โดยมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดอีกด้วย ดังต่อไปนี้

2. ผลศึกษา การออกแบบการทดลองเพื่อ หาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ โดยวิธีทากูชิ (Taguchi)

1) การออกแบบการทดลองเพื่อ การผลิตเอนไซม์ผลิตเอนไซม์ โปรติเอส จากกากเมล็ดสนับดำ ด้วยรา *Aspergillus oryzae*

เมื่อทำการหมักกากเมล็ดสนับดำ โดยใช้รา *Aspergillus oryzae* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสภายใต้สภาวะที่ออกแบบโดยอาศัย Orthogonal Array แบบ $L_{27}(3^3)$ และพิจารณาลักษณะคุณภาพของปัจจัย 5 ปัจจัยได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิ ชนิดของวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมตามแนวทางวิธีทากูชิ ผลการแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตด้วยรา *Aspergillus oryzae*

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	7,598	7,621	7,872	7,697
2	6,388	6,621	6,720	6,577
3	6,305	6,523	6,236	6,355
4	9,327	9,139	9,554	9,340
5	9,710	9,299	9,146	9,385
6	6,420	6,645	7,231	6,765
7	8,090	8,258	8,933	8,427
8	10,129	9,906	11,645	10,560
9	8,477	8,012	7,619	8,036
10	5,214	5,287	6,308	5,603
11	5,541	5,812	6,003	5,786
12	3,662	3,436	4,733	3,944
13	10,009	10,922	10,783	10,571
14	8,382	8,346	8,656	8,461
15	6,780	6,884	7,057	6,907
16	10,855	10,100	10,589	10,515
17	11,155	10,903	10,984	11,014
18	11,012	12,073	11,634	11,573
19	7,598	7,621	7,872	7,697
20	6,388	6,621	6,720	6,577
21	8,515	8,660	7,787	8,321
22	6,628	6,238	6,946	6,604
23	8,858	8,901	9,452	9,070

ตารางที่ 7 (ต่อ)

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
24	7,798	7,566	7,755	7,706
25	4,714	4,275	4,918	4,636
26	5,851	6,000	5,315	5,722
27	12,667	12,178	11,286	12,044

ในการหาสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีทากุชิแบ่งเป็นประเภทพิจารณาเป็น 3 ประเภทดังรายละเอียดหัวหัวข้อเอกสารตรวจสอบ ซึ่งในการทดลองนี้จัดอยู่ในประเภท The Bigger is better เนื่องจากค่าเป้าหมายที่เราต้องการนั้น ต้องการให้มีค่าสูง กล่าวคือ ต้องการให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาในปริมาณมากที่สุด จึงจะดีที่สุด เมื่อนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ไปคำนวณ ทางวิธีทากุชิ โดยโปรแกรม MINITAB 14.0 ทั้งนี้อาจคำนวณได้จากสมการที่ 1 โดยการคำนวณหาค่า S/N Ratio เมื่อ y และ N ในสมการที่ 1 คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และจำนวนการทดลองนั้น ดังแสดงตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก จ หรืออาศัยจากการรันด้วยโปรแกรม MINITAB version 14.0 ซึ่งเป็นค่าเดียวกัน

จากตารางที่ 8 เป็นค่าเปอร์เซ็นต์อิทธิพล ซึ่งสามารถคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์อิทธิพลได้จากสมการที่ 12 โดยอาศัยค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของค่า S/N Ratio ในแต่ละปัจจัย ซึ่งจะแสดงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ อุณหภูมิ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.35 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลรองลงมาคือ ปริมาณดินเชื้อ มีค่าเท่ากับ 31.34 เปอร์เซ็นต์ ตลอดจนเวลาในการหมัก มีค่าอิทธิพลเท่ากับ 17.85 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของวัสดุหมัก มีค่าอิทธิพลเท่ากับ 15.62 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นเริ่มต้น เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสน้อยสุดซึ่งเท่ากับ 2.84 เปอร์เซ็นต์

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพล} = 100 - \frac{(\sum \text{main effect}) - \text{main effect}}{\sum \text{main effect}} \times 100 \quad (12)$$

$$\text{Confidence} = 100 - F_{\text{DIST}}(F_{\text{ratio}}, DOF_{\text{Factor}}, DOF_{\text{Error}}) \times 100 \quad (13)$$

หมายเหตุ สมการที่ 13 ใช้ฟังก์ชันในโปรแกรม Excel , [F_{DIST}]

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ที่ผลิตด้วย
รา *Aspergillus oryzae*

ระดับ	S/N Ratio				
	ปัจจัย				
	A	B	C	D	E
1	77.98	76.40	78.07	77.72	78.63
2	77.79	77.56	79.29	77.10	77.93
3	77.70	79.50	76.10	78.64	76.87
ค่าอิทธิพล ¹	0.28	3.09	3.19	1.54	1.76
% ค่าอิทธิพล ²	2.84	31.34	32.35	15.62	17.85

หมายเหตุ ¹ ค่าอิทธิพลเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดในแต่ละปัจจัย

² % ค่าอิทธิพล คำนวณได้จากสมการที่ 12 โดยใช้ค่าอิทธิพลรวมเท่ากับ 9.86

อักษรย่อ A, B, C, D และ E หมายถึง ปัจจัยของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แสดงใน
ตารางที่ 4

เมื่อนำผลการทดลอง นั่นคือ ค่ากิจกรรมโปรตีนมาตรฐานตรวจสอบค่าความแปรปรวน (ANOVA) โดยค่าความแปรปรวนที่ได้ก็นำมาจากการแสดงผลด้วยโปรแกรม MINITAB 14.0 เช่นเดียวกับค่า S/N Ratio ดังแสดงได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรตีนเอส ที่ผลิตด้วยรา *Aspergillus oryzae*

ปัจจัย	DOF	SS	MS	F	Confidence (เปอร์เซ็นต์)
A	2	0.3683	0.1841	0.31	26.70721
B	2	43.7904	21.9852	37.31	100
C	2	46.7482	23.3741	39.67	100
D	2	10.7318	5.3659	9.11	99.9609
E	2	14.2623	7.1311	12.1	99.9954
error	8	4.7142	0.5893		
total	26	137.475			

เมื่อพิจารณาจากค่า sum of squares (SS) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 14 หรืออาศัยค่าจากโปรแกรม MINITAB 14.0 ของแต่ละปัจจัย ซึ่งค่า sum of squares ทำให้เราสามารถทราบถึงการกระจายของข้อมูลได้ กล่าวคือ เมื่อชุดของข้อมูลใดมีการกระจายมาก นั่นคือข้อมูลเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ในการทดลอง จะเห็นว่าปัจจัย C คือ อุณหภูมิในการหมัก มีค่า sum of squares สูงที่สุดเท่ากับ 46.7482 แสดงว่า ปัจจัยดังกล่าวเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย (S/N Ratio) อีกนัยหนึ่งหมายถึงอุณหภูมิในการหมัก มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ โปรตีนเอสมากที่สุด ส่วนปัจจัย A คือ ความชื้น มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 0.3683 นั่นคือ ค่า S/N Ratio ของปัจจัย A มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ย S/N Ratio รวมนั่นเอง ทำให้ความชื้น มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โปรตีนเอส น้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย ที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรตีนเอส ดังตารางที่ 8 ที่อธิบายไว้ข้างต้น

$$SS_{Factor} = \frac{N \times r}{L} \sum_{k=1}^L \left(\bar{y}_k - \bar{y} \right)^2 \quad (14)$$

โดยที่ N คือ จำนวนการทดลอง

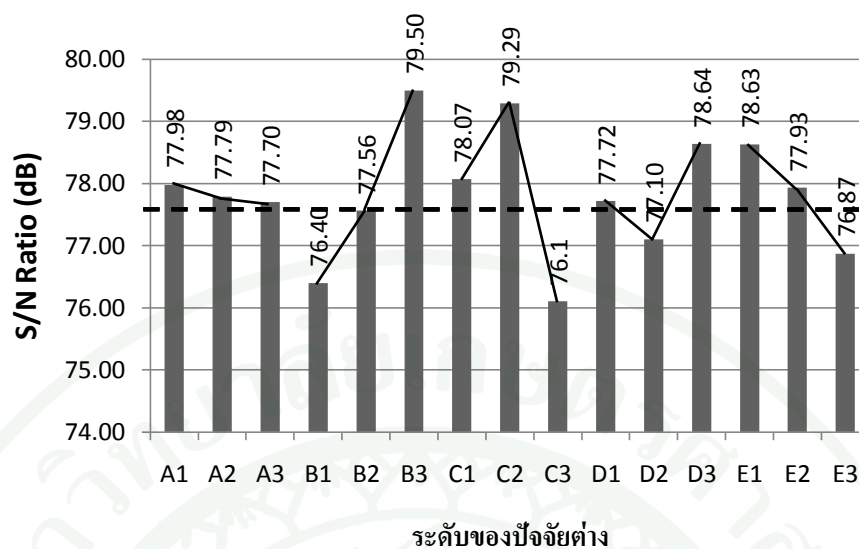
R คือ จำนวนการทดลองซ้ำ

L คือ ระดับของปัจจัย

$\bar{y}_k$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่า S/N ratio ในแต่ละปัจจัย

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่า S/N ratio ของทุกปัจจัยในทุกระดับ

ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนนั้น ทำให้สามารถทราบถึงการกระจายของข้อมูลได้ นอกจากนี้ยังสามารถทราบความเชื่อมั่นของแต่ละปัจจัยได้ ว่าสามารถเชื่อถือและมีความถูกต้องมากแค่ไหนโดยพิจารณาจากค่า confidence สามารถคำนวณจากสมการที่ 13 ในตารางที่ 9 พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความเชื่อมั่น คือ ปริมาณดินเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 เปอร์เซ็นต์ เวลาในการหมัก 99.9954 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของวัสดุหมัก 99.9609 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปัจจัยที่มีค่าความเชื่อมั่นน้อยสุดคือ ความชื้นเริ่มต้น 26.70721 เปอร์เซ็นต์ และจากการคำนวณค่า S/N Ratio ของแต่ละปัจจัยจากตารางที่ 8 สามารถนำมาสร้างความสัมพันธ์โดยสร้างกราฟให้อยู่ในรูปของค่า S/N Ratio ของปัจจัยในแต่ละระดับ จะสามารถเห็นความแตกต่างได้ดีมากขึ้น ดังแสดงดังภาพที่ 17



A = ความชื้น

B = ปริมาณต้นเชื้อ

C = อุณหภูมิในการหมัก

D = ชนิดของวัสดุหมัก

E = เวลาในการหมัก

ภาพที่ 17 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากภาพที่ 17 แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า S/ N Ratio โดยจะพิจารณาค่า S/N Ratio สูงสุดในแต่ละปัจจัยเช่น ความชื้น(ปัจจัย A)ที่ระดับ A₁ A₂ และ A₃ และความชื้นที่เหมาะสมที่สุดคือ A₁ นั่นคือที่ความชื้น 45 เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียว สามารถพิจารณาปัจจัยอื่นในลักษณะเดียวกัน ซึ่งสามารถแสดง สภาวะที่เหมาะสมได้ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	ระดับที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
1. ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	45
2. ปริมาณดินเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	10
3. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30
4. ชนิดของวัสดุหมัก	กากสับดูดำ : กากมันสำปะหลัง (80:20)
5. เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	84

จากตารางที่ 10 แสดงระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรม เอนไซม์โปรติเอส จากนั้นทำการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยอาศัยข้อมูลในการคำนวณจากค่า S/N ratio จากตารางที่ 8 ซึ่งการเลือกค่า S/N ratio มาคำนวณนั้น โดยเลือกค่า S/N ratio ที่สูงสุดในแต่ละปัจจัยมาแทนค่าลงในสมการ 15 เพื่อใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

$$Y_{Opt} = \bar{T} + (\bar{A}_1 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_2 - \bar{T}) + (\bar{D}_3 - \bar{T}) + (\bar{E}_1 - \bar{T}) \quad (15)$$

แทนค่า เมื่อ $\bar{T}$ คือ ค่า S/N ratio เฉลี่ยซึ่งค่าเท่ากับ 77.69

$\bar{A}_1$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของความชื้นเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 77.98

$\bar{B}_3$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของปริมาณดินเชื้อมีค่าเท่ากับ 79.50

$\bar{C}_2$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 79.29

$\bar{D}_1$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของชนิดของวัสดุหมักมีค่าเท่ากับ 78.64

$\bar{E}_3$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของเวลาในการหมัก มีค่าเท่ากับ 78.63

โดยเลือกพิจารณาสถานะที่เหมาะสมต่างๆได้จากภาพที่ 15 ก็คือค่า S/N ratio จากนั้นแปลงค่า Y_{opt} ให้เป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ค่า MSD รูปแบบของ The Bigger is better จาก $MSD = 10^{-(Y_{opt})/10}$ โดยแสดงตัวอย่างการคำนวณไว้ใน ภาคผนวก จ จากนั้นทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยการใช้สถานะที่เหมาะสมที่ได้จากตารางที่ 10 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองกับค่าที่คำนวณ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ค่าจากการคำนวณและผลการยืนยันการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของค่ากิจกรรม
เอนไซม์โปรติเอส

ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)	
ค่าจากการคำนวณ	ผลการทดลองจริง
14,273	14,108±119

จากตารางที่ 11 พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ 14,273 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส ที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าเป็น 14,108 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการคำนวณและผลการทดลองจริงเท่ากับ 1.16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถยอมรับได้ นั้นหมายถึง สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ นั้นมีความถูกต้อง ตรงตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการใช้วิธีทางสถิติ

2) การออกแบบการทดลองเพื่อ การผลิตเอนไซม์ ผลิตเอนไซม์ไลเปส จากกากเมล็ดสบู่ดำ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

เมื่อทำการหมักกากเมล็ดสบู่ดำ โดยใช้รา *Rhizopus oligosporus* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส ภายใต้สภาวะที่ออกแบบโดยอาศัย Orthogonal Array แบบ $L_{27}(3^5)$ และพิจารณาลักษณะคุณภาพของปัจจัย 5 ปัจจัยได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณต้นเชื้อ อุณหภูมิ ชนิดของวัสดุหมัก และเวลาในการหมัก เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมตามแนวทางวิธีทางสถิติ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	227.50	224.10	228.90	226.80
2	270.50	227.00	214.90	237.50
3	232.90	235.10	236.50	234.80
4	176.20	237.00	219.50	210.90
5	223.00	158.20	181.80	187.70
6	232.70	205.40	213.50	217.20
7	221.70	225.50	227.90	225.00
8	249.00	239.00	273.70	253.90
9	235.40	229.90	226.10	230.50
10	234.40	235.30	235.00	234.90
11	218.70	216.40	219.10	218.10
12	275.60	159.90	220.10	218.50
13	242.20	239.50	246.10	242.60
14	275.50	271.80	270.60	272.60
15	242.30	246.90	247.60	245.60
16	221.20	227.90	210.00	219.70
17	222.40	179.30	257.80	219.80
18	246.80	218.30	262.30	242.50
19	201.80	192.70	195.00	196.50
20	237.60	214.30	211.10	221.00
21	210.60	223.30	207.10	213.70
22	200.10	245.10	201.80	215.70
23	212.40	215.40	218.70	215.40

ตารางที่ 12 (ต่อ)

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
24	226.40	225.60	222.50	224.80
25	235.10	238.20	239.20	237.50
26	229.50	227.80	224.20	227.20
27	271.30	208.90	216.50	232.20

ในการหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยรา *Rhizopus oligosporus* มีลักษณะของการพิจารณาเช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae* ซึ่งสามารถแสดงค่าเปอร์เซ็นต์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อค่าการผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังตารางที่ 13 ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์อิทธิพลคำนวณได้จากสมการที่ 12

จากตารางที่ 13 เป็นการหาค่าเปอร์เซ็นต์อิทธิพล ซึ่งจะแสดงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ วัสดุหมักคือกากเมล็ดสับดำ มีอิทธิพลถึง 39.18 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 23.13 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นเริ่มต้น 17.16 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณต้นเชื้อ 14.92 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการหมักจะมีอิทธิพลน้อยสุดต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสคือ 5.59 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำผลการทดลอง นั่นคือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมาตรวจสอบค่าความแปรปรวน (ANOVA) โดยค่าความแปรปรวนที่ได้้นั้นมาจากแสดงผลด้วยโปรแกรม MINITAB 14.0 เช่นเดียวกับค่า S/N Ratio ดังแสดงได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 13 ผลของการวิเคราะห์หัตถิพผลของปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตด้วยรา
Rhizopus oligosporus

ระดับ	S/N Ratio				
	ปัจจัย				
	A	B	C	D	E
1	46.94	46.84	47.02	47.55	46.92
2	47.28	46.96	46.70	46.50	47.04
3	46.82	47.24	47.32	46.99	47.08
ค่าหัตถิพ ¹	0.46	0.40	0.62	1.05	0.15
% ค่าหัตถิพ ²	17.16	14.92	23.13	39.18	5.59

หมายเหตุ ¹ ค่าหัตถิพเท่ากับผลต่างของค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดในปัจจัยนั้นๆ

² % ค่าหัตถิพ คำนวณได้ดังสมการที่ 12 โดยใช้ค่าหัตถิพรวมเท่ากับ 2.68

อักษรย่อ A, B, C, D และ E หมายถึง ปัจจัยของการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แสดง ใน
 ตารางที่ 5

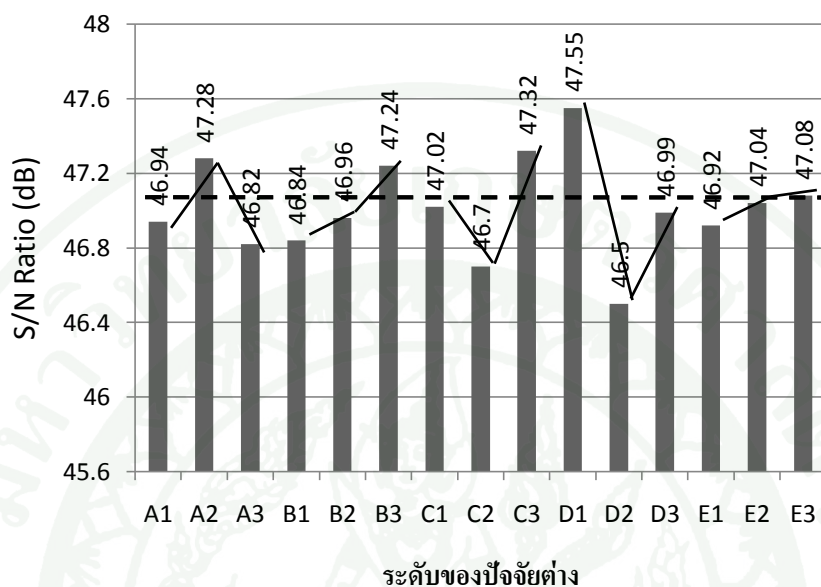
ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตด้วย
รา *Rhizopus oligosporus*

ปัจจัย	DOF	SS	MS	F	Confidence (เปอร์เซ็นต์)
A	2	1.0441	0.52205	8.05	99.91
B	2	0.7433	0.37167	5.73	99.45
C	2	1.7072	0.8536	13.17	100.00
D	2	4.9566	2.47832	38.24	100.00
E	2	0.1158	0.05789	0.89	58.47
error	8	0.5185	0.06481		
total	18	13.0377			

เมื่อพิจารณาจากค่า sum of squares (SS) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 14 หรืออาศัยค่าจากโปรแกรม MINITAB 14.0 ของแต่ละปัจจัย ซึ่งค่า sum of squares ทำให้เราสามารถทราบถึงการกระจายของข้อมูลได้ กล่าวคือ เมื่อชุดของข้อมูลใดมีการกระจายมาก นั่นคือข้อมูลเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย ในการทดลอง จะเห็นว่าปัจจัย D คือ ชนิดของวัสดุ หมัก มีค่า sum of squares สูงที่สุดเท่ากับ 4.9566 แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย (S/N Ratio) อีกนัยหนึ่งหมายถึงชนิดของวัสดุหมัก มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสมากที่สุด ส่วนปัจจัย E คือ เวลาในการหมัก มีค่า sum of squares น้อยที่สุดเท่ากับ 0.1158 นั่นคือ ค่า S/N Ratio ของปัจจัย E มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ย S/N Ratio รวมนั่นเอง ทำให้ความชื้น มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไลเปส น้อยที่สุด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัย ที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส ดังตารางที่ 13 ที่อธิบายไว้ข้างต้น

เมื่อพิจารณาจากค่า confidence สามารถคำนวณจากสมการที่ 13 ในตารางที่ 14 พบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความเชื่อมั่น ใช้วัสดุหมักที่เป็นเมล็ดสบู่ดำอย่างเดียวนี้อาจมีความเชื่อมั่น 100 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นเริ่มต้น 99.91 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณดินเชื้อ 99.45 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการหมัก 58.47 เปอร์เซ็นต์ และจากการคำนวณค่า S/N Ratio ของแต่ละ

ปัจจัย จากตารางที่ 13 สามารถนำมาสร้างความสัมพันธ์โดยสร้างกราฟให้อยู่ในรูปของค่า S/N Ratio ของปัจจัยในแต่ละระดับ จะสามารถเห็นความแตกต่างได้ดีมากขึ้น ดังแสดงดังภาพที่ 18



A = ความชื้น

B = ปริมาณดินเชื้อ

C = อุณหภูมิในการหมัก

D = ชนิดของวัสดุหมัก

E = เวลาในการหมัก

ภาพที่ 18 สภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากภาพที่ 18 แสดงสภาวะที่เหมาะสมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า S/ N Ratio โดยจะพิจารณาค่า S/N Ratio สูงสุดในแต่ละปัจจัยเช่น ความชื้น ที่ระดับ ที่เหมาะสมที่สุดคือ A2 นั่นคือที่ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ หรืออุณหภูมิในการหมัก ที่เหมาะสมที่สุดคือ C3 นั่นคือที่อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส เป็นต้น โดยสามารถ สรุปสภาวะที่เหมาะสมพิจารณาได้จากวิธีการข้างต้น ได้ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 สรุประดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตด้วยรา
Rhizopus oligosporus

ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	ระดับที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
1. ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	50
2. ปริมาณดินเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	15
3. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	35
4. ชนิดของวัสดุหมัก	กากเมล็ดสนุ่นดำ(100 เปอร์เซ็นต์)
5. เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	84

จากตารางที่ 15 แสดงระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรม เอนไซม์ไลเปส จากนั้นทำการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยอาศัยข้อมูลในการคำนวณจากค่า S/N ratio จากตารางที่ 13 ซึ่งการเลือกค่า S/N ratio มาคำนวณนั้น โดยเลือกค่า S/N ratio ที่สูงสุดในแต่ละปัจจัยมาแทนค่าลงในสมการ 16

$$Y_{Opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_1 - \bar{T}) + (\bar{E}_3 - \bar{T}) \quad (16)$$

แทนค่า เมื่อ $\bar{T}$ คือ ค่า S/N ratio เฉลี่ยซึ่งค่าเท่ากับ 47.01

$\bar{A}_2$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของความชื้นเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 47.28

$\bar{B}_3$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของปริมาณดินเชื้อมีค่าเท่ากับ 47.24

$\bar{C}_3$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 47.32

$\bar{D}_1$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของชนิดของวัสดุหมักมีค่าเท่ากับ 47.55

$\bar{E}_3$ คือ ค่า S/N ratio ปัจจัยของเวลาในการหมัก มีค่าเท่ากับ 47.08

โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่างๆได้จากภาพที่ 15 ก็คือค่า S/N ratio จากนั้นแปลงค่า Y_{op} ให้เป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ค่า MSD รูปแบบของ The Bigger is better จาก $MSD = 10^{-(Y_{opt})/10}$ โดยแสดงตัวอย่างการคำนวณไว้ใน ภาคผนวก จ จากนั้นทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลอง โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากตารางที่ 15 เพื่อเปรียบเทียบค่าผลการทดลองกับค่าที่คำนวณ ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ค่าจากการคำนวณและผลการยืนยันการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมของค่ากิจกรรม
เอนไซม์ไลเปส

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)	
ค่าจากการคำนวณ	ผลการทดลองจริง
261.90	278.20±5.81

จากตารางที่ 16 พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเป็น 261.90 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ดังแสดงในตัวอย่างการคำนวณจากภาคผนวก จ ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าเป็น 278.20 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการคำนวณและผลการทดลองจริงเท่ากับ 5.86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าความคลาดเคลื่อนที่สามารถยอมรับได้ นั่นหมายถึง สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนั้น มีความน่าเชื่อถือและมีความถูกต้อง

งานวิจัยของ ธารธร (2549) ได้ทำการทดลองผลิตเอนไซม์ไลเปส จากรา *Rhizopus oligosporus* โดยทดลองหาวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งในระดับห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาหาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมของวัสดุหมัก สัดส่วนของวัสดุหมัก คือ รำข้าวสาลี เมล็ดทานตะวัน รำข้าวสาลี ถั่วเหลือง งา ถั่วลิสง รำละเอียด อย่างละ 100 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อ งา และ วัสดุหมักผสมระหว่างรำข้าวสาลีต่อ ถั่วเหลืองเป็น 75:25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ วัสดุหมักคือ รำข้าวสาลี 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 7.83 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้งในชั่วโมงที่ 96 เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส กับงานวิจัยนี้พบว่า งานวิจัยได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าถึง 35 เท่า ทั้งนี้เนื่องจาก การเพิ่มความเข้มข้นของ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการสกัด จากเดิมมีความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในการสกัด จะทำให้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถแพร่ เข้าสู่เซลล์แมมเบรนของรา เพื่อทำการสกัดเอนไซม์ที่อยู่ในภายในตัวเซลล์และภายนอกเซลล์ ได้ง่ายขึ้น (UI-haq *et al.*,2001) หรืออาจเนื่องมาจาก องค์ประกอบที่อยู่ในวัสดุหมัก กล่าวคือ องค์ประกอบของไขมันที่อยู่ในเมล็ดสนูปดามีถึง 47 เปอร์เซ็นต์ (Akintayo ,2004) ส่วน ในรำข้าวสาลีมีเพียงองค์ประกอบของไขมันเพียง 3.5 เปอร์เซ็นต์

(พัชรกุล , 2525) โดยองค์ประกอบของไขมัน จะเป็นสารเคมีที่จุลินทรีย์ใช้เป็นอาหาร โดยจุลินทรีย์ จะปล่อยเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยไขมันให้ได้เป็นกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ เพื่อใช้ในการเจริญ



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา การใช้ประโยชน์จากกากเมล็ดสับดูดำ หลังจากผ่านการสกัดน้ำมัน ออกแล้ว ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง โดยใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ รา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 การทดลองกล่าว คือ การทดลองในตอนแรกจะเป็นการหาความเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดเนื่องจาก ราทั้ง 2 ชนิด ว่าราชนิดใดเหมาะกับการผลิตเอนไซม์ใด และเมื่อทราบความเหมาะสมแล้ว ขั้นตอนต่อไปก็จะเป็นการ หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด โดยใช้การออกแบบการ ทดลองของทากูชิเข้ามาช่วย เพื่อให้การทดลองมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นดังจะกล่าวในรายละเอียด ต่อไปนี้

1. การศึกษาและเปรียบเทียบการใช้ รา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* เพื่อผลิต เอนไซม์โปรติเอสและไลเปส จากกากเมล็ดสับดูดำ โดยวิธีการหมักแบบแห้ง

จากการทดลองหมักกากเมล็ดสับดูดำ โดยวิธีการหมักแบบแห้ง พบว่า รา *Rhizopus oligosporus* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่า รา *Aspergillus oeyzae* ซึ่งมีค่า มากกว่าคิดเป็น 71.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการพิจารณา ณ ชั่วโมงการหมักที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไล เปสสูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 72 และ 120 ตามลำดับ และในส่วนของรา *Aspergillus oeyzae* นั้นจะมี ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่ารา *Rhizopus oligosporus* ซึ่งมีค่ามากกว่าคิด เป็น 10.47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการพิจารณา ณ ชั่วโมงการหมักที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 96 และ 48 ตามลำดับ

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิ (Taguchi)

ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยรา *Rhizopus Oligosporus* และผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ แบบ orthogonal array L²⁷ (3⁵) ซึ่งมีปัจจัยที่ใช้พิจารณา 5 ปัจจัยคือ สภาวะความชื้นของวัสดุหมัก ปริมาณดินเชื้อ อุณหภูมิในการหมัก วัสดุเพิ่มความพรุน และเวลาที่ใช้ในการหมัก พบว่า ที่ความชื้น

ของวัสดุหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณต้นเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ไม่ใส่วัสดุเพิ่มความพรุน และเวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยรา *Rhizopus Oligosporus* โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 278 หน่วยต่อน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง หรือเพิ่มขึ้นเป็น 59 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่ได้ออกแบบการทดลอง และพบว่า ความชื้นของวัสดุหมักที่ 45 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณต้นเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของวัสดุหมัก อุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส เมื่อใส่กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเพิ่มความพรุน และเวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสด้วยรา *Aspergillus oryzae* โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสเท่ากับ 14,108 หน่วยต่อน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง หรือเพิ่มขึ้นเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ยังไม่ได้ออกแบบการทดลอง

ข้อเสนอแนะ

1) ในงานวิจัยนี้ได้มีการศึกษา ถึงความสัมพันธ์ ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ กับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ถ้าหากทราบความสัมพันธ์ดังกล่าว ก็จะทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่จุลินทรีย์จะสามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดได้ ฉะนั้นควรศึกษาถึงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างให้มีความละเอียดมากกว่านี้

2) ในงานวิจัยนี้ได้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์ต่างๆ เป็นโปรตีน ฉะนั้นควรศึกษาเรื่องการ ย่อยของเอนไซม์โปรติเอส ที่อาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชลดา ช่อสตัย.2546. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธีรวัช และภาสนันท์ . 2548. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย *Aspergillus oryzae* โดยการหมักแบบ
แห้ง. โครงการงานปริญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธราธร พ่วงพลับ . 2549. การผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย *Rhizopus Oligosporus* โดยการหมักแบบ
แห้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

พิไลพรรณ พงษ์พล. 2525. ราวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ

พัชกุล จันทนมัญญะ. 2525. ข้าวสาเล. กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

วรพล สวยพุ่ม. 2551. การสกัดน้ำมันสบู่ดำ. แหล่งที่มา: <http://woraphon9.blogspot.com/2008/02/jatropha-curcaas-linn.html>, 18 ตุลาคม 2551.

วรารุณี ครุส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม . สำนักพิมพ์
โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 209น.

วรารุณี ครุส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโชค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1 ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

ลาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวพื้นฐาน 1**. สำนักพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุกัญญา พัวพันธุ์ “สบู่ดำ” พืชพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล. นิตยสารเทคโนโลยีชาวบ้าน. 1 กันยายน 2457

สุนทร ปิติเจริญพันธุ์. 2549. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในถังหมักแบบเพคเบด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ. 2550. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์. สบู่ดำ**, แหล่งที่มา : <http://www.doa.go.th/fieldcrops/hinut/index.HTML> , 21 กันยายน 2552

อวยพร เพชร หลายสี. 2548. สบู่ดำ: พืชพลังงานทดแทนในอนาคต .วารสารเศรษฐกิจการเกษตร 51(588):4-7

Akintayo E.T..2004. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. **Biores. Technology** 92 :307–310.

Arnold, R.G., Shahani, B.K. Dwivedi. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy product. **J. Dairy Sci.** 58: 1127-1143

A. Panday, P.Selvakumar, Carlos R. Soccol, Poonam Nigam, 2000. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, **School of applied biological and Chemical sciences**, University of Ulster

Bilgrami, K.S., R.N. Verma. 1978. **Physiology of fungi**. Vikas publishing House PVT, Ltd., New Delhi.

Box, G.E.P. and K.G. Wilson. 1951. **On the Experimental and Critique of Taguchi's Contribution to Quality and Reliability Engineering International**. 4: 123-131

- Cocharn T.W. and Vercellotti J.R. 1987. Hexosamine biosynthesis of fungi as a reliable index of fungal biomass accumulation in liquid and solid media. **Carbohydrate Res.** 61: 529 – 533.
- Carlsen,M.,A.B. Spohr, J. Nielsen and J. Villadsen. 1996. Effect of control gas Environments in solid state fermentation of rice. **Biotech.Bioeng.** 22:2219-2235
- Francis ,F.,A.Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs and A. Pandey. 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochem.Eng.J.**15:107-115
- G. Ruchi, Gupta Anshu, S.K. Khare,2007. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain:Production optimization by response surface methodology and application. **Biores. Technology.**99:4796–4802
- Gilbert, E.J. 1993. *Pseudomonas* Lipase: biochemical properties and molecular cloning. **Enzyme Microb. Technology.** 156: 634-636.
- zier, W.C. 1967. **Food Microbiology.** McGraw-Hill, Inc., America. 537p.
- Fakultas Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana.1992. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase . **Journal of General Microbiology**138, 2539-2544.
- Hesseltine C.W. 1977. Solid-state fermentation-Part 1. **Process Biochem.** 12(6): 24-27.
- Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. and Yamane, T. 1992. Purification and some characteristics of extracellular from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 56: 610-664.

- Keay L., Wildi B.S. 1970. Protease of genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. **Biotechnol. Bioeng.** 12: 179-212.
- Kwon, D.Y., Song, H.N. and S. H, Yeon. 1996. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 73: 1521-1525.
- Laxman R.S., Sonawane A.P. 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conediobolus coromatus*. **Process Biochem.** 40: 3152-5158.
- Linfield, M.W., D.J.O'Brion, S. Ying-Chieh. 1984. Lipid-lipases interactions.I. Fat spiltting with lipases from *Cadida rugosa* . **J.Am. Oil Chem.Soc.**61(6):1067-1071
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and C.H. Amundson. 1998 Kinetic and mechanism of catalzed by immobilized lipase. **Enzyme Microb. Technology.** 14: 426-446.
- Michael L.Shuler, Fikret Kargi. 2002. **Bioprocess Engineering (Basic concepts)**,second edition. Prentice Hall PTR. 553: p.49-53
- Munch, E., Kiefer.J.,1986. **Die purgiernu (*Jatropha curcase*)**. MSc thesis, Universität Hohenheim
- Nahas, E.1998. Control of Lipase production by *Rhizopus Oligosporus* under varius growth conditions. **J.Gen Microbiol.**134: 227-234
- Nikamal Mahunta, Anshu Gupta,S.K. Khare.2008.Production of protease and lipases by sovent tolerant *Psudomonas aeruginosa PsaA* in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate.**Biores. Technology** 99:1729-1735

- Rambult, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Elec. J. Biotechnol.** 3: 167-188.
- Ramachandran S., Patel A.K., Nampeethiri M., Francis F., Nagy V., Szakacs G. and Pandey A. 2003. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of alpha-amylase. **Biores. Tehcnol.** 93: 169-174.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. **Microbiol. Mol. Biol.** 62: 597-635.
- Rao, R.S. R.S. Prakasham, K. K. Prasad, S. Rajesham, P.N. Sarma and V. Rao. 2003. Xylitol production by *Candida* sp. : parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochem.** 39: 951-956.
- Reid, I.D. 1989. Solid state fermentation for biological delignification. **Enzyme Microb. Technology** 11: 789-803
- Ross, P. J. 1996. **Taguchi Techniques for Quality Engineering.** The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.
- Roy, R. K. 2001. **Design of Experiments Using the Taguchi Approach.** John Wiley & sons, Inc., Canada.
- Shuler M.L., Kargi F. 2002. **Bioprocess Engineering Basic Concepts, Second Edition.** Prentice Hall PTR. 553: 178-179.
- Sakurai Y., Lee T.H., Shiota H. 1977. On the convenient method of the glucosamine estimation in koji. **Agric. Biol. Chem.** 41: 619-624.

Seitz, E.W. 1974. Industrial application of microbial lipase : a review. **J. Amer. Oil Chem.Soc.** 51(2): 12-16.

Tsui, K. L. 1988. Strategies for planning experiments using orthogonal arrays and confounding tables. **Qual. reliab. eng. int.** 4: 113-122.

Ul-Haq,I., S.Idrees ,M.I.Rajoka. 2002. Production of lipase by *Rhizopus Oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochem.**37: 637-641

Wang R., Law R.C.S., Webb C. 2005. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochem.**40: 217-227.

Wang,H . L. and Hesseltine., W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Microbiology** 11, 727-732.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 64: 1657-1661.





ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

2. การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์

1. สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยการผสมกรดอะซิติก 2.9 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยการละลายโซเดียมอะซิเตท 1.65 กรัม หรือโซเดียมอะซิเตทแอนไฮไดรต์ 2.72 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยการผสมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 M 35.2 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 0.2 M 14.8 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 0.4 กรัม กับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N เตรียมโดยการผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (37 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยการละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 3.12 กรัม กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 M เตรียมโดยละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 3.56 กรัม กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เข้มข้น 0.05 M เตรียมโดยผสมสารละลายโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 M จำนวน 19.5 มิลลิลิตร กับสารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 M จำนวน 30.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ กลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร

6. สารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายเคซีนแขวนลอย 1.50 กรัม ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นพร้อมคนเบาๆ ให้เคซีนละลายจนหมด แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จากนั้นเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เข้มข้น 0.05 M จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

7. สารละลายกรดไทรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 0.4 M เตรียมโดยละลายกรดไทรคลอโรอะซิติก จำนวน 6.54 กรัม กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4 M เตรียมโดยละลายโซเดียมคาร์บอเนตจำนวน 4.24 กรัม กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

9. สารละลายตัวกระทำฟอลิน (Folin reagent) เตรียมได้โดยละลายสารละลายฟอลินกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เตรียมเสร็จต้องนำไปแช่ในตู้เย็นและที่มีดันทันที

10. สารละลายมาตรฐานแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลายแอล-ไทโรซีน 0.20 กรัม กับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร (เอาไว้ทำกราฟมาตรฐาน ถ้าไม่ทำก็ไม่ต้องเตรียม)

3. การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1. สารละลาย A: ชั่ง di-potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) 8.71 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B: ชั่ง potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) 6.80 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

3. ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการ

3.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8

1. สารละลาย A: ชั่ง monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 3.45 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B: ชั่ง dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 4.45 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

3. ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8

3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

1. ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน 2-propanol ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. ละลาย sodium deoxycholate (NaDoc) ปริมาณ 207 มิลลิกรัม และ gum arabic 100 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

3. ละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาณ 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4.4 นำสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลายข้อ 4.2 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

4. การหาปริมาณกลูโคซามีน

4.1 การเตรียมวัสดุหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

1. นำวัสดุหมักที่ผ่านการหมักชั่วโมงต่างๆอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 4 วัน มาบดละเอียดแล้วชั่งมาจำนวน 0.5 กรัม ลงในบีกเกอร์

2. เติมสารละลาย HCl conc. จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3. จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนในจำนวน 2 มิลลิลิตรมาเติมในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตรไว้แล้ว

4. นำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

5. นำมาปรับความเป็นกรด-เบสให้เป็นกลางด้วยสารละลาย NaOH 30 เปอร์เซนต์

6. นำมาปรับปริมาณเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จะได้ส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.2 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์กลูโคซามีน

1. สารละลาย 1.25 M Na_2CO_3 เตรียมโดยละลาย Na_2CO_3 จำนวน 6.625 กรัมกับน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
2. สารละลาย acetyl acetone reagent 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยผสมสารละลาย Acetyl acetone จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย 1.25 M Na_2CO_3 จำนวน 48 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้
3. สารละลาย Ehrlich reagent เตรียมโดยละลาย para-Dimethylamino benzaldehyde จำนวน 1.6 กรัม ในส่วนผสมของสารละลาย HCl conc. จำนวน 30 มิลลิลิตรและสารละลาย Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 2-3 วัน
4. สารละลาย NaOH 30 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลาย NaOH จำนวน 30 กรัมกับน้ำกลั่น จำนวน 100 มิลลิลิตร
5. สารละลาย HCl conc. (37 เปอร์เซ็นต์)



ภาคผนวก ข

การสร้างกราฟมาตรฐาน

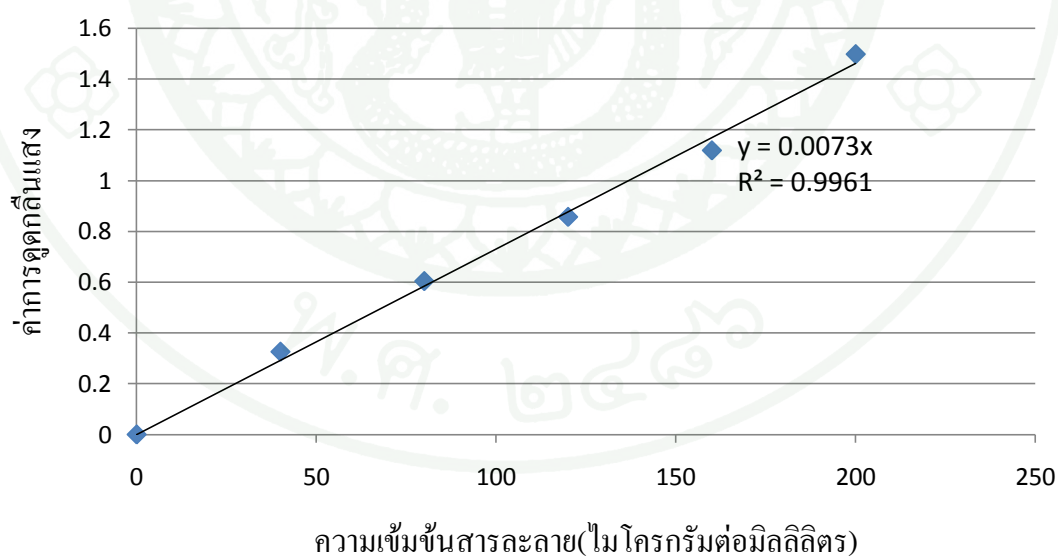
1. การสร้างกราฟมาตรฐานค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

1. เตรียมสารละลายแอล-ไทโรซีนเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลายแอล-ไทโรซีน 0.20 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร
2. คัดสารละลายแอล-ไทโรซีนเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นในแต่ละหลอดทดลอง ด้วยอัตราส่วนดังตารางผนวกที่ ค1
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4 M จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดแล้วเขย่าให้เข้ากัน
4. เติมสารละลายตัวกระทำฟอลินจำนวน 1 มิลลิลิตรแต่การเติมต้องเติมห่างกันหลอดละ 1 นาที เหมือนกับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส
5. ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงทันที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นหลอดควบคุม (น้ำกลั่น) แล้วตั้งเป็นค่าตั้งต้นด้วย ดังนั้นในการวัดก็ต้องวัดห่างกัน 1 นาที เหมือนกัน
7. วาดกราฟมาตรฐานโดยเขียนกราฟ แกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลายแอล -ไทโรซีน กับแกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสง
8. จากกราฟสามารถสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายแอล -ไทโรซีนได้ เมื่อเอาค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอสมาแทนในสมการก็จะรู้เข้มข้นของแอล -ไทโรซีนที่เปลี่ยนไป แล้วนำไปแทนค่าสูตรก็จะสามารถรู้ยูนิต ของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งกำหนดให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมโปรติเอส หมายถึง

ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้สารแอล-ไทโรซีน ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับ แอล-ไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายแอล-ไทโรซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณสารละลายแอล-ไทโรซีน (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลายแอล-ไทโร ซีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0	1.0	0
0.2	0.8	40
0.4	0.6	80
0.6	0.4	120
0.8	0.2	160
1.0	0	200



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

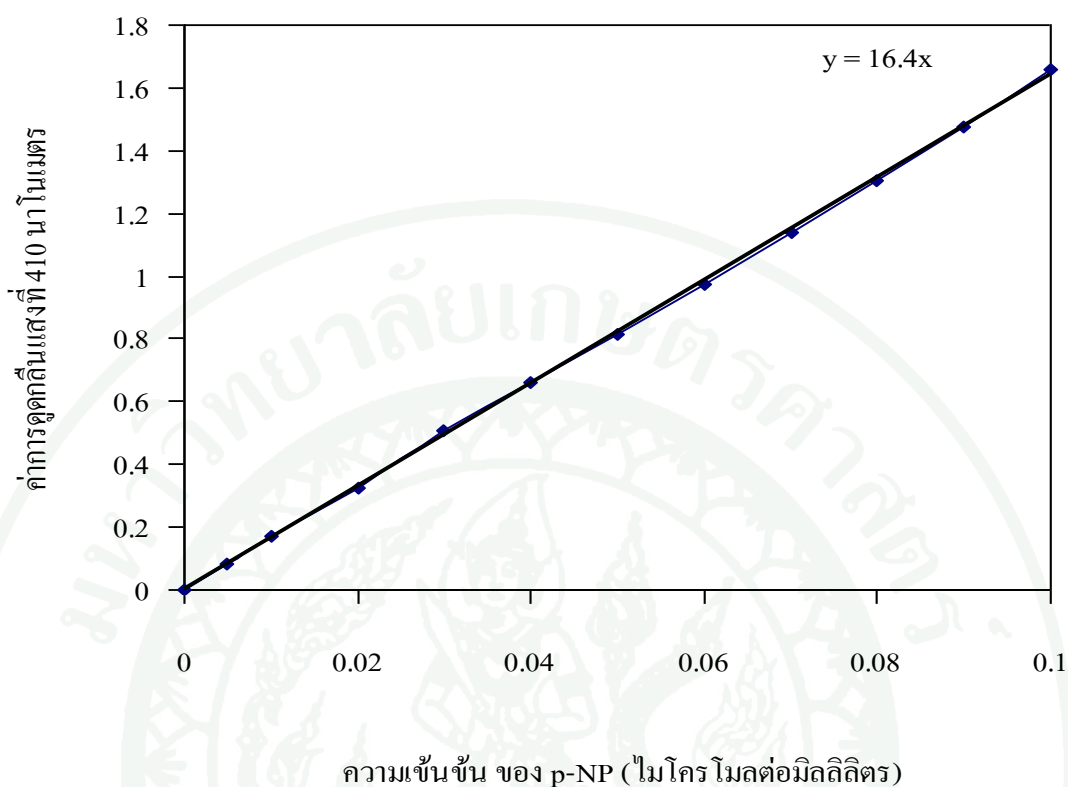
2. การสร้างกราฟมาตรฐานค่ากิจกรรมไอโซมไพลีส

1. เจือจางสารละลาย *p*-nitrophenol (*p*-NP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปเขียนกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol

ตารางผนวกที่ ข2 วิธีการเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol (*p*NP) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	pNP (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	pNP (0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)
1	0.000	0	5
2	0.005	0.1	4.9
3	0.010	0.2	4.8
4	0.020	0.4	4.6
5	0.030	0.6	4.4
6	0.040	0.8	4.2
7	0.045	0.9	4.1

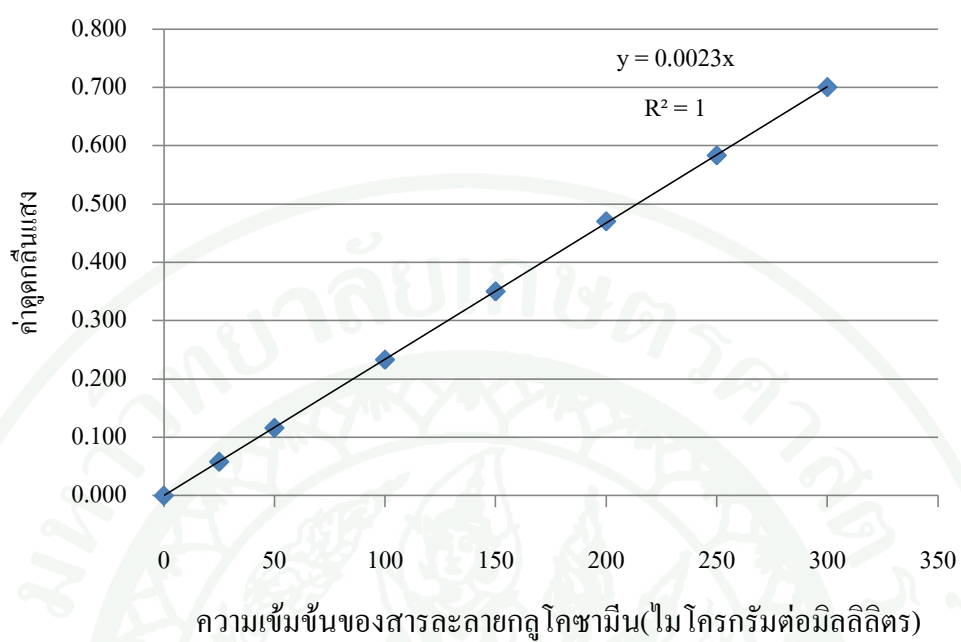


ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol

3. การสร้างกราฟมาตรฐานค่ากลูโคซามีน

1. Stock solution เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลาย Glucosamine Hydrochloride จำนวน 5 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. Working solution เตรียมโดยนำสารละลาย Stock solution ที่เตรียมไว้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25 , 50 , 100 , 150 , 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน



ภาคผนวก ค ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาและเปรียบเทียบการใช้รา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oeyzae* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส จากกากเมล็ดสตูปดำ โดยวิธีการหมักแบบแห้ง

ตารางผนวกที่ ค1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส โดยใช้กากเมล็ดสตูปดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ชั่วโมงที่	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	2,310	2,283	2,298	2,297
48	2,734	2,745	2,729	2,736
72	2,580	2,582	2,576	2,579
96	2,789	2,735	2,789	2,771
120	2,698	2,594	2,618	2,637

ตารางผนวกที่ ค2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ชั่วโมงที่	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	43.2	45.4	47.9	45.5
48	78.3	74.8	84.1	79.0
72	113.9	108.4	120.1	114.1
96	48.7	50.9	55.1	51.5
120	37.2	38.7	41.2	39.0

ตารางผนวกที่ ค3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae*

ชั่วโมงที่	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	545	544	530	540
48	1,483	1,447	1,574	1,501
72	2,540	2,645	2,566	2,584
96	3,071	3,109	3,104	3,094
120	2,707	2,787	2,810	2,768

ตารางผนวกที่ ค4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae*

ชั่วโมงที่	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	1.6	6.3	2.9	3.6
48	7.0	11.1	9.5	9.2
72	18.8	16.8	17.0	17.5
96	23.6	22.3	22.8	22.9
120	34.5	32.8	32.9	33.4

ตารางผนวกที่ ค5 ปริมาณกลูโคซามีนของวัสดุหมักโดยใช้กากเมล็ดสบู่ดำเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Rhizopus oligosporus*

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	4.35	10.87	7.30	7.51
48	13.91	13.65	14.09	13.88
72	20.61	21.96	23.57	22.04
96	29.96	31.00	33.04	31.33
120	42.17	45.17	44.87	44.07

ตารางผนวกที่ ค6 ปริมาณกลูโคซามีนของวัสดุหมักโดยใช้กากเมล็ดสับุด้าเป็นวัสดุหมัก ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรา *Aspergillus oeyzae*

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
24	9.57	11.56	8.09	9.74
48	17.83	17.85	17.85	17.84
72	21.30	24.04	24.04	23.13
96	24.74	23.38	24.78	24.30
120	28.26	26.30	29.61	28.06

ตอนที่ 2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากกากเมล็ดสับุด้า ด้วยรา *Rhizopus oligosporus* โดยวิธีทาคุชิ (Taguchi)

ตารางผนวกที่ ค7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	227.50	224.10	228.90	226.80
2	270.50	227.00	214.90	237.50
3	232.90	235.10	236.50	234.80
4	176.20	237.00	219.50	210.90
5	223.00	158.20	181.80	187.70
6	232.70	205.40	213.50	217.20
7	221.70	225.50	227.90	225.00
8	249.00	239.00	273.70	253.90
9	235.40	229.90	226.10	230.50
10	234.40	235.30	235.00	234.90

ตารางผนวกที่ ๗ (ต่อ)

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
11	218.70	216.40	219.10	218.10
12	275.60	159.90	220.10	218.50
13	242.20	239.50	246.10	242.60
14	275.50	271.80	270.60	272.60
15	242.30	246.90	247.60	245.60
16	221.20	227.90	210.00	219.70
17	222.40	179.30	257.80	219.80
18	246.80	218.30	262.30	242.50
19	201.80	192.70	195.00	196.50
20	237.60	214.30	211.10	221.00
21	210.60	223.30	207.10	213.70
22	200.10	245.10	201.80	215.70
23	212.40	215.40	218.70	215.40
24	226.40	225.60	222.50	224.80
25	235.10	238.20	239.20	237.50
26	229.50	227.80	224.20	227.20
27	271.30	208.90	216.50	232.20

ตารางผนวกที่ ค8 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	7,598	7,621	7,872	7,697
2	6,388	6,621	6,720	6,577
3	6,305	6,523	6,236	6,355
4	9,327	9,139	9,554	9,340
5	9,710	9,299	9,146	9,385
6	6,420	6,645	7,231	6,765
7	8,090	8,258	8,933	8,427
8	10,129	9,906	11,645	10,560
9	8,477	8,012	7,619	8,036
10	5,214	5,287	6,308	5,603
11	5,541	5,812	6,003	5,786
12	3,662	3,436	4,733	3,944
13	10,009	10,922	10,783	10,571
14	8,382	8,346	8,656	8,461
15	6,780	6,884	7,057	6,907
16	10,855	10,100	10,589	10,515
17	11,155	10,903	10,984	11,014
18	11,012	12,073	11,634	11,573
19	7,598	7,621	7,872	7,697
20	6,388	6,621	6,720	6,577

ตารางผนวกที่ ค8 (ต่อ)

การทดลอง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักวัสดุหมักแห้ง)			
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ค่าเฉลี่ย
21	8,515	8,660	7,787	8,321
22	6,628	6,238	6,946	6,604
23	8,858	8,901	9,452	9,070
24	7,798	7,566	7,755	7,706
25	4,714	4,275	4,918	4,636
26	5,851	6,000	5,315	5,722
27	12,667	12,178	11,286	12,044



ภาคผนวก ง การออกแบบการทดลองและการคำนวณโดยวิธีทาคุชิ

ภาคผนวก ง

การออกแบบการทดลองและการคำนวณโดยวิธีทากูชิ

1. การคำนวณการออกแบบโดยวิธีทากูชิ (Roy, 2001)

1. ค่า MSD เมื่อ QC = B (Bigger is better)

$$MSD = \frac{\left[\left(\frac{1}{y_1} \right)^2 + \left(\frac{1}{y_2} \right)^2 + \dots + \left(\frac{1}{y_n} \right)^2 \right]}{n}$$

2. อัตราส่วนที่ได้จากการเปลี่ยนรูปค่าตอบสนองของผลการทดลอง

$$S / N = -10 \log_{10} MSD$$

3. ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 1}}$$

4. เปอร์เซ็นต์อิทธิพล (% main effect)

$$\text{เปอร์เซ็นต์อิทธิพล} = 100 - \frac{\sum \text{main effect} - \text{main effect}}{\sum \text{main effect}} \times 100$$

5. ค่าองศาอิสระของแฟกเตอร์ (DOF_{Factor})

$$DOF_{Factor} = L - 1$$

6. ค่าองศาอิสระของข้อผิดพลาด (DOF_{Error})

$$DOF_{Error} = N(r-1)$$

7. ค่าองศาอิสระรวม (DOF_{Total})

$$DOF_{Total} = (N \times r) - 1$$

8. ค่าความแปรปรวน (variance, Var)

$$Var = \frac{SS}{DOF}$$

9. ค่าสัดส่วนความแปรปรวน (variance ratio, F_{ratio})

$$F_{ratio} = \frac{Var}{Var_{Error}}$$

10. ค่าความเชื่อมั่น (confidence)

$$Confidence = 100 - F_{DIST}(F_{ratio}, DOF_{Factor}, DOF_{Error}) \times 100$$

11. การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (result expected at optimum condition, Y_{opt})

$$Y_{opt} = \bar{T} + \left(\bar{A}_2 - \bar{T} \right) + \left(\bar{B}_3 - \bar{T} \right) + \left(\bar{C}_3 - \bar{T} \right) + \left(\bar{D}_1 - \bar{T} \right) + \left(\bar{E}_3 - \bar{T} \right)$$

$\bar{T}$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด

$\bar{A}_2$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย A ระดับที่สอง (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย A)

$\bar{B}_3$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย B ระดับที่สาม (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย B)

$\bar{C}_3$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย C ระดับที่สาม (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย C)

$\bar{D}_1$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย D ระดับที่หนึ่ง (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย D)

$\bar{E}_3$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย E ระดับที่สาม (ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของ ปัจจัย E)

12. ค่า MSD ที่ Y_{opt}

$$MSD = 10^{-(Y_{opt})/10}$$

13. ค่าประมาณ ($Y_{expected}$)

$$Y_{expected} = (MSD)^{-1/2}$$

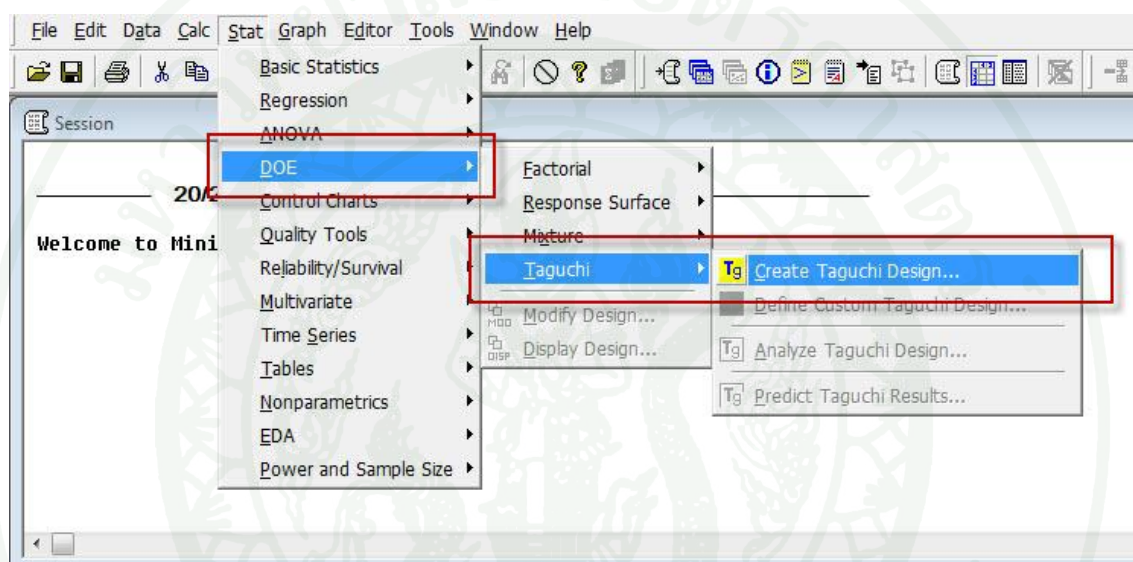
หมายเหตุ F_{DIST} เป็นค่าที่คำนวณโดยใช้ฟังก์ชันสำเร็จรูปใน โปรแกรม Excel โดยเป็นความสัมพันธ์

ระหว่างค่า F_{ratio} , DOF_{Factor} , DOF_{Error} โดย $y, \bar{y}, N, r, L, k$ และ $\bar{T}$ หมายถึง ผลการทดลอง ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง จำนวนการทดลอง จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง จำนวนระดับของแฟกเตอร์ ระดับของแฟกเตอร์ และค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมดตามลำดับ

2. การออกแบบการทดลองโดยวิธี Taguchi ด้วยโปรแกรม MINITAB version 14.0 โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

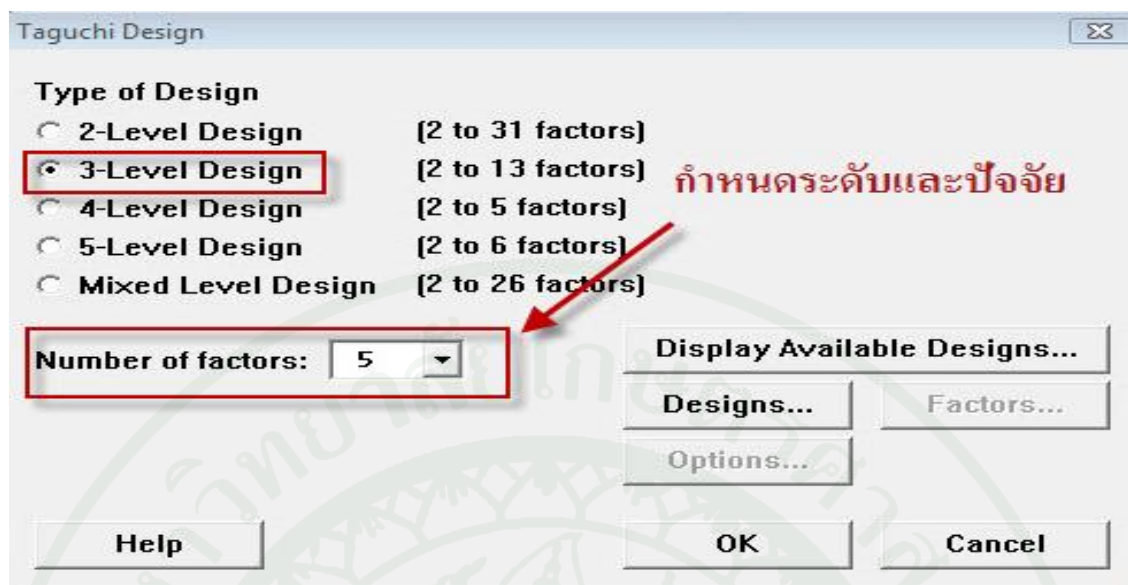
1. เข้าสู่โปรแกรม MINITAB version 14.0

2. เลือกฟังก์ชัน Stat → DOE → Taguchi → Create Taguchi Design



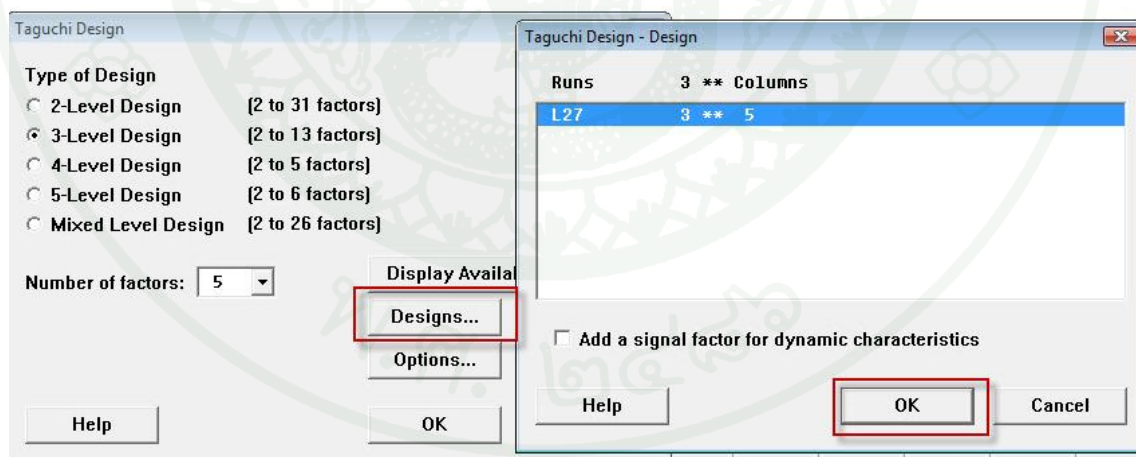
ภาพผนวกที่ ๑1 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ Taguchi

3. กำหนดระดับ (Level) และปัจจัย (Number of factor) ที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง โดยจะแบ่งเป็น 3 ระดับ และ 5 ปัจจัยที่ในการศึกษา



ภาพผนวกที่ ๖2 แสดงการกำหนดระดับและปัจจัย

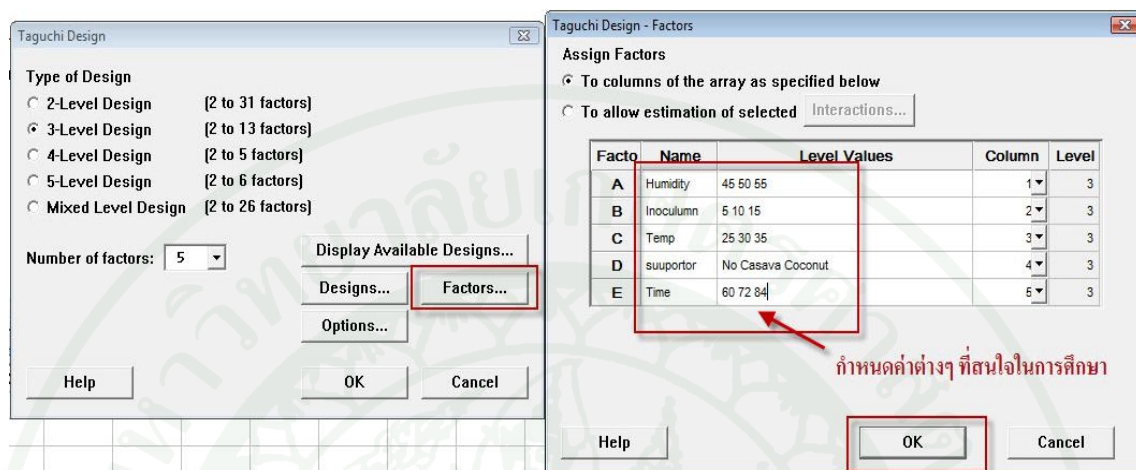
4. เลือกฟังก์ชัน Design



ภาพผนวกที่ ๖3 แสดงการเลือก Taguchi Design

5. เลือกฟังก์ชัน Factors → Assign Factors โดยกำหนดปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาในที่นี้คือ ความชื้น (Humidity) ปริมาณต้นเชื้อ (Inoculum) อุณหภูมิ (Temperature) วัสดุที่เพิ่มความพรุน (Supportor) และเวลาที่ใช้ในการบ่ม (Time) ส่วนระดับที่ใช้ในการศึกษาจะแบ่งเป็น 3 ระดับ

ด้วยกัน คือ ความชื้นที่ 45 50 55 ปริมาณดินเชื้อที่ 5 10 15 อุณหภูมิที่ 25 30 35 วัสดุที่เพิ่มความพรุน คือ กากสับุด้า กากมันสำปะหลัง กากมะพร้าว และเวลาที่ใช้ในการบ่มที่ 60 72 84 ชั่วโมง OK



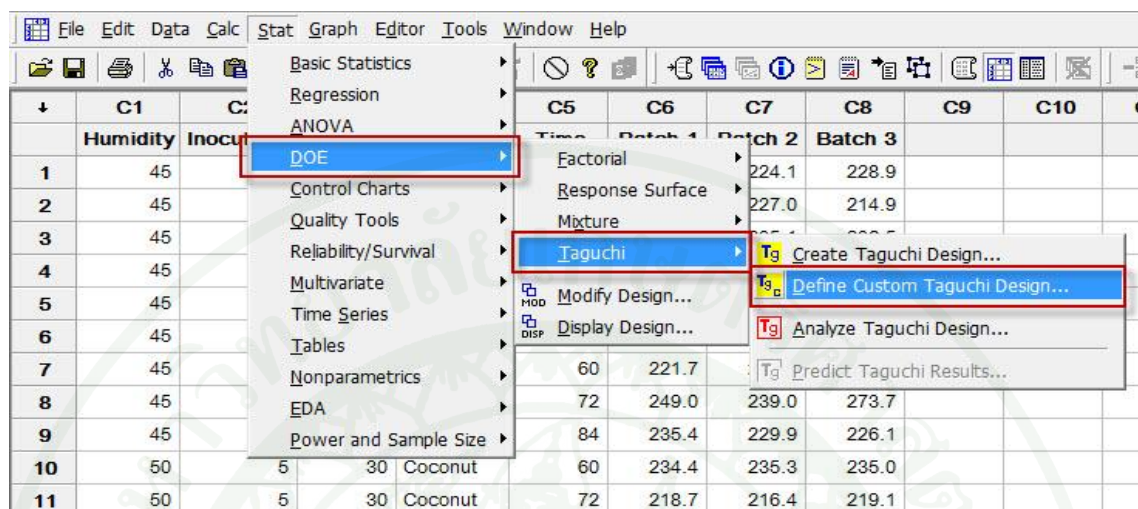
ภาพผนวกที่ ง4 แสดงค่าปัจจัยและระดับที่ใช้ในการศึกษา

6. เมื่อได้จำนวนการทดลองแล้ว จากนั้นทำการทดลองหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส จาก ภาพผนวก ข และนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้ จากผนวก ง ใ้ดังตัวอย่าง เพื่อใช้ในการ วิเคราะห์ต่อไป

↓	C1	C2	C3	C4-T	C5	C6	C7	C8
	Humidity	Inoculumn	Temp	Supportor	Time	Batch 1	Batch 2	Batch 3
1	45	5	25	No	60	227.5	224.1	228.9
2	45	5	25	No	72	270.5	227.0	214.9
3	45	5	25	No	84	232.9	235.1	236.5
4	45	10	30	Casava	60	176.2	237.0	219.5
5	45	10	30	Casava	72	223.0	158.2	181.8
6	45	10	30	Casava	84	232.7	205.4	213.5
7	45	15	35	Coconut	60	221.7	225.5	227.9
8	45	15	35	Coconut	72	249.0	239.0	273.7
9	45	15	35	Coconut	84	235.4	229.9	226.1
10	50	5	30	Coconut	60	234.4	235.3	235.0
11	50	5	30	Coconut	72	218.7	216.4	219.1
12	50	5	30	Coconut	84	275.6	159.9	220.1
13	50	10	35	No	60	242.2	239.5	246.1
14	50	10	35	No	72	275.5	271.8	270.6
15	50	10	35	No	84	242.3	246.9	247.6

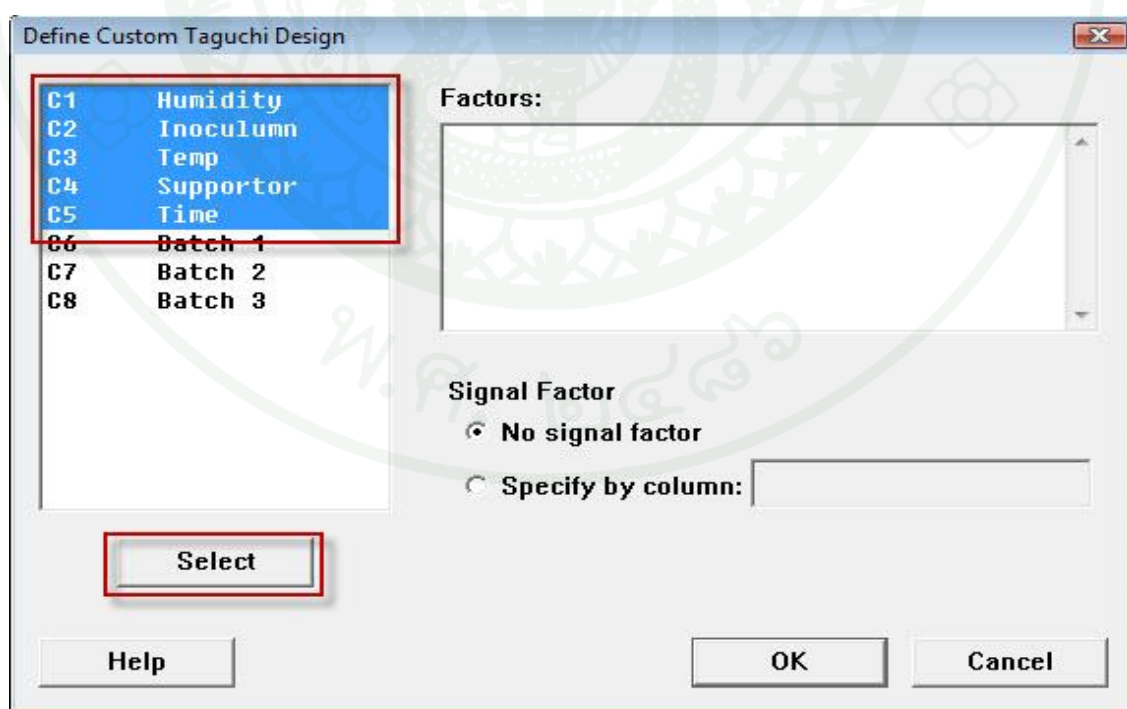
ภาพผนวกที่ ง5 แสดงผลการออกแบบการทดลองและใ้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

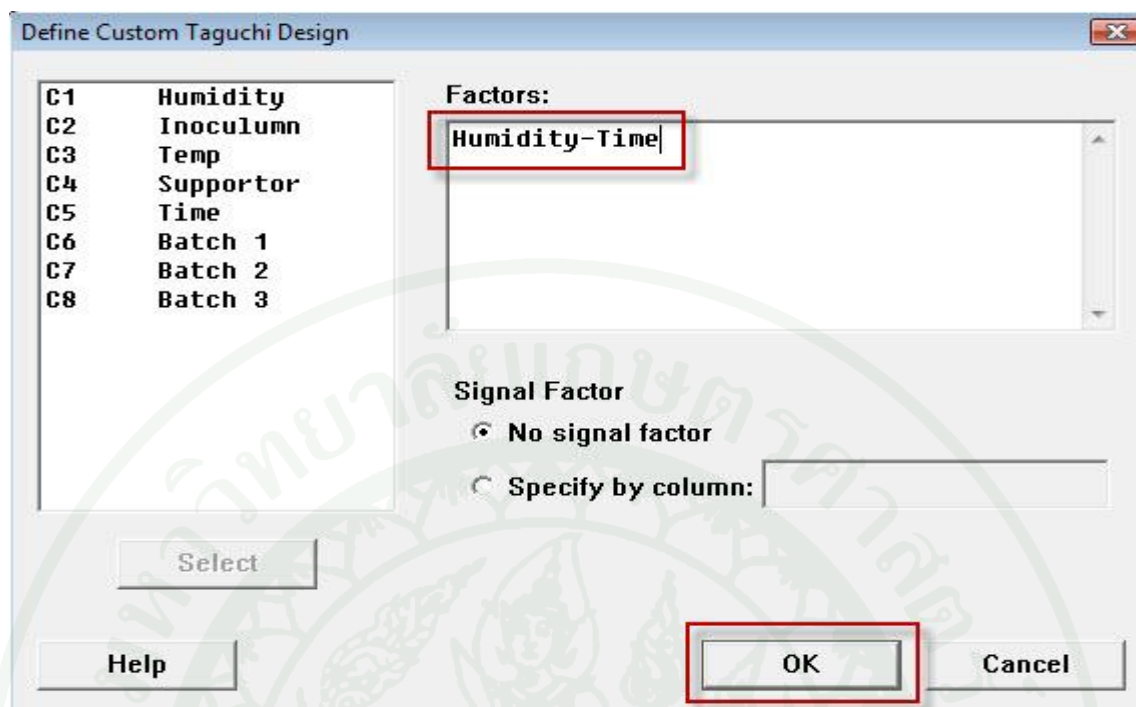
7. เลือกฟังก์ชัน Stat → DOE → Taguchi → Define Custom Taguchi Design



ภาพผนวกที่ 6 แสดงการเลือก Define Custom Taguchi Design

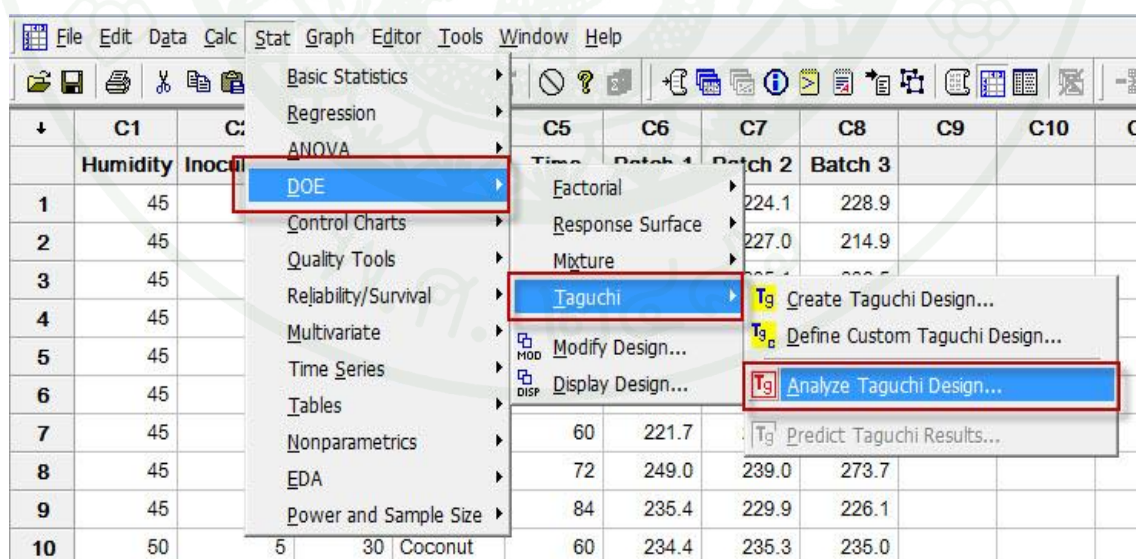
8. เลือกปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา





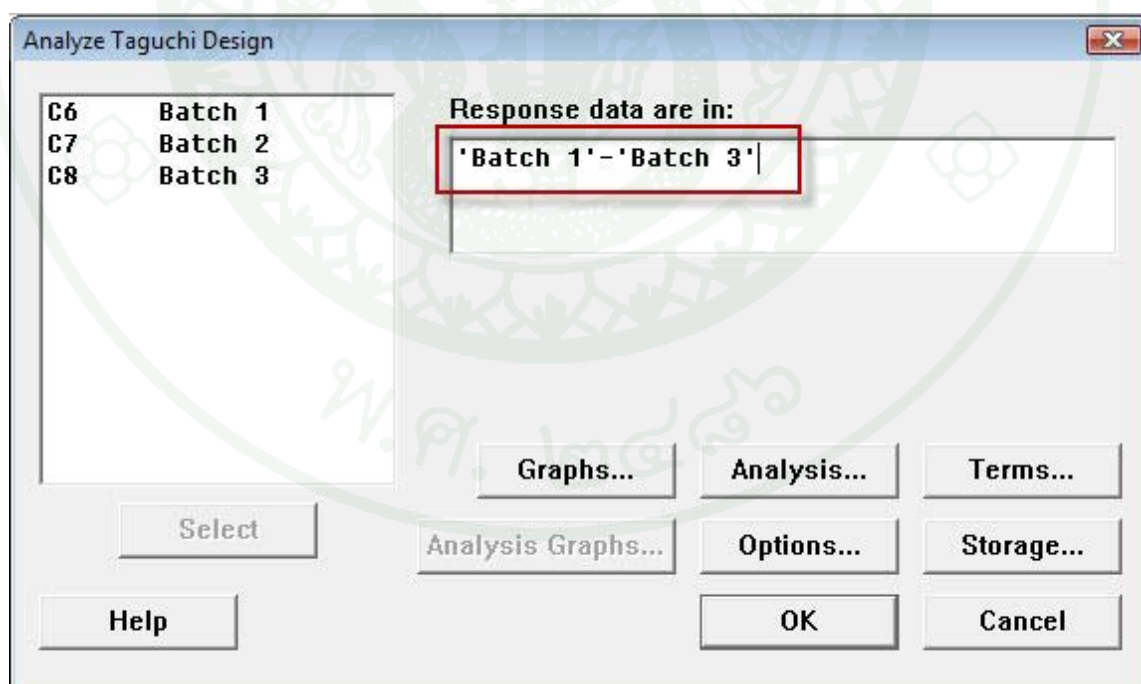
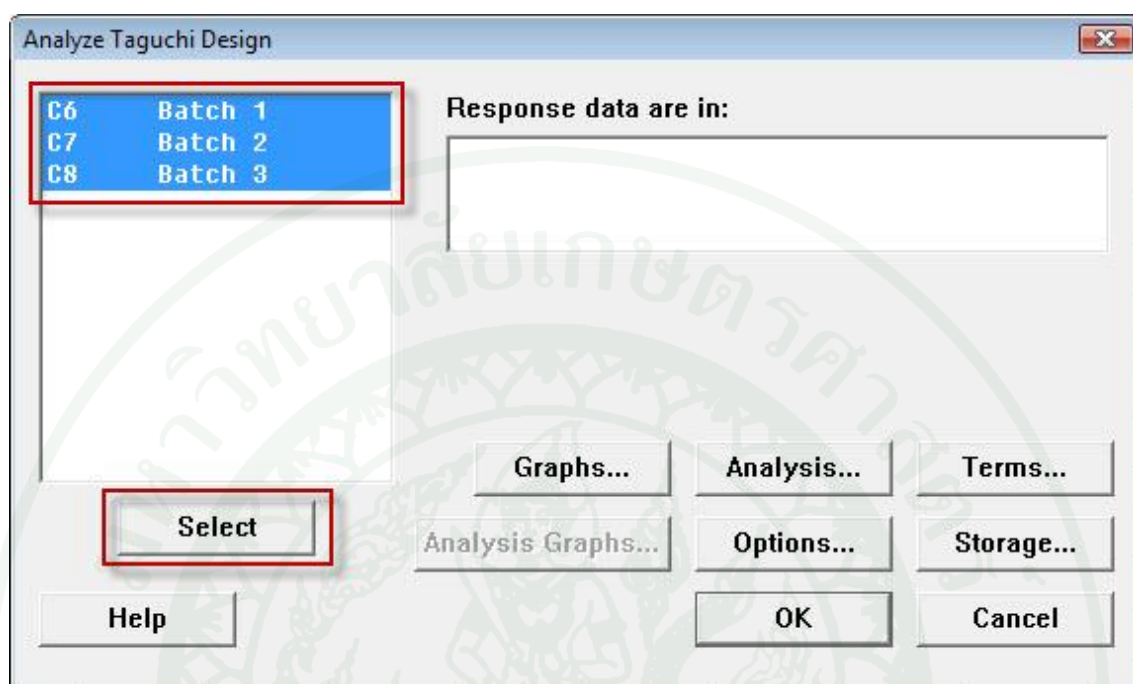
ภาพผนวกที่ ง7 แสดงการเลือกปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาใน Define Custom Taguchi Design

9. เลือกฟังก์ชัน Stat → DOE → Taguchi → Analyze Taguchi Design



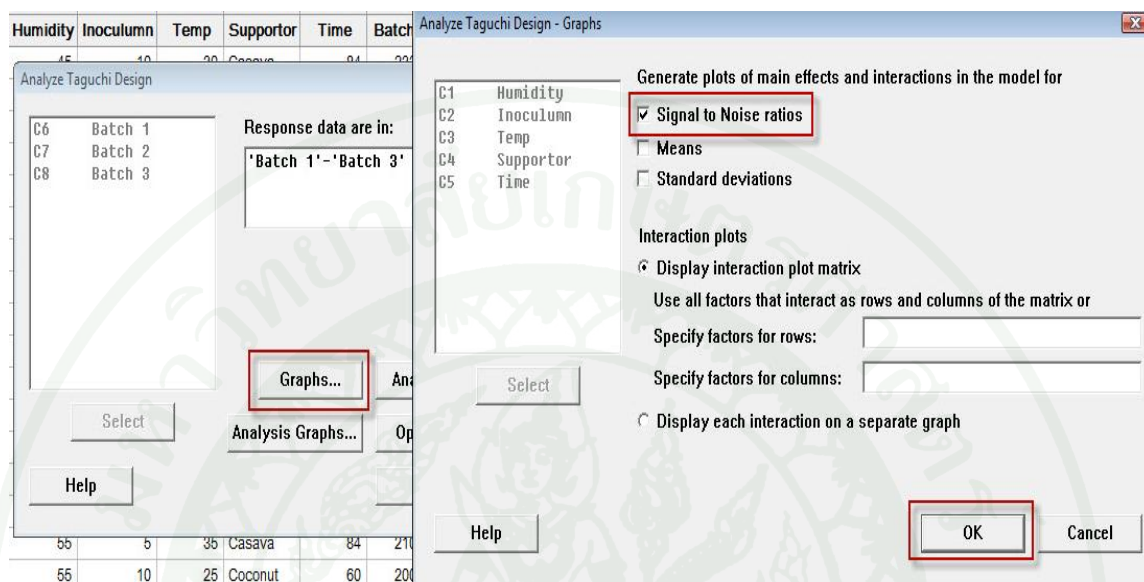
ภาพผนวกที่ ง8 แสดงการเลือก Analyze Taguchi Design

10. เลือกค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่จะใช้ในการวิเคราะห์



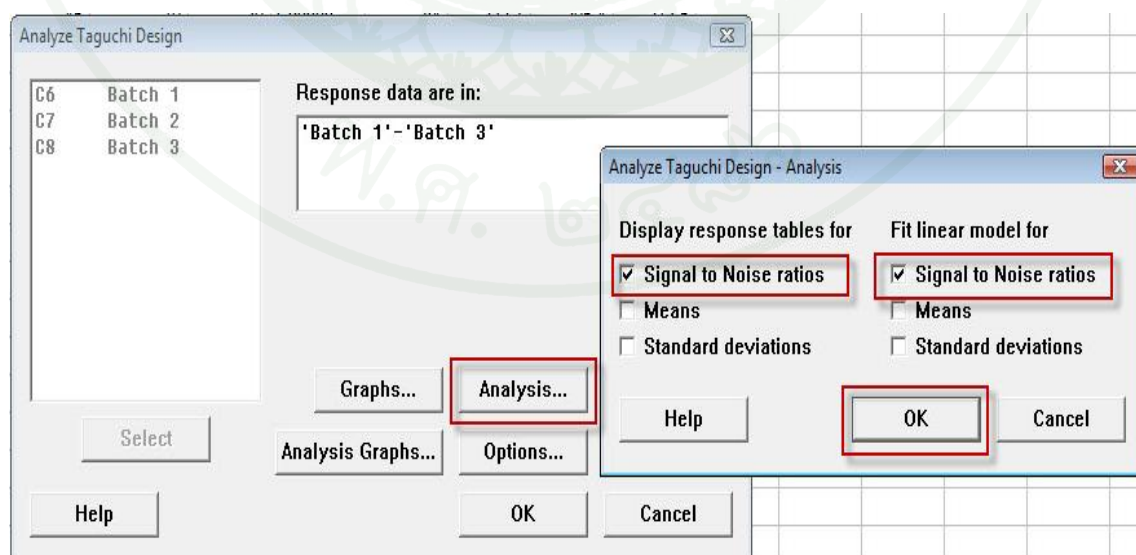
ภาพผนวกที่ ๑๑ แสดงการเลือกค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่จะใช้ในการวิเคราะห์

11. เลือกฟังก์ชัน Graph → Generate plots of main effects and interactions in the model →
for Signal to Noise ratios → OK



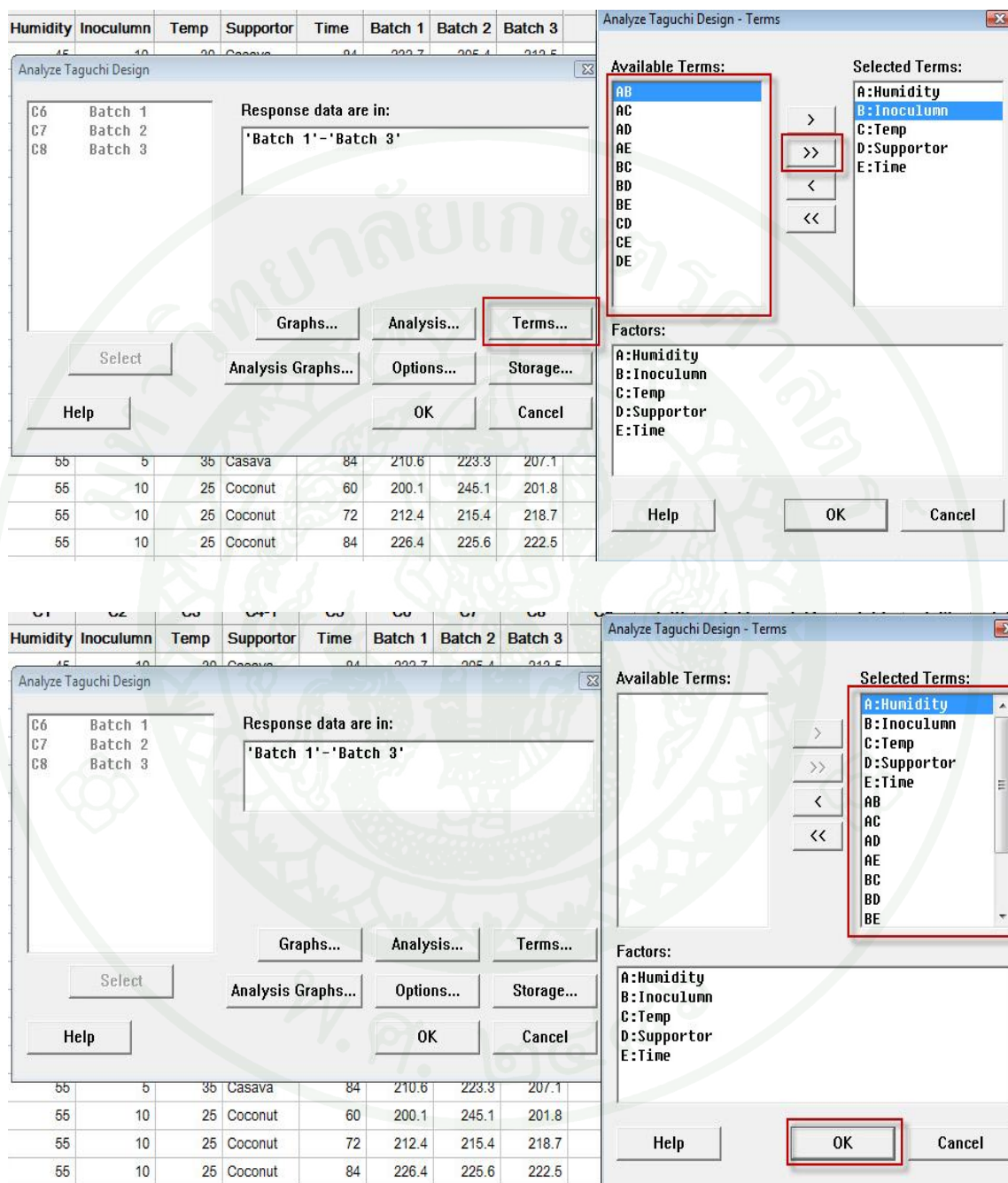
ภาพผนวกที่ 10 แสดงการเลือกฟังก์ชัน Graph

12. เลือกฟังก์ชัน Analysis → Display response table for → Signal to Noise ratios
และ Fit linear model for → Signal to Noise ratios → OK



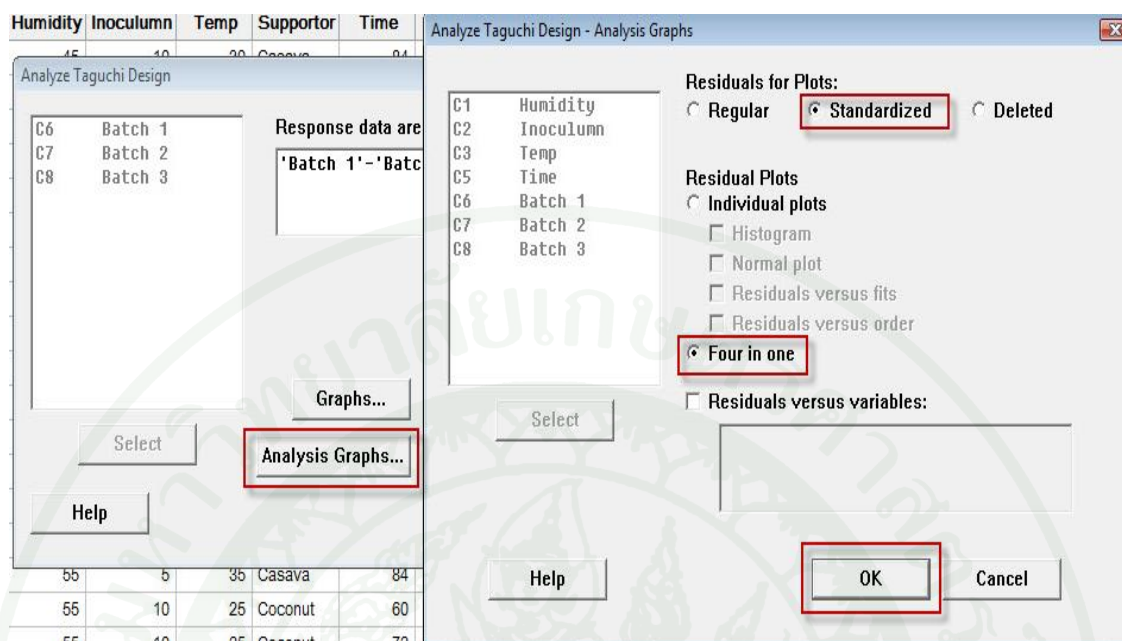
ภาพผนวกที่ 11 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ Taguchi

13. เลือกฟังก์ชัน Terms → Available Terms → OK



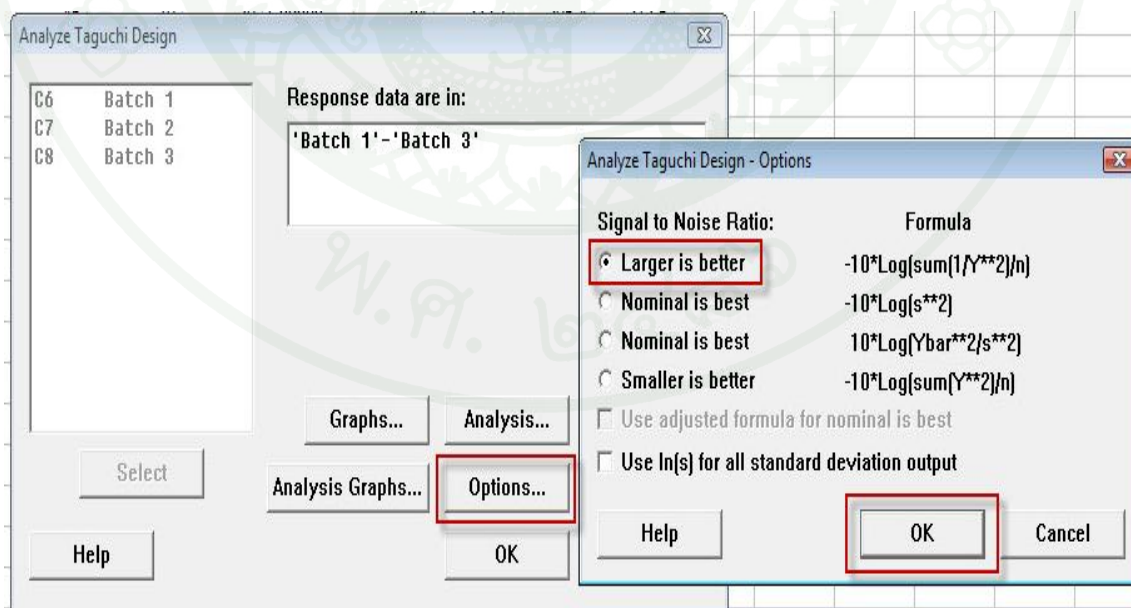
ภาพผนวกที่ 12 แสดงการเลือกฟังก์ชัน Terms

14. เลือกฟังก์ชัน Analysis Graphs → Residuals for plots → Standardized และ Residual Plots → Four in one → OK



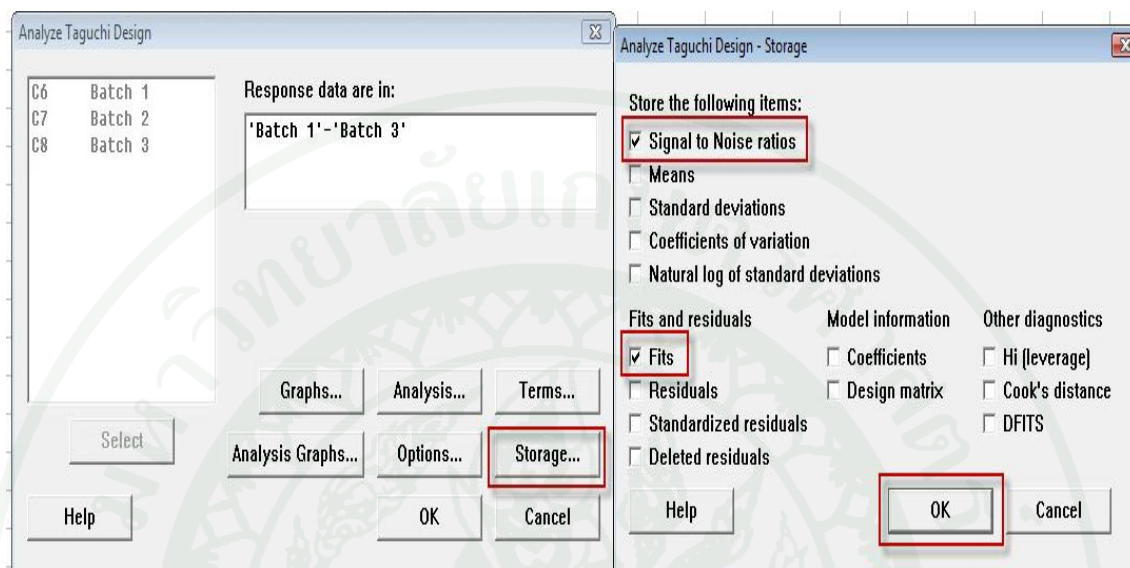
ภาพผนวกที่ 13 แสดงการเลือกฟังก์ชัน Analysis Graphs

15. เลือกฟังก์ชัน Options → Signal to Noise Ratio → Larger is better → OK



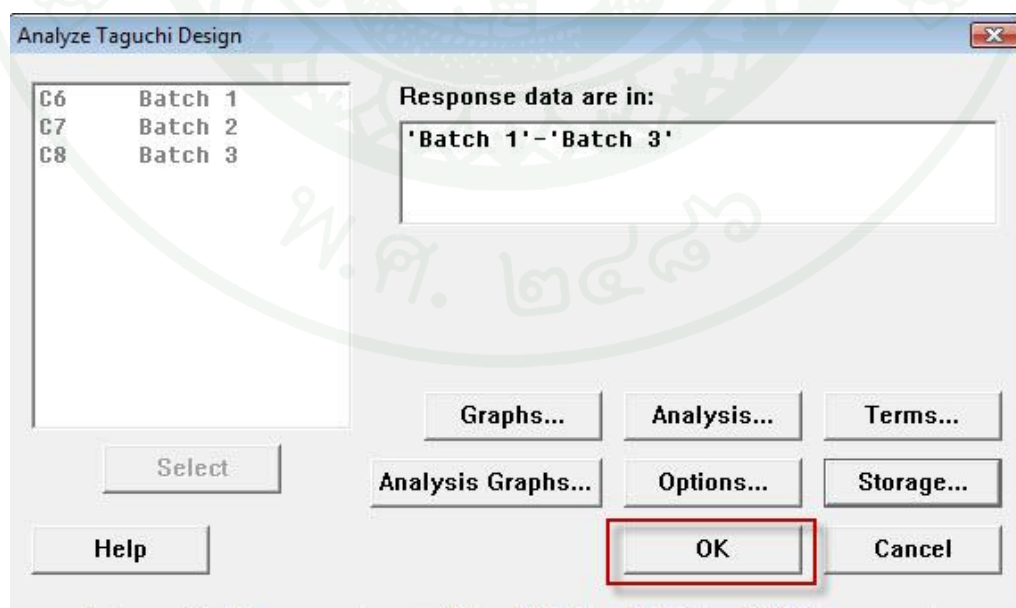
ภาพผนวกที่ 14 แสดงการเลือกฟังก์ชัน Options

16. เลือกฟังก์ชัน Storage → Store the following items → Signal to Noise Ratio
และ Fits and residuals → Fits → OK



ภาพผนวกที่ 15 แสดงการเลือกฟังก์ชัน Storage

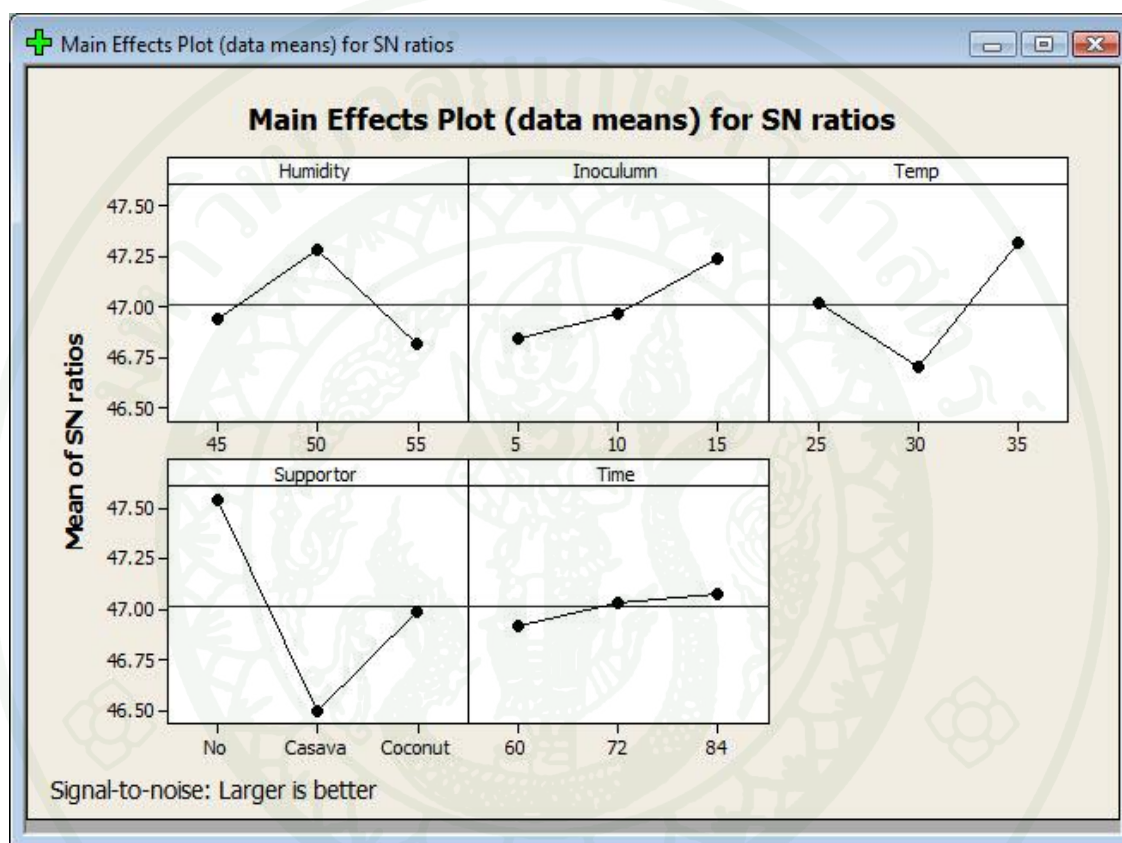
17. กด OK เพื่อให้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ



ภาพผนวกที่ 16 แสดงกด OK เพื่อให้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

3 ภาพสุดท้ายจะเป็นภาพตัวอย่างของการรันโปรแกรม ซึ่งแสดงเพราะส่วนที่มีความสำคัญในการทดลองซึ่งเป็นการรันโปรแกรมของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ซึ่งสามารถบอกถึงค่า R^2 ได้

18. แสดงการวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม Taguchi



ภาพผนวกที่ 17 แสดงกราฟ Main Effects Plot (data means) for SN ratios

Linear Model Analysis: SN ratios versus Humidity, Inoculum, Temp, ...

Estimated Model Coefficients for SN ratios

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	47.0123	0.04900	959.525	0.000
Humidity 45	-0.0735	0.06929	-1.061	0.320
Humidity 50	0.2690	0.06929	3.883	0.005
Inoculum 5	-0.1740	0.06929	-2.511	0.036
Inoculum 10	-0.0494	0.06929	-0.712	0.496
Temp 25	0.0071	0.06929	0.102	0.921
Temp 30	-0.3115	0.06929	-4.495	0.002
Supporto No	0.5338	0.06929	7.704	0.000
Supporto Casava	-0.5152	0.06929	-7.435	0.000
Time 60	-0.0897	0.06929	-1.294	0.232
Time 72	0.0247	0.06929	0.357	0.731
Temp*Time 25 60	-0.0968	0.09799	-0.987	0.352
Temp*Time 25 72	-0.1748	0.09799	-1.784	0.112
Temp*Time 30 60	0.4565	0.09799	4.659	0.002
Temp*Time 30 72	-0.3554	0.09799	-3.627	0.007
Supporto*Time No 60	-0.0158	0.09799	-0.161	0.876
Supporto*Time No 72	0.1711	0.09799	1.746	0.119
Supporto*Time Casava 60	-0.0885	0.09799	-0.903	0.393
Supporto*Time Casava 72	-0.3161	0.09799	-3.226	0.012

S = 0.2546 R-Sq = 96.0% R-Sq(adj) = 87.1%

ภาพผนวกที่ จ18 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

Analysis of Variance for SN ratios

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Humidity	2	1.0441	1.0441	0.52205	8.05	0.012
Inoculum	2	0.7433	0.7433	0.37167	5.73	0.029
Temperature	2	1.7072	1.7072	0.85360	13.17	0.003
Supporters	2	4.9566	4.9566	2.47832	38.24	0.000
Time	2	0.1158	0.1158	0.05789	0.89	0.447
Temperature*Time	4	2.6947	2.6947	0.67368	10.39	0.003
Supporters*Time	4	1.2574	1.2574	0.31435	4.85	0.028
Residual Error	8	0.5185	0.5185	0.06481		
Total	26	13.0377				

ภาพผนวกที่ จ19 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

Response Table for Signal to Noise Ratios
Larger is better

Level	Humidity	Inoculum	Temperature	Supporters	Time
1	46.94	46.84	47.02	47.55	46.92
2	47.28	46.96	46.70	46.50	47.04
3	46.82	47.24	47.32	46.99	47.08
Delta	0.46	0.40	0.62	1.05	0.15
Rank	3	4	2	1	5

ภาพผนวกที่ จ20 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

3. ตัวอย่างการคำนวณหาสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีทาคุชิ

โดยพิจารณาจากค่า S/N Ratio ที่สูงสุดของแต่ละปัจจัยเป็นระดับที่เหมาะสมในการทดลอง จากนั้นนำค่าผลการทดลองของระดับที่เหมาะสมมาทำการคำนวณค่าเมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

$$\text{จาก } Y_{opt} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_3 - \bar{T}) + (\bar{C}_3 - \bar{T}) + (\bar{D}_1 - \bar{T}) + (\bar{E}_3 - \bar{T})$$

เมื่อ $\bar{T} = 47.01148$, $\bar{A}_2 = 47.28$, $\bar{B}_3 = 47.24$, $\bar{C}_3 = 47.32$, $\bar{D}_1 = 47.55$, $\bar{E}_3 = 47.08$
แทนค่าจะได้

$$Y_{opt} = 47.01148 + (47.28 - 47.01148) + (47.24 - 47.01148) + (47.32 - 47.01148) + (47.55 - 47.01148) + (47.08 - 47.01148)$$

$$Y_{opt} = 48.42408$$

Y_{opt} นั้นคำนวณจาก S/N ratio ฉะนั้น Y_{opt} ในที่นี้คือ Y_{opt} ที่อยู่ในรูปของค่า S/N ratio จากนั้นทำการคำนวณ S/N ratio ที่ได้ให้อยู่ในรูปของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

$$\text{จาก } MSD = 10^{-(Y_{opt})/10}$$

$$MSD = 10^{-(48.42408)/10}$$

$$MSD = 0.0000143$$

$$\text{จาก } Y_{expected} = (MSD)^{-1/2}$$

$$Y_{expected} = (0.0000143)^{-1/2}$$

$$Y_{expected} = 261.90$$

เพราะฉะนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการคำนวณ จะเท่ากับ 261.90

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ อำพล เลือดสงคราม

เกิดวันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528

สถานที่เกิด อำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา

ประวัติการศึกษา ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนพิมายวิทยา
ระดับอุดมศึกษา วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและ
วัสดุขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์