สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราซึ่งแยกได้จากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นายจักราวุธ ไม้ทิพย์
นางสาวเพลินพิศ อนุสิกข์วัฒนา

วพ.
จ2377ส
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83745
วัน,เดือน,ปี 15 ก.ย. 2551

b.11977474
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fungal Protease Isolated from Northern Traditional Fermented Soybean (TOA-NAO) in Differential Solid State Fermentation

Mr. Jakkrawut Maitip

Miss Pleonpis Anusikwattana

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of The Requirement for

The Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Program of Industrial Microbiology Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราซึ่งแยกได้จากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นักศึกษา นายจักราวุธ ไม้ทิพย์ รหัส 47050503

นางสาวเพลินพิศ อนุสิกข์วัฒนา รหัส 47050522

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา อ. ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	
กรรมการ อ. ดนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราซึ่งแยกได้จากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นักศึกษา นายจักราวุธ ไม้ทิพย์

นางสาวเพลินพิศ อนุสิกข์วัฒนา

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

จากการนำเอาเชื้อราที่แยกได้จากถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านของจังหวัดภาคเหนือใน 4 จังหวัดทั้งหมด 14 ไอโซเลตและเชื้อแอคติโนมัยสีท 1 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อราและแอคติโนมัย-สีทดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น โดยดูจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skim milk agar ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อรา ไอโซเลต CHA 2 มีขนาดวงใสสูงที่สุด และรองลงมา คือ ไอโซเลต TK 2 จึงได้คัดเลือกเชื้อราทั้งสอง ไอโซเลตมาทำการศึกษาต่อไป ทำการจำแนกเชื้อรา ไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและ fruiting body สามารถจำแนกได้เป็น *Aspergillus* sp.

หลังจากนั้นนำเชื้อราทั้งสองไอโซเลตมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาระยะเวลาการบ่มและชนิดของสับสเทรตที่เหมาะสม ปรากฏว่า ชั่วโมงที่ 72 เป็นระยะเวลาการบ่มที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยในชั่วโมงที่ 72 สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก มีผลให้เชื้อราทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงที่สุด โดยเมื่อตรวจกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา ไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ในชั่วโมงที่ 72 ตามวิธีของ Germano และคณะ (2003) มีค่าเท่ากับ 23.23 และ 19.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต ตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้มาทดสอบหาประเภทของเอนไซม์เบื้องต้นโดยดูจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์จากเชื้อราหมายเลขไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ถูกยับยั้งการทำงานใน Skim milk agar ที่มี 0.2 M $KMnO_4$ เมื่อพิจารณาข้อมูลที่ได้จากตัวยับยั้งและค่าความเป็นกรด-ด่างทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราทั้งสองไอโซเลตนั้นน่าจะเป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มแอสปา-ติกโปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Fungal Protease Isolated from Northern Traditional Fermented Soybean (TOA-NAO) in Differential Solid State Fermentation
Name	Mr. Jakkrawut Maitip Miss Pleonpis Anusikwattana
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Khanungkan Klanbut

Abstract

Fourteen fungi and one actinomycete were isolated from fermented soybean in 4 provinces of Northern Thailand, and all isolates were preliminary screened for protease production by measuring the clear zone in skim milk agar at 28°C, 72 hours. Fungus isolates no.CHA 2 and no.TK 2 were capable of secreting and producing the widest clear zones. These isolates were selected for future study. CHA 2 and TK 2 strains were identified to be *Aspergillus* sp. by the characterization of its mycelium and fruiting body

The production of protease from fungus isolates no.CHA 2 and no.TK 2 were using different agricultural wastes and different particle sizes among defatted soybean (DF) and wheat bran (WB) as substrate. The results were founded that the combination between 1:1 (w/w) defatted soybean and wheat bran (particle size lower than 0.8 mm) is the best inducer for protease production.The protease activity was determined by according to the method described by Germano et al.(2003). The maximum production of protease was obtained after 72 hours (23.23 U/g IDS from isolate no.CHA 2; 19.03 U/g IDS from isolate no.TK 2). $KMnO_4$ was found to the most inhibited the protease activity. The data from pH and inhibitors indicated that protease from fungus isolates no.CHA 2 and no.TK 2 were likely aspartic protease.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนความกรุณาในการตรวจทานโครงงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ผู้จัดทำ โดยเฉพาะรองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาให้ความเมตตา แนะนำช่วยเหลือ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน โดยเฉพาะพี่ประเสริฐวิทย์ พี่อนิทัตและพี่เอกภพ ที่ให้ความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณ บริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์รำข้าวสาลีสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัย และ บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้วสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้อง พี่ๆ และเพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา รวมทั้งผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วนมา ณ โอกาสนี้ ในความกรุณาช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษา อุปกรณ์การศึกษา ความช่วยเหลือต่างๆ และเคียงข้างให้กำลังใจเสมอมา

จักราวุธ ไม้ทิพย์

เพลินพิศ อนุสิกข์วัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	7
2.1 ถั่วเหลืองหมัก	7
2.2 เกณฑ์ในการจัดจำแนกเชื้อรา	10
2.3 เอนไซม์โปรติเอส	12
2.4 การพัฒนาและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	38
2.5 กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง	52
2.6 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส	62
2.7 การเก็บรักษาเชื้อรา	62
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	66
3.1 วัสดุอุปกรณ์	66
3.2 เครื่องมือ	67
3.3 สารเคมี	68
3.4 วิธีการทดลอง	69
3.4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อรา	69
3.4.2 การเตรียมสารละลายสปอร์	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.3 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อราไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด 69

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรต 70

3.4.5 การทดสอบเพื่อหาชนิดของสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง 70

3.4.6 การสกัดเอนไซม์ 71

3.4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 71

3.4.8 การหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 72

3.4.9 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง 72

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 74

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 89

เอกสารอ้างอิง 91

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 99

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเทรต 102

ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์ 105

ภาคผนวก ง วิธีการวิเคราะห์ 108

ภาคผนวก จ สูตรคำนวณ 110

ภาคผนวก ฉ ผลการทดลอง 111

ภาคผนวก ช รูปภาพ 119

ภาคผนวก ซ ผลการวิเคราะห์กากถั่วเหลือง จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด 138

ประวัติผู้เขียน 140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลชีพชนิดต่างๆ	13
2	แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ	13
3	แสดงการใช้ประโยชน์ของโปรติเอส	14
4	การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอสในทางอุตสาหกรรม	15
5	ตำแหน่งของ substrate ที่โปรติเอสชนิดต่าง ๆ เข้าทำปฏิกิริยาของโปรติเอส	23
6	แสดงมูลค่าการนำเข้าเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991-1995	24
7	องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า	26
8	องค์ประกอบของรำข้าวสาลี	27
9	องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี	27
10	ส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวสาลี	40
11	สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี	42
12	องค์ประกอบของโปรตีนและกรดอะมิโนในรำข้าวสาลี	44
13	องค์ประกอบของเถ้าและแร่ธาตุอื่นในรำข้าวสาลี	45
14	องค์ประกอบของไขมันในรำข้าวสาลี	46
15	วิตามินในรำข้าวสาลี	47
16	คาร์โบไฮเดรตในรำข้าวสาลี	47
17	ส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง (โดยน้ำหนักแห้ง)	48
18	ส่วนประกอบโดยประมาณของกากถั่วเหลือง	51
19	องค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง	52
20	ตัวอย่างของกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง	54
21	เชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากถั่วเน่าที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในเขตภาคเหนือ	74
22	แสดงปริมาณโปรตีนของสับสเทรตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลตต่างๆ	77
23	แสดงขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสบน skim milk agar ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต	111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
24	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต CHA 2	112
25	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต TK 2	112
26	แสดงค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น ของสับสเทรตชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต CHA 2	113
27	แสดงค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น ของสับสเทรตชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต TK 2	113
28	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	114
29	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	115
30	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	116
31	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	116
32	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	117
33	แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ	117
34	แสดงการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรต	118
35	แสดงผลการวิเคราะห์กากถั่วเหลือง จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด	139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของถั่วเน่าแบบสด และแบบแคป	9
2	ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรติเอส	12
3	แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าวสาลี	41
4	แสดงรายละเอียดโครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี	41
5	แสดงลักษณะของรำข้าวสาลี	43
6	แสดงลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง	48
7	แสดงลักษณะของกากถั่วเหลือง	51
8	แสดงกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักในกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อรา	59
9	แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เชื้อรา	59
10	แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักชนิดถาด	60
11	แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ packed bed	60
12	แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ rotating drum	61
13	แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ Rocking drum, Stirred bed และ Gas-solid fluidized bed	61
14	แสดงลักษณะวงใสของเชื้อราไอโซเลตต่างๆ	75
15	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสบน skim milk agar ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต	76
16	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต CHA 2	79
17	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต TK 2	80
18	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต CHA 2	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่ม ของสับสเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต TK 2 84

20 แสดงผลของตัวยับยั้งที่มีต่อสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 85

21 แสดงผลของตัวยับยั้งที่มีต่อสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 86

22 แสดงผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์) 87

23 แสดงผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต TK 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์) 88

24 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CH 1 119

25 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CH 2 120

26 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CH 3 121

27 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CH 4 122

28 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CHA 1 123

29 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CHA 2 124

30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต CHA 3 125

31 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MAA 1 126

32 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MAA 2 127

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
33	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MAA 3	128
34	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลตMAA 4	129
35	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MAA 5	130
36	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต TK 1	131
37	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต TK 2	132
38	แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต TK 3	133
39	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลี แบบละเอียด	134
40	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลี แบบหยาบ	134
41	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบละเอียด	134
42	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบหยาบ	135
43	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบละเอียด	135
44	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบหยาบ	135
45	แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลี แบบละเอียด	136

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

46 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีแบบหยาบ 136

47 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบละเอียด 136

48 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบหยาบ 137

49 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบละเอียด 137

50 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วแบบหยาบ 137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญในทางการค้า มีการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสำคัญในการทำลายโมเลกุลของโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) พันธะเพปไทด์ (peptide bond) (ปราณี, 2547)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เอ็กโซเพปทิเตส (exopeptidase) และเอนโดเพปทิเดส (endopeptidase) โดย เอ็กโซเพปทิเดส คือ เอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเทรต จากตำแหน่งการเกิดปฏิกริยาที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ทำให้สามารถแบ่งเอ็กโซเพปทิเดสได้เป็น อะมิโนเพปทิเดส (aminopeptidase) และคาร์บอกซีเพปทิเดส (carboxypeptidase) ส่วนเอนโดเพปทิเตส คือ เอนไซม์ที่เกิดปฏิกริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของสายโพลีเพปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโนและคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดเพปทิเดสสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเร่งปฏิกริยา คือ ซีรีนโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอส (sereine protease หรือ alkaline protease) แอสปาร์ติกโปรติเอสหรือแอซิดโปรติเอส (aspartic protease หรือ acid protease) ซีสเทอีนโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส (cystein protease หรือ thiol protease) และเมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) (Rao และคณะ, 1998)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย Proteolytic enzyme เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และยังใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมเนยแข็ง อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมเบียร์ อุตสาหกรรมเนื้อ อุตสาหกรรมธัญพืช อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมการผลิตยา นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ในการกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีชีวภาพอีกด้วย (Wiseman, 1993; Rao และคณะ, 1998) และนอกจากประโยชน์ที่ใช้ในด้านอุตสาหกรรมแล้ว ประโยชน์ที่ได้ที่มีความสำคัญไม่แพ้กัน คือทางด้านอาหารและโภชนาการ ดังที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเอนไซม์โปรติเอสเป็น Proteolytic enzyme ซึ่งสามารถพบได้จากแหล่งต่าง ๆ หลายแหล่ง คือ พืช เช่น ปาเปน (papain) จากยางของผลมะละกอ หรือ โบรมีเลน (bromelain) จากสับปะรด จากสัตว์ เช่น ทริปซิน (tripsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร หรือ เพปซิน (pepsin) ในกระเพาะของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น *Aspergillus niger* *Aspergillus terreus* *Penicillium sp.* (Pandey และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacillus licheniformis NH1 *Pseudomonas aeruginosa* strain K และ *Streptomyces* sp. เป็นต้น ซึ่งเชื้อบางชนิดนั้นได้ถูกนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทต่าง ๆ โดยเฉพาะธัญพืชประเภทถั่วเหลือง ซึ่งมีโปรตีนที่ย่อยสลายง่ายสูงซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีราคาถูก ซึ่งเชื่อว่ามีผลในการลดความเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งและความดันโลหิตสูงสามารถหาได้ง่ายซึ่งจะเห็นได้จากการที่ชาวเอเชียใช้ถั่วเหลืองเป็นอาหารมานับพัน ๆ ปี เช่น เต้าหู้ที่ผลิตโดยชาวจีน นัตโตของชาวญี่ปุ่น เทมเป้ของชาวอินโดนีเซีย และถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารประเภทถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นกรรมวิธีดั้งเดิมสืบทอดกันมานานหลายชั่วอายุคนแล้ว โดยถั่วเน่าของไทยมีความใกล้เคียงกับนัตโต (natto) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้รับการพัฒนาไปเป็นสารเพิ่มกลิ่นและรสในอาหาร และในอาหารขบเคี้ยวที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ยังมีอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองหมักที่มีลักษณะคล้ายถั่วเน่า คือ คีเนมา (kenema) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองที่ทำจากถั่วเหลืองหมักของชาวเนปาลและอินเดีย และ chungkookjang ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงรสของประเทศเกาหลี (นวพร และ สุพจน์, 2544) โดยในส่วนของถั่วเน่าของประเทศไทยจะใช้ถั่วเหลือง เกลือ เครื่องเทศชนิดต่างๆ เช่น กระเทียม ข่า พริก และจุลินทรีย์ ซึ่งการผลิตถั่วเน่าแบบชาวบ้านจะไม่มีการควบคุมคุณภาพ หรือการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ ปัจจุบันการผลิตถั่วเน่าแทบจะไม่ปรากฏให้เห็นในวิถีชีวิตของชาวบ้าน นับว่าเป็นเรื่องที่น่าเสียดายอย่างยิ่งที่ภูมิปัญญาชาวบ้านกำลังจะสูญหายไปจากท้องถิ่น เพราะการผลิตถั่วเน่าเป็นการแปรรูปอาหารอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้มีอาหารบริโภคหลากหลาย เก็บรักษาได้นานขึ้นและยังได้เครื่องปรุงรสอาหาร รวมทั้งเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการอีกด้วย (ภาณุวรรณ, 2543)

สำหรับจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ใช้ในการหมักถั่วเน่านั้น ดุษณี (2546) ได้รายงานจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีอยู่ในถั่วเน่าได้แก่ *B. subtilis* *B. laterosporus* *B. punilus* *B. brevis* *B. macerans* *B. licheniformis* *B. polymyxa* *B. coagulans* *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือ การผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (proteolytic enzymes) เพื่อย่อยสลายสารอาหารชนิดต่างๆในถั่วเหลืองให้มีลักษณะที่ดีหลายประการ ได้แก่ ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดี ช่วยย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่พึงประสงค์ในถั่วเหลือง ช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และ เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและการละลายช่วยให้ร่างกายดูดซึมเอาไปใช้ได้ง่ายขึ้น การเกิดลักษณะที่ดีในถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากถั่วเหลืองมากที่สุด โดยเฉพาะประโยชน์ด้านคุณค่าทางโภชนาการ ทั้งนี้เนื่องจากการหมักจะช่วยทำลายโครงสร้างของสารที่ยับยั้งการทำงานของทริปซิน (trypsin inhibitor) จึงทำให้ร่างกายย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองได้มากขึ้น

ด้วยเหตุนี้เชื้อราที่อยู่ในถั่วเน่าจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากระยะเวลาการผลิตสั้น ผลิตได้ปริมาณมากและราคาถูก โดยเฉพาะการหมักในอาหารแข็งซึ่งเหมาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับเชื้อรานั้นมีข้อดีหลายประการ เช่น ต้นทุนการผลิตต่ำเนื่องจากสามารถใช้วัดถุดิบที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมการเกษตรเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ขั้นตอนการสกัดทำได้ง่าย เก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็วและมีอันตรายต่ำ (Pandey, 2003) ประกอบกับอุตสาหกรรมทั่วไปในประเทศไทยส่วนใหญ่ได้มีการนำเข้าเอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) เพราะฉะนั้นถือเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) เพื่อให้คุ้มค่าและเหมาะสมทางด้านเศรษฐกิจ และเพื่อศึกษาคุณสมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ จากความสำคัญและประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอสดังกล่าว จึงมีความจำเป็นในการศึกษาการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์เพื่อนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทำการศึกษาและคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากถั่วเน่าอาหารพื้นเมืองของภาคเหนือ
2. เพื่อศึกษาถึงสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราที่แยกได้จากถั่วเน่าอาหารพื้นเมืองของภาคเหนือ
3. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์และทดสอบหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากถั่วเน่าอาหารพื้นเมืองของภาคเหนือ ซึ่งได้ทำการเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่างๆในภาคเหนือ ได้แก่ ตาก แม่ฮ่องสอน เชียงราย จากนั้นทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วทำการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุดในเบื้องต้นจากการสังเกตวงใสบนอาหาร skim milk agar ที่กว้างที่สุด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา โดยทำการสกัดเอนไซม์ในลักษณะ crude enzyme แล้วนำ crude enzyme ที่ได้มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และทดสอบหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ตลอดจนทำการเก็บรักษาเชื้อราด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization หรือ Freeze dry) เพื่อเก็บไว้ศึกษาคุณสมบัติทางด้านต่างๆ ต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือ
2. สามารถคัดเลือกสภาวะของอาหารแข็งที่นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรติเอสจากถั่วเน่าอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

3. ทำให้ทราบว่า Inhibitor ชนิดใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส เพื่อบ่งชี้กลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้

4. สามารถเก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

1.5 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อรา

ทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าอาหารพื้นเมืองของภาคเหนือจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ได้แก่ ตาก แม่ฮ่องสอน และเชียงราย ซึ่งถั่วเน่าที่นำมาแยกเชื้อจะใช้ถั่วเน่าที่มีลักษณะทั้งแบบสดและแบบแห้ง (แคบ) แล้วทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้มาทำการคัดแยกเชื้อรา โดยการวางตัวอย่างลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง (Direct plating method) โดยอาหารที่ใช้คือ potato dextrose agar และ acidified potato dextrose agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วันจากนั้นทำการตรวจผล ทำการแยกเชื้อราที่ขึ้นบน potato dextrose agar และ acidified potato dextrose agar โดยการตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราวางลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารชนิดเดียวกัน แล้วทำการแยกเชื้อโดยวิธีการ streak plate จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นทำการสังเกตและศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้งในจานเพาะเลี้ยงและภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเก็บข้อมูลสำหรับใช้ในการระบุสกุลของเชื้อราตามวิธีของ Pitt และ Hocking (1997) และ Samson และ Van Reenen-Hoekstra (1988) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากจานเพาะเลี้ยงที่ได้ทำการระบุสกุลเรียบร้อยแล้วลงหลอดอาหารวุ้นเอียง แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 2 การเตรียมสารละลายสปอร์

นำเชื้อราที่เก็บไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียงมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงชนิดเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลาประมาณ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย Tween-80 0.1% ลงไปนำสารละลายสปอร์ที่ได้มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโดมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้มีปริมาณสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ขั้นที่ 3 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อราไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด

นำสารแขวนลอยสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร Skim milk agar ที่เจาะรูด้วย cock borer เบอร์ 0 เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา โดยดูจากวงใส แล้วทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรด

การหาปริมาณโปรตีนของสับสเทรดชนิดต่างๆ จะใช้วิธี Kjeldahl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 5 การทดสอบเพื่อหาชนิดของสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ในการศึกษาจะใช้สับสเทรต 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted soybean cake) และสับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว การทดลองทั้งหมดจะแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง โดยสับสเทรตแต่ละชนิดจะแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ รำข้าวสาลีแบบหยาบกับแบบละเอียด กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบกับแบบละเอียด และ สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบกับแบบละเอียด นำสับสเทรตทั้ง 6 ชุดการทดลองปริมาณ 10 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความชื้นให้ได้ 55% โดยใช้ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนำมาเพาะเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ จากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดสองอันดับแรกลงไป 1 มิลลิลิตร (จำนวนสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ขั้นที่ 6 การสกัดเอนไซม์

เติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1% ลงในฟลาสก์ที่บ่มไว้เป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ผสมให้เข้ากันโดยเข้าเครื่องเขย่า จากนั้นกรองสารละลาย แล้วนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ ซึ่งจะใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) และนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ขั้นที่ 7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธี sulphanilamide azocasein method

ขั้นที่ 8 การหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำ Skim milk agar ที่ได้เตรียมไว้แล้วมาผสมกับ Inhibitor 7 ชนิด ดังนี้ PMSF, DCI, Pepstatin, 1,10 – phenantroline, E 64, EDTA และ $KMnO_4$ จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อ แล้วหยดสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มวันที่ 3 ลงใน จานอาหาร Skim milk agar ที่เจาะรูด้วย cock borer เบอร์ 5 เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สังเกตการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยดูจากขนาดของวงใส (clearzone) เทียบกับชุดควบคุม แล้วคำนวณค่าที่ได้ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ขั้นที่ 9 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

นำเชื้อราที่เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar เป็นเวลาประมาณ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มาเติม Skim milk 15% ที่ได้เตรียมไว้แล้วลงไป หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นขูดสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ แล้วจึงใช้พาสเจอร์ปิเปตที่อบแห้งแล้ว ดูดสารละลายสปอร์ของเชื้อราใส่ลงในหลอด ampoule 0.1 มิลลิลิตร นำหลอด ampoule ที่ได้มาทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราให้แข็งตัว โดยกลิ้งบนเอทานอล 95% ที่เย็นจัด เป็นเวลาประ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาณ 30 นาที และนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเครื่อง lyophilizer ประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการเชื่อมปิดปากหลอด ampoule และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

จากนโยบายอาหารและโภชนาการแห่งชาติจัดทำโดยคณะกรรมการวางแผนงานและโภชนาการสำนักงานคณะกรรมการวางแผนพัฒนาเศรษฐกิจสังคมแห่งชาติ ได้ชี้ให้เห็นว่าโรคขาดสารอาหารที่รุนแรง และเป็นปัญหามากที่สุดคือโรคขาดโปรตีน และ แคลอรี่ในทารก เด็กก่อนวัยเรียน เด็กวัยเรียน หญิงมีครรภ์และแม่ลูกอ่อน โดยขาดโปรตีนและแคลอรี่ในเด็กก่อนวัยเรียนมีร้อยละ 40-60 แตกต่างตามภูมิภาคต่าง ๆ แต่พบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เด็กวัยเรียน 6-14 ปี ก็มีการขาดแคลนโปรตีนและแคลอรี่เป็นอย่างมากเช่นกัน ประมาณร้อยละ 40-50 ของเด็กวัยนี้ในภูมิภาคต่าง ๆ ทำให้เด็กไม่เจริญเติบโต ขนาดตัวเล็ก เด็กจะมีลักษณะหงอยเรียนหนังสือไม่ดีสุขภาพไม่ดีทำให้การลงทุนทางการศึกษาสูญเปล่า

2.1 ถั่วเหลืองหมัก (มยุรฉัตรและสุจิตรา, 2548)

ถั่วเหลือง (*Glycine Max (L) Merrill*) เป็นพืชที่อยู่ในตระกูลถั่ว Leguminosae, subfamily Papilonoideae อันเป็นที่รู้จักกันดีโดยเฉพาะเป็นพืชดั้งเดิมในภูมิภาคเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ตลอดจนของไทยเรา โดยได้มีการเพาะปลูกและนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารพื้นเมืองนานาชนิด ถั่วเหลืองต้มแล้วหมักโดย *Bacillus* sp. จัดเป็นอาหารหมักชนิด อัลคาไลน์โปรติโอไลติก ใช้สำหรับเติมเพื่อเพิ่มรสชาติในน้ำซุบหรือแกง อาหารหมักกลุ่มนี้ได้แก่ ถั่วเน่าของไทย ไคนีมาของเนปาล หรือแดดดาวาของไนจีเรีย

ลักษณะของถั่วเหลือง เมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.10-0.20 กรัม สีของเปลือกมีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทั่วไปมีสีเหลือง จมูกของถั่วเหลืองเปลือกเหลืองส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล บางพันธุ์จมูกเป็นสีขาว ใบเลี้ยง (cotyledons) 2 ใบ อยู่ภายใต้เปลือกมีสีเหลืองและสีเขียว ถั่วเหลืองที่ปลูกจะมีอายุเก็บเกี่ยวในช่วง 90-100 วัน ซึ่งแล้วแต่พันธุ์และสภาพแวดล้อมที่เพาะปลูก

ถั่วเหลืองมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมอาหารประเภทโปรตีนและแคลอรี่ในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากผลิตภายในประเทศได้เองมีปริมาณโปรตีนและแคลอรี่สูง ราคาต่ำกว่าอาหารโปรตีนประเภทเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินหลายชนิด ดังนั้นจึงเหมาะแก่การแก้ปัญหาทุพโภชนาการ

การหมักถั่วเหลืองเป็นการแปรรูปถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการบริโภคและสามารถเก็บไว้ได้นาน เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี นิยมใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่รู้จักกันดี คือ ซีอิ้ว มิโส เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ นัตโต และที่เป็นถั่วหมักแบบพื้นบ้าน เช่น kinema ในประเทศอินเดีย schidouchi ในประเทศจีน แดดดาวา และ iru ในอัฟริกาตะวันตก ส่วนในประเทศไทย โดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคเหนือตอนบนจะนิยมบริโภคอาหารหมักถั่วเหลืองที่เรียกกันว่าถั่วเน่าแต่ยังไม่ค่อยนิยมแพร่หลายนักเนื่องจากการผลิตแบบพื้นบ้านกระบวนการหมักเกิดจากเชื้อผสม ดังนั้นการศึกษาการหมักของถั่วเน่าตลอดจนการคัดเลือกพันธุ์และการพัฒนากระบวนการหมักจะนำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาเป็นประโยชน์ทางโภชนาการและการเกษตรรวมทั้งเน้นหนักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการหมัก

การหมักและการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง

กรรมวิธีในการหมักนอกจากจะเป็นประเพณีดั้งเดิมสืบทอดกันมานานหลายชั่วอายุคนแล้ว และยังค้นพบว่าจุลินทรีย์ในการหมักถั่วเหลืองจะช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้นอีกทั้งยังช่วยทำลายสารพิษที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองให้สลายไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยกำจัดกลิ่นถั่วซึ่งมักเป็นที่รังเกียจของผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับกลิ่นถั่วเหลืองให้หมดไป ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวกเอสเตอร์เป็นส่วนมาก เช่น ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัวและการหมักของโปรตีน กลีเซอร์ไรด์ และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่มีส่วนในกลิ่นหอมฉุน เช่น 2-เฮปทาโนน ไพราซีน และเบนซาลดีไฮด์ โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อนนำไปหมัก

ถั่วเน่า (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527)

ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของไทยที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารและใช้บริโภคโดยตรง โดยชาวบ้านผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหาร (seasoning reagent) แทนกะปิ ใช้เติมลงในแกงผักต่างๆ หรือใช้ถั่วเน่าบริโภคโดยตรง ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักมีลักษณะคล้ายกับนัตโต (natto) ซึ่งเป็นถั่วเน่าของชาวญี่ปุ่นที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงประเภทหนึ่ง รวมทั้งจุลินทรีย์ที่พบก็เป็นชนิดเดียวกัน โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก กล่าวคือ ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (proteolytic enzymes) เพื่อย่อยสลายสารอาหารชนิดต่าง ๆ ในถั่วเหลืองให้มีลักษณะที่ดีหลายประการ ได้แก่ 1) เกิดกลิ่นรสที่ดี 2) ย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่พึงประสงค์ 3) ช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น 4) เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และ 5) เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและการละลายช่วยให้ร่างกายดูดซึมเอาไปใช้ได้ง่ายขึ้น

การเกิดลักษณะที่ดีในถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากถั่วเหลืองมากที่สุดโดยเฉพาะประโยชน์ด้านคุณค่าทางโภชนาการทั้งนี้เนื่องจากการหมักจะช่วยทำลายโครงสร้างของสารที่ยับยั้งการทำงานของทริปซิน (trypsin inhibitor) จึงทำให้ร่างกายย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักถั่วเน่าตามวิธีพื้นบ้านมีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. ล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก

2. ต้มถั่วเหลืองประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขณะต้มต้องคอยเติมน้ำให้ระดับน้ำท่วมเมล็ดถั่วเสมอ โดยให้มีอัตราส่วน ถั่ว 1 ลิตรต่อน้ำ 2 ลิตร

3. หลังจากต้มแล้วผึ่งให้แห้ง

4. ทำการหมักโดยการเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตองแล้วนำถั่วเหลืองวางบนใบตอง ปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นและป้องกันการแปดเปื้อนจากเชื้อรา

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วัน จะได้ถั่วเน่า

นำถั่วเน่าไปบดแล้วเติมเกลือ หรือพริกแดง ขิง แล้วห่อด้วยใบตอง นำไปนึ่งหรือย่างก่อนรับประทาน วิธีนี้จะสามารถเก็บรักษาถั่วเน่าได้นาน 2 วันหรือถ้านำถั่วเน่ามาแผ่เป็นแผ่นกลม โดยนำใบตองมาวางอยู่บนฝ่ามือ นำถั่วเน่าที่บดแล้วมาเกลี่ยบนใบตอง นำใบตองอีกใบหนึ่งมาวางทับและกดให้แบนราบเหมือนมะม่วงกวน นำไปตากแดดให้แห้ง จะเก็บไว้ได้นาน ชาวเหนือเรียกถั่วเน่าที่ทำแบบนี้ว่า ถั่วเน่าแคบ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของถั่วเน่าแบบสด และแบบแคบ ตามลำดับ

สำหรับจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ใช้ในการหมักถั่วเน่านั้น ดุษณี (2546) ได้รายงานว่ามีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในถั่วเน่าเป็นจำนวนมาก ได้แก่ *B. subtilis, B. laterosporus, B. punilus, B. brevis, B. macerans, B. licheniformis, B. polymyxa, B. coagulans, Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นต้น จากข้อความดังกล่าวจะเห็นว่ามีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการหมักถั่วเน่า แต่เนื่องจากโครงงานที่จัดทำครั้งนี้สนใจเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราจึงได้มีการจัดจำแนกประเภทของเชื้อราต่างๆไว้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เกณฑ์ในการจัดจำแนกเชื้อรา

ราโดยทั่วไปสามารถแยกได้จากอาหาร ผลิตภัณฑ์นม ฯลฯ และสามารถจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะพื้นฐานทั่วไปทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างสปอร์ แต่วิธีนี้ค่อนข้างทำได้ยาก จึงได้มีการจัดจำแนกโดย Pitt และ Hocking (1997) และ Samson และ Van Reenen-Hoekstra (1988) โดยอาศัยหลักในการจำแนกจากรูปถ่ายที่ได้ทำการขยายภาพของเชื้อและการบรรยายลักษณะรูปร่างแบบกว้าง ๆ ของเชื้อราขนาดเล็กที่พบในอาหาร

1. Coenocytic Mycelium (ไม่มีผนังกั้น หรือ พบสิ่งที่ปรากฏเฉพาะ ตัวอย่างเช่น chlamydospore).....2

เส้นใยมีผนังกั้นจำนวนมาก.....4

2. สปอร์แรงจิโอฟอร์แต่ละอันจะยึดกับสปอร์แรงเจียมทรงกระบอกจำนวนมาก และ สปอร์แรงเจียมแต่ละอันจะประกอบด้วยสปอร์จำนวนมากที่ต่อกันเป็นลูกโซ่.....1 *Syncephalastrum*

สปอร์แรงจิโอฟอร์แต่ละอันตรงส่วนปลายสุดจะยึดกับสปอร์แรงเจียมกลมขนาดใหญ่เพียงอันเดียว ซึ่งในสปอร์แรงเจียมแต่ละอันจะประกอบด้วยสปอร์จำนวนมาก.....3

3. สโตลอนมีลักษณะแพร่กระจาย โดยสปอร์แรงจิโอฟอร์จะพัฒนามาจากส่วนที่เป็นปมหนาฟูซึ่งเป็นส่วนที่มีการพัฒนาไปเป็นไรซอยด์.....2 *Rhizopus*

สปอร์แรงจิโอฟอร์ยาวมีกิ่งแขนงแตกเป็นกลุ่มแบบไดโคโตมัสได้เป็นสปอร์แรงจิโอฟอร์สั้นๆ ซึ่งสปอร์แรงจิโอฟอร์สายสั้นๆนี้ จะยึดกับสปอร์แรงจิโอลขนาดเล็ก (ประกอบด้วยสปอร์จำนวนน้อย) โดยปกติมักยึดกับสปอร์แรงเจียมขนาดใหญ่ซึ่งประกอบไปด้วยสปอร์จำนวนมาก .....3 *Thamnidium*

สปอร์แรงจิโอฟอร์แต่ละอันตรงส่วนปลายสุดจะยึดกับสปอร์แรงเจียมกลมขนาดใหญ่เพียงอันเดียว ซึ่งในสปอร์แรงเจียมแต่ละอันจะประกอบด้วยสปอร์จำนวนมาก และไม่มีสโตลอนเกิดขึ้น.....4 *Mucor*

4. Vegetative hyphae ชัดเจนและใส/ไม่มีสีหรือมีสีสว่างสดใส.....5

Vegetative hyphae สีเข้ม ไม่ชัดเจนและใส.....12

5. การสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศสร้างสปอร์ที่มีเซลล์เดียว.....6

การสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศสร้างสปอร์ที่มีสองเซลล์หรือมากกว่าสองเซลล์.....11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สปอร์อยู่เดี่ยวๆใกล้กับบริเวณปลายของเส้นใย.....5 Sporotrichum

สปอร์สร้างต่อกันเป็นกลุ่มหรือสายโซ่.....7

7. โคนิเดียมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายองุ่น (Sclerotia, จะไม่มีโคนิเดียเกิดขึ้นเมื่ออยู่บนอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง, โคโลนีสีขาวปื้นปุยซึ่งจะมี sclerotia สีดำอยู่ด้วยหรืออาจมี sclerotia สีดำอยู่ข้างใต้พื้นผิวของอาหาร บนอาหารที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ, โคโลนีจะมีสีเขียวปนเทาเช่นเดียวกับโคนิเดีย.....6 *Botrytis*

สปอร์มีลักษณะเป็นโซ่ที่มีกิ่งแขนง.....7 *Monilia*

สปอร์มีลักษณะเป็นโซ่ที่ไม่มีกิ่งแขนง.....8

8. โคนิดิโอฟอร์ในช่วงแรกจะไม่มีผนังกั้น แต่เมื่อมีผนังกั้นจะสร้างarthrospor...8 *Wallemia*

โคนิดิโอฟอร์ที่ไม่มีผนังกั้นเกิดขึ้นจาก foot cell ที่มีผนังหนา โคนิเดียจะอยู่บน phialide ซึ่งเกิดขึ้นจากส่วนที่โป่งออกบริเวณปลายสุดของโคนิดิโอฟอร์.....9 *Aspergillus*

โคนิดิโอฟอร์มีผนังกั้น ไม่มี foot cell.....9

โคนิดิโอฟอร์มีผนังกั้น มี foot cell.....10 *Stachybotrys*

9. สปอร์แต่ละอันมีลักษณะเว้า และมี basal ring ที่หนา.....11 Scopulariopsis

สปอร์สร้างบน phialide และไม่มี basal ring ที่หนา phialide มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนคล้ายแปรง.....10

สปอร์สร้างบน phialide ที่โป่งออก 3-7 อันบนยอดปลายสุดของโคนิดิโอฟอร์ สปอร์มีสีเข้ม โดยปกติจะถูกห่อหุ้มด้วยเมือก.....10 *Stachybotrys*

10. กลุ่มของแอสคัสที่มี 8 สปอร์ ไม่มีผนังชั้นนอกเหลืออยู่ (peridium) .....12 *Byssochlamys*

แอสโคสปอร์ ถ้าอยู่ในรูปนี้, จะอยู่ภายใน perithecia.....13 *Penicillium*

11. โคนิเดียมี 2 เซลล์ รูปร่างเหมือนลูกแพร์.....14 *Trichothecium*

โคนิเดียมีหลายเซลล์ รูปร่างเหมือนแกนเครื่องปั่นฝ้ายหรือเคียว.....15 *Fusarium*

12. Blastospore อยู่บนส่วนต่างๆของเส้นใย โคโลนีเริ่มแรกจะมีลักษณะเป็นเมือก ต่อมามีสีเขียวเข้มปนดำและมีลักษณะเหมือนหนัง.....16 *Aureobasidium*

สปอร์มี 1 หรือ 2 เซลล์.....17 *Cladosporium*

สปอร์มีมากกว่า 2 เซลล์.....13

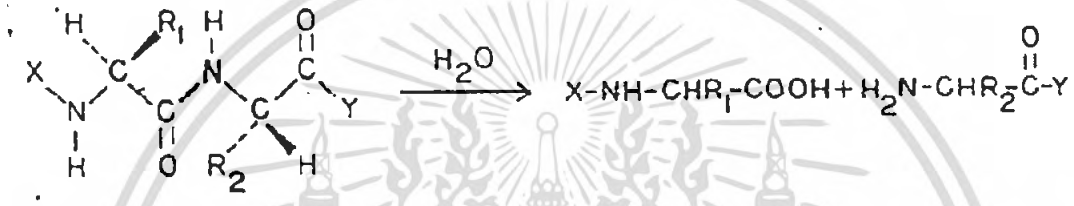
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. สปอร์มีผนังกั้นตามขวาง โดยปกติสปอร์จะมีลักษณะโค้ง เซลล์ตรงกลางจะมีสีเข้มโดยบริเวณที่มีสีเข้มอาจมี 1 เซลล์หรือมากกว่า 1 เซลล์.....18 *Curvularia*

สปอร์มีผนังกั้นตามขวางและผนังกั้นตามยาว สปอร์โดยทั่วไปมีรูปร่างแบบลูกแพร์ .....19 *Alternaria*

2.3 เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์โปรตีนและโพลีเพปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้นๆ ดังแสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 2 (ปราณี, 2547)



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรติเอส (ปราณี, 2547)

โปรติเอสนับเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมยา ฟอกหนัง เส้นใยทอผ้า กระดาษ และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก (Detergents) มีปริมาณ การใช้และคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (Helle, 1991) (ตารางที่ 1, 2)

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ มีลักษณะการใช้งานและแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ต่างกัน ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 3 และ 4 จากความต้องการของเอนไซม์ที่เริ่มมีมากขึ้นเรื่อยๆ จึงได้มีการพัฒนาคุณสมบัติและความสามารถของเอนไซม์ที่ได้จากจุลชีพเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง ก็มีการนำเอาโปรติเอสที่ได้จากเชื้อรามาใช้แทนเรนเนท เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากโปรติเอสที่ได้จากจุลชีพเป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลชีพชนิดต่างๆ

ชนิดของเอนไซม์	มูลค่า (ล้านดอลลาร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
1. Bacterial protease	145	60
2. Animal rennet	50	21
3. Microbial rennet	12	5
4. Papain	15	6
5. Pancreatin	12	5
6. Bromelain	5	2
7. Fungal protease	3	1
รวม	242	100

ที่มา : Hepner & Male, 1986

ตารางที่ 2 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

อุตสาหกรรม	มูลค่า (ล้านดอลลาร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
1. Detergents	140	89.2
2. Microbial rennets	12	7.6
3. Baking protease	3	1.9
4. Leather	1	0.6
5. Miscellaneous	1	0.7
รวม	157	100

ที่มา : Hepner & Male, 1986

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงการใช้ประโยชน์ของโปรติเอส

ชนิดของอุตสาหกรรม	ตัวอย่างการนำไปใช้
การซักล้าง/ทำความสะอาด	สารเติมแต่งในการผลิตสารซักฟอก
การฟอกหนัง	การทำให้ขนน้อยลง
การย่อยสลาย	ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysates) จากถั่วเหลือง เนื้อ และปลา ซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย การทำให้เนื้อนุ่ม
การสังเคราะห์สารอินทรีย์	ใช้สังเคราะห์ Aspartame
การผลิตเครื่องดื่ม	การทำให้ไวน์และเบียร์มีความใสเมื่อเย็น
การทำโรงสี	ใช้สังเคราะห์ gluten
ด้านเภสัชกรรม	การช่วยย่อยอาหาร การบำบัดรักษาแผลไฟไหม้แผลเป็นหนอง
การถ่ายรูป	การเตรียมสารเงิน (Ag) จากอิมัลชั่นของการล้างฟิล์ม
การผลิตผลิตภัณฑ์นม	ใช้เพื่อทำความสะอาดระบบกรองในกระบวนการผลิตนม

ที่มา : Smith and Aidoo, 1988

ในอดีตมนุษย์ทราบเพียงว่าสามารถเตรียมโปรติเอสขึ้นมาได้จากแหล่งที่เป็นพืชและสัตว์ เช่น ในสับปะรดมีเอนไซม์โบรมีเลน ยางมะละกอมีเอนไซม์ปาเปน กระเพาะลูกวัวมีเอนไซม์เรนนิน ซึ่งจะเตรียมได้ในปริมาณน้อย กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ค่อนข้างยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้แรงงานจำนวนมาก ต่อมาหลังจากมีความพยายามค้นหาแหล่งผลิตเอนไซม์ทดแทนพืชและสัตว์ จึงพบว่าจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (Fermentation) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงและการควบคุมทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อย และสะดวกกว่า อีกทั้งให้ผลผลิตสูงและสม่ำเสมอ เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์โปรติเอสได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	ขบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Baking and Milling	Bread baking	Fungal
Brewing	Chillproofing	Papain, Bromelain, Pepsin, Fungal, Bacteria
Cereals	Condiments	Papain, Bromelain, Pepsin, Fungal, Bacteria
Dairy	Milk prevention of oxidized flavor	Pancreatin
	Milk protein	Papain, Bromelain
	Hydrolysate	Pancreatin, Bacteria, Fungal
	Evaporate milk, stabilization	Pancreatin, Pepsin, Bromelain, Fungal
Animal feeds	Pig starter ration	Pepsin, Pancreatin, Bacterial, Fungal
	Poultry ration, Cattle ration	Bacterial, Fungal
Meat , fish	Meat tenderizing	Papain, Bromelain,
	Tenderizing casings	Fungal, Bacteria
	Condensed fish soluble	
Pharmaceutical and clinical	Digestive aids	Papain, Bromelain, Pancreatin, Fungal, Bacteria
	Wound debridement, Treatment of bruises, inflammation, etc.	Bacterial, Animal, Plant
Leather	Bating	Bacterial, Pancreatin, Fungal
	Unhairing	Bacterial, Fungal, Plant
Laundry	Spot removal	Bacterial, Pancreatin, Fungal
	Cold – soluble laundry starch	
Photographic	Recovery of silver from spent film	Bacterial
Textile	Desizing fibrics	Bacterial, Fungal, Pancreatin

ที่มา : Miller & Litsky (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แหล่งของโปรติเอส (Rao, 1998)

2.3.1.1 โปรติเอสที่ผลิตจากพืช (Plant Proteases)

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานานและพื้นที่มาก อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดจากพืชที่ผลิตและใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นต้นว่า ปาเปน (Papain) จากยางมะละกอ ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ระหว่าง 5-9 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส โบรมิเลน (Bromelain) จากสับปะรด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับซีสเทอีนโปรติเอส (cystein protease) ทำงานได้ดีในช่วง pH ระหว่าง 5-9 สำหรับเคราติเนส (Keratinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายผมและขนแกะนำไปใช้ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย ล่าสุด Miroslaw และ Barlsoz ได้ทำการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากรากของพืชในระหว่างการงอกโดยพืชที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ ได้แก่ *Allium porrum, Ruta graveolens, Geranium pusillum* และ *Allium cepa* ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 19.1, 3.31, 2.95 และ 2.53 หน่วยต่อพื้นที่ผิวของราก (ตารางเมตร)

2.3.1.2 โปรติเอสที่ผลิตจากสัตว์ (Animal Proteases)

ส่วนใหญ่มาจากตับอ่อนของสัตว์ ตัวอย่างของโปรติเอสจากสัตว์ เช่น ทริปซิน (Trypsin) จากลำไส้ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยา ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) จากตับ ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคจึงเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง เพปซิน (Pepsin) จากกระเพาะของสัตว์ทำงานได้ดีในช่วง pH ระหว่าง 1 และ 2 และเรนนิน (Rennin) จากกระเพาะลูกวัว ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนม ทำให้ผลิตภัณฑ์นมมีความคงตัว เพิ่มกลิ่นและรสชาติให้ดีขึ้น

2.3.1.3 โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Microbial Proteases)

จากการที่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพืชและสัตว์มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เป็นผลทำให้การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญ ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตเร็ว ใช้เวลาในการผลิตสั้น ใช้พื้นที่น้อย ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์และสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่

ก. แบคทีเรีย : โปรติเอสที่ผลิตได้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็น neutral และ alkaline proteases ตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสได้ เช่น *Bacillus* neutral proteases เป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานในช่วง pH แคบ คือ pH 5-8 และไม่ทนต่อความร้อน จึงมักนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ในขณะที่โปรติเอสจากแบคทีเรีย alkaline proteases เป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานในช่วง pH ที่สูงกว่า คือ pH 10 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงนำมาใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง

ข. รา : โดยทั่วไปราผลิตเอนไซม์ได้มากมายหลายชนิด เช่น *Aspergillus oryzae* ผลิต acid, neutral และ alkaline proteases โปรติเอสที่ผลิตได้ทำงานในช่วง pH ที่กว้างคือ pH 4-11 อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยาและทนความร้อนได้ต่ำกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย การผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์จากราผลิตได้จากกระบวนการหมักบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว Fungal acid proteases มีการทำงานในช่วง pH ระหว่าง 4-4.5 และมีความคงตัวระหว่าง pH 2.5-6 จึงนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง ในขณะที่ Fungal neutral proteases เป็นโปรติเอสประเภท metalloproteases มีการทำงานที่เหมาะสมที่ pH 7 และช่วยลดความขมของโปรตีนในอาหาร จึงนำมาใช้ในการปรับปรุงโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร

ค. ไวรัส : โปรติเอสที่ผลิตจากไวรัสมีความสำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีนของไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ เช่น โรคเอดส์ โรคไวรัสตับอักเสบ (Robert และคณะ, 2007) โรคมือเท้าปาก (Agnés และคณะ, 2007) และมะเร็ง โดยโปรติเอสที่ผลิตได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ serine, aspartic และ cysteine peptidase (Rawlings และ Barrett, 1993)

2.3.2 ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

ในสมัยแรก ๆ การแยกกลุ่มของโปรติเอสแยกตามขนาดโมเลกุล ประจุ หรือความจำเพาะต่อสับสเทรต ต่อมาจึงมีการจัดจำแนกที่เป็นระบบยิ่งขึ้นโดยอาศัยการเปรียบเทียบบริเวณเร่งกลไกการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีกลุ่มของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งต่างกัน ทำให้เกิดโครงรูปที่จำเพาะของบริเวณเร่งนั้นๆ ซึ่งเป็นผลให้โปรติเอสมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน

ถ้าแบ่งเอนไซม์โปรติเอสตามค่าพีเอชสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แอซิดโปรติเอส (acid protease) นิวทัลโปรติเอส (neutral protease) อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease)

ถ้าแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยา สามารถแบ่งเอนไซม์โปรติเอสได้ 4 กลุ่มใหญ่ (Hartley, 1960) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) หรืออีกชื่อคือ ซีรีนโปรติเอส (serine protease) กลุ่มที่ 2 เมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) หรือ นิวทัลโปรติเอส (neutral protease) กลุ่มที่ 3 แอซิดโปรติเอส (acid protease) และกลุ่มที่ 4 ไทออลโปรติเอส (thiol protease) นอกจากนี้ยังอาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ อีกตามสมบัติของบริเวณเร่ง (active center) ของเอนไซม์

1. อัลคาไลน์โปรติเอส (E.C. 3.4.21.14) จะมีซีรีนเรสซิดิวส์อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สามารถยับยั้งการทำงานด้วยการเติมสาร di-isopropyl fluorophosphates (DFP) และ phenylmethane sulfonylfluoride (PMSF) แต่จะทนต่อภาวะที่มี EDTA ในปี ค.ศ. 1988 Sloma และคณะ พบว่า PMSF เข้มข้นเพียง 1 mM สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสชนิดนี้ได้ แคลเซียมอิออนช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น โปรติเอสชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 – 30,000 ดาลตัน มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้างกว้างคือ อยู่ระหว่าง 7.0 – 11.0 ทำงานได้ดีที่สุด ที่ pH 10.0 -11.0 แต่ยังสามารถทำงานได้แม้ว่าพีเอชจะต่ำลงถึง 6.0 โปรติเอสชนิดนี้มีความเสถียรสูงสุดในช่วงพีเอช 5.0 – 9.0 พบได้ทั่วไปทั้งในเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เป็นโปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83745

ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ มักจะพบอัลคาไลน์โปรดิเอสในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัสเป็นส่วนใหญ่ บาซิลลัสหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และ alkalophilic *Bacillus* สามารถจะสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรดิเอสที่เรียกว่า ซับทิลิซิน (subtilisin) ได้ปริมาณสูงกว่าเชื้อรา โดยสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แล้วจะถูกปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรดิเอสพร้อม ๆ กับนิวทัลโปรติเอส หรือโดยสังเคราะห์นิวทัลโปรติเอสก่อนแล้วจึงสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรติเอสภายหลัง อัลคาไลน์โปรดิเอสเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด

อัลคาไลน์โปรติเอสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยา และจลนศาสตร์ได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Subtilisin Carlsberg ลักษณะเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวมีกรดอะมิโน 274 ตัว แต่ไม่พบพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซีสเทอีน หรือ ซิสทีน โครงสร้างเอนไซม์เป็นรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ประกอบด้วย กรดอะมิโนซีรีน 221 ฮีสทิดีน 64 และแอสปาร์เตท 32 มีความจำเพาะต่อสับสเทรตกว้าง ไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์เป็นส่วนใหญ่และเอสเทอร์บางส่วน ไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้นในการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน รวมทั้งไม่ต้องมีแคลเซียมไอออนเพื่อช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรเหมือนกับอัลคาไลน์โปรติเอสชนิดอื่นๆ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่จะมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมแก่การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน คือ พีเอช 8.0-9.0 และแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อมีพีเอชต่ำกว่า 5 หรือ สูงกว่า 11 เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55–60 องศาเซลเซียส แต่จะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีสารไฮเปอร์คลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Subtilisin BPN หรือ Subtilisin NOVO ลักษณะเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 275 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ subtilisin Carlsberg แล้วมีกรดอะมิโนส่วนใหญ่เหมือนกัน แตกต่างกันเพียง 58 ตัวเท่านั้น โดยไม่มีกรดอะมิโนซีสเทอีน บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนซีรีน 221 ฮีสทิดีน 54 และแอสปาร์เตท 32 แคลเซียมไอออนจะช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรือพีเอชที่ต่ำหรือสูงมาก มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก subtilisin Carlsberg

อัลคาไลน์โปรติเอสที่นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว ยังมีอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้จาก Alkalophilic bacilli ได้แก่ *B. subtilis* และ *B. licheniformis* เชื้อเจริญได้ดีที่ pH สูง เอนไซม์ที่ได้นี้มีแอคติวิตีและความทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้สูงถึงพีเอช 13 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยว ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20,000 ถึง 30,000 ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์กว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เมทัลโลโปรติเอสหรือนิวทัลโปรติเอส (E.C. 3.4.24) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะสังกะสี (Zinc) อยู่ภายในโครงสร้าง สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมสารจำพวก chelating agent เช่น ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ในปี ค.ศ. 1988 Sloma และคณะ พบว่า EDTA เข้มข้นเพียง 10 mM สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสชนิดนี้ได้ น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสชนิดนี้เป็น 35,000 – 45,000 ดาลตัน มีความสามารถสูงสุดในการไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ของโปรตีนที่พีเอชประมาณ 7.0 แต่จะเสถียรในช่วงพีเอช 5.0 – 10.0 และจะเสถียรมากขึ้นเมื่อมีแคลเซียมอิออน เนื่องจากมีความเสถียรน้อยกว่าอัลคาไลน์โปรติเอสจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่ก็พบว่ามีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ การทำขนมอบ การฟอกหนังและอุตสาหกรรมอาหาร พบมากในทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น รา แอสเปอร์จิลลัส แบคทีเรียบาซิลลัส และสเตรปโตมัยซิส ซึ่งนิยมนำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ตัวอย่างที่สำคัญเช่น เทอร์โมทริปซิน (thermotrypsin)

3. แอซิดโปรติเอส (E.C. 3.4.23) จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มี side chain เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน ทริปโตเฟน เฟนิลอะลานีน เป็นต้น ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP สามารถสังเคราะห์ได้จากเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ รา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. และ *Edothai* spp. เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 3.0 – 4.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 – 40,000 ดาลตัน มีค่า isoelectric point ต่ำ และโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เพปซิน, เรนนินในสัตว์ แบ่งออกเป็น 2 พวก โดยสมบัติทางกายภาพ คือ pepsin–like acid protease และ rennin–like acid protease เอนไซม์ในกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าว และธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว รวมไปถึงอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

4. ไทออลโปรติเอส (E.C. 3.4.22) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก sulfydryl reagent เช่น p-chloromercuribenzoate สารพวก DFP มีผลต่อการทำงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์บางตัว ได้แก่ HCN หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนร่วมอยู่ด้วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 – 50,000

ถ้าแบ่งตามบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาสามารถแบ่งเอนไซม์โปรติเอสได้ 2 กลุ่มใหญ่ (Rao, 1998 ; Fogarty, 1994) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เอ็กโซเพปทิเดส และกลุ่มที่ 2 เอนโดเพปทิเดส

1. เอ็กโซเพปทิเดส

มีหน้าที่ในการสลายพันธะเพปไทด์จากปลายของเส้นเพปไทด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

ก. อะมิโนเพปทิเดส เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเพปไทด์จากปลายด้าน N-terminal ($-NH_3$) ของสายเพปไทด์และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ ไดเพปไทด์ หรือ ไตรเพปไทด์ ดังแสดงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 โดยทั่วไปอะมิโนเพปทิเดสเป็นเอนไซม์จำพวก intracellular enzymes พบได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *A. oryzae, Escherichia coli* และ *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

ข. คาร์บอกซีเพปทิเดส เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเพปไทด์จากปลายด้าน C-terminal (-COOH) ของสายเพปไทด์และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือ ไดเพปไทด์ ดังแสดงในตารางที่ 5 คาร์บอกซีเพปทิเดส แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ขึ้นอยู่กับหมู่อะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) ได้แก่ ซีรีนคาร์บอกซีเพปทิเดส เมทัลโลคาร์บอกซีเพปทิเดส และ ซีสเทอีนคาร์บอกซีเพปทิเดส

2. เอนโดเพปทิเดส

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระ (randomly) ภายในของสายโพลีเพปไทด์หรือโปรตีนทั้งนี้ต้องให้จำเพาะตรงต่อ R_1 และ R_2 ด้วย จึงจะตัดพันธะเพปไทด์ได้ ถ้า R_1 และ R_2 ไม่สอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์นั้น การตัดพันธะเพปไทด์ก็ไม่เกิดขึ้น และจะให้กิจกรรมสูงสุด ถ้า X และ Y เป็นหมู่อนุพันธ์ ไม่ใช่ H^+ หรือ OH^- กล่าวคือ X อาจเป็น acyl group (acetyl, benzoyl, benzyloxycarbonyl เป็นต้น) และ Y เป็น amide หรือ ester group หรือ amino acid residues (ปราณี, 2547) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนี้

ก. ซีรีนโปรติเอส หรือ อัลคาไลน์โปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ของกรดอะมิโนซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) ถูกยับยั้งด้วยสาร diisopropylfluorophosphate (DFG), Phenylmethyl-sulfonyfluoride (PMSF), 3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCI), tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 7-11 มวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 18-35 กิโลดาลตัน ซีรีนโปรติเอส แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ Serine alkaline protease และ Subtilisins Serine alkaline protease เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ยีสต์และรา ถูกยับยั้งโดย DFP (diisopropylfluoro - phosphate) หรือ potato protease inhibitor มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 10 และมีค่า isoelectric point ประมาณ 9 มวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 15-30 กิโลดาลตัน ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิต serine alkaline protease ได้แก่ *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Flavobacterium*, *S. cerevisiae*, *Conidiobolus*, *Aspergillus*, *Neurospora spp.* (Boguslawaki และคณะ , 1983; Lindberg, 1981), *Phycomyces blakesleeanus*, *Blastocladiella emersonii*, *Blakeslea trispora*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium* sp. และ *Trititrachium album* ทั้งนี้ความสามารถของจุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสนั้นโดยมากจะเป็นกลุ่มที่เจริญอยู่บนอาหารที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง สำหรับ Subtilisins เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* มีมวลโมเลกุล 27.5 กิโลดาลตัน อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 และ 10 ตามลำดับ เอนไซม์ subtilisins แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ Subtilisin Carlsberg ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง และ Subtilisin Novo หรือ Bacterial protease Nagase (BPN') ผลิตโดย *Bacillus amyloliquefaciens* เอนไซม์ชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. แอสปาร์ติกโปรติเอส หรือ แอซิดโปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน aspartic acid หรือ glutamic acid อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ถูกยับยั้งการทำงานโดย pepstatain และ diazoketone เช่น diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) และ 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane (EPNP) ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ในช่วง 3-4 มีมวลโมเลกุล อยู่ระหว่าง 30-45 กิโลดาลตัน เกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น aromatic amino acid เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนนินและเพปซิน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ ราสกุล *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Endothia* และ *Mucor* แต่ต่อมาได้มีการค้นพบว่าเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ไม่ทุกตัวที่ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งจำพวก pepstatin หรือ *Streptomyces* pepsin inhibitor (S-PI) เช่น เอนไซม์โปรติเอสเอ ที่ได้จาก *Aspergillus niger* var. *macrosporus* (North., 1982 ; Chang et al., 1976) หรือเอนไซม์โปรติเอส เอ1 เอ2 และ บี ที่ได้จาก *Scytalidium lignicolum* (Michael., 1982 ; Oda และคณะ, 1974) แต่โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ในกลุ่มแอซิดโปรติเอสจะถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งจำพวก N-bromosuccinimide, I_2 และ $KMnO_4$ ซึ่งเป็นไปได้ว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับไทโรซีน ในส่วนของแอซิดโปรติเอสที่ได้จาก *Penicillium caseicolum, P. janthinellium* และ *P. roqueforti* นั้นจะถูกยับยั้งโดย butane-2,3-dione (North., 1982 ; Gripon และคณะ, 1981) โดยส่วนใหญ่แล้วแอซิดโปรติเอสนั้นจะมีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30– 45 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่และบางชนิดมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มี isoelectric points ต่ำกว่าที่พีเอช 5.1 โดยส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในช่วงของพีเอช 3.4 – 4.6 ยกเว้น *S. dimorphosporum* ที่มี isoelectric points ที่พีเอช 7.4 (Michael., 1982 ; Tapia และคณะ, 1981) ซึ่งคุณสมบัติที่น่าสนใจของเอนไซม์ในกลุ่มแอซิดโปรติเอส ได้แก่ การที่เอนไซม์แอซิดโปรติเอสจาก *Penicillium* สามารถกระตุ้นทริปซิโนเจนของวัวให้ทำงานได้ (North., 1982 ; Kunitz และคณะ, 1938) และเอนไซม์แอซิดโปรติเอสจาก *A. oryzae* และ *A. saitoi* ที่สามารถกระตุ้นทริปซิโนเจน (North., 1982 ; Robinson และคณะ, 1973) และไคโมทริปซิโนเจน (North., 1982 ; Shama และคณะ, 1979) ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ซึ่งชนิดของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์แอซิดโปรติเอสได้นั้นส่วนใหญ่แล้วมักจะเป็นราที่เจริญบนอาหารที่มีความเป็นกรด ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ไม่ค่อยเสถียรที่พีเอชมากกว่า 7.0 จึงไม่พบแอซิดโปรติเอสจากราที่เจริญบนอาหารที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 7.0

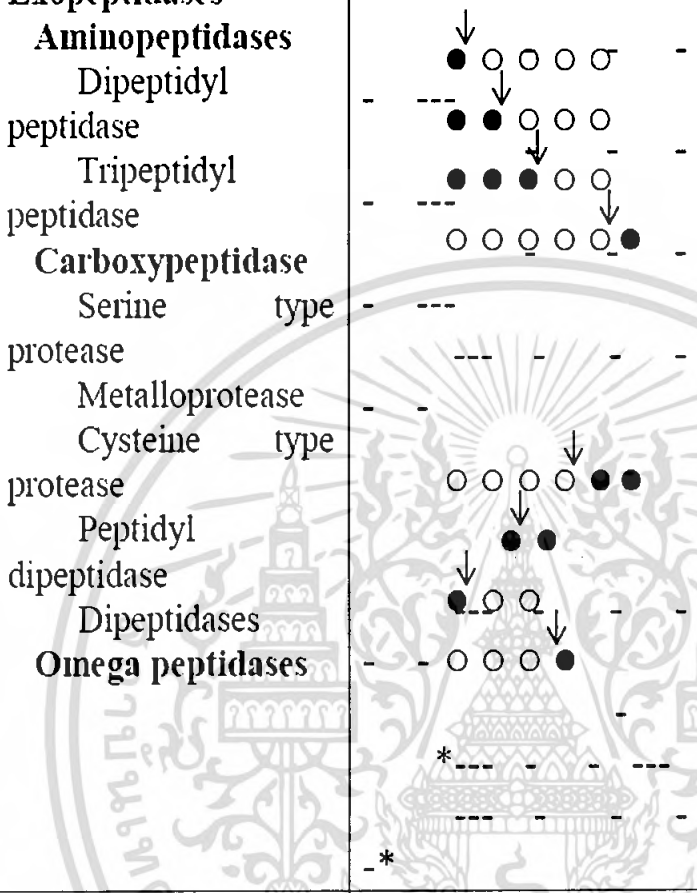
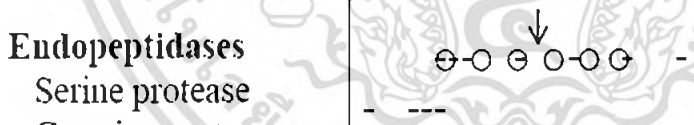
ค. ซีสเทอีนโปรติเอส หรือ ไทออลโปรติเอส หรือ ซัลไฟดิลโปรติเอส เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลางคือ 5-8 ถูกเร่งปฏิกิริยาเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือ cysteine และถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วย sulfhydryl เช่น *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) หรือ iodoacetate มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30-50 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากพืชชั้นสูง เช่น ปาเปนจากยางมะละกอและโบรมิเลนจากสับปะรด จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Clostridium*, *Histolyticum*, *Streptococcus spp.*, *Trichosporon* sp., *Oidiodendron kalrai* และ *Microsporum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ง. เมทัลโลโปรติเอส</u>เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะ (divalent metal ion) อยู่ในโครงสร้างซึ่งมักเป็นพวกสังกะสี ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีนส่วนใหญ่มักเป็น exopeptidase สารที่ยับยั้งปฏิกิริยา ได้แก่ สารพวก chealating agent เช่น EDTA มีความเสถียรในช่วงพีเอช 5-9 มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 19 – 20 กิโลดาลตัน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Clostridium* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ประเภทนี้พบน้อยในรา เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีโลหะอยู่ในโครงสร้างได้แก่ *P. roqueforti, P. caseicolum, A. sojae* และ *A. oryzae* (North., 1982 ; Gripon., 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ตำแหน่งของ substrate ที่โปรติเอสชนิดต่าง ๆ เข้าทำปฏิกิริยา (Rao, 1998)

Protease	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา[a]	EC no.
Exopeptidases		
Aminopeptidases		3.4.11
Dipeptidyl peptidase		3.4.14
Tripeptidyl peptidase		3.4.14
Carboxypeptidase		3.4.16-3.4.18
Serine type protease		3.4.16
Metalloprotease		3.4.17
Cysteine type protease		3.4.18
Peptidyl dipeptidase		3.4.15
Dipeptidases		3.4.13
Omega peptidases		3.4.19
		3.4.19
Endopeptidases		3.4.21-3.4.34
Serine protease		3.4.21
Cysteine protease		3.4.22
Aspartic protease		3.4.23
Metalloprotease		3.4.24
Endopeptidases of unknown catalytic mechanism		3.4.99

[a]วงกลมเปิดแสดงถึงหมู่อะมิโนที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์ วงกลมปิดแสดงถึงกรดอะมิโนที่อยู่ปลายสาย และลูกศรแสดงถึงตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการที่นำโปรดิเอสไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆมากมาย นั้น ทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์มากขึ้นเรื่อยๆปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าของเอนไซม์หลายชนิด เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ซึ่งสามารถรวบรวมได้ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงมูลค่าการนำเข้าเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991-1995

ปี ค.ศ.	มูลค่าการนำเข้า	
	ปริมาณ (ล้านตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
1991	1.27	136
1992	1.28	204
1993	1.60	250
1994	2.18	275
1995*	1.63	251

ที่มา : กรมศุลกากร ประเทศไทย

ปี 1995* : เก็บข้อมูลตั้งแต่ เดือนมกราคม – สิงหาคม

ปัจจุบันจะเห็นได้ว่าปริมาณการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ทุกปี แสดงให้เห็นว่า ความต้องการในการใช้เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการสูญเสียเงินออกนอกประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปีจากการนำเข้าเอนไซม์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าและสนองต่อความต้องการใช้เอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต เพื่อให้ได้เอนไซม์ปริมาณสูงขึ้นเพียงพอต่อความต้องการ โดยใช้กระบวนการหมักในอุตสาหกรรม (Industrial Fermentation Process) ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในปริมาณมาก วิธีการนี้มีปัญหาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าที่จะผลิตจากพืชหรือสัตว์ เป็นการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นและสามารถผลิตได้ครั้งละมาก ๆ ในเวลาอันสั้น อีกทั้งได้ผลผลิตที่สม่ำเสมอแน่นอน วิธีการหนึ่งซึ่งนิยมทำกันและมีศักยภาพสูงในปัจจุบันคือการใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมหรือรีคอมบิแนนท์เทคโนโลยีเพื่อปรับปรับปรุงสายพันธ์จุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์นี้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การควบคุมการผลิตโปรติเอส

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสส่วนมากมักจะเกิดผลกระทบจากการกดดันของสารคะตะบอไลท์, การกดดันจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end-product feedback repression) และการเหนี่ยวนำ (induction) (Nandakumar และคณะ, 1999 ; Drucker, 1972) โดยกระบวนการดังกล่าวถูกควบคุมจากแหล่งของสารอาหาร เช่น คาร์บอน ไนโตรเจนและซัลเฟอร์ อีกทั้งยังถูกควบคุมจากสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงจุลินทรีย์ เช่น การให้อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิ เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์โดยเฉพาะกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ คือ เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานเริ่มลดน้อยลง การสร้างสปอร์ของเชื้อก็จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการสร้างเอนไซม์ แต่เมื่อมีปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป ก็จะทำให้เกิด catabolic repression โดยกลูโคส

Samarntarn (1998) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *A. oryzae* U1521 พบว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการกดดันการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส โดยกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5% ทำให้ *A. oryzae* U1521 มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 0.5% การผลิตเอนไซม์ลดลงถึง 25% และประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ลดลงถึง 50% ในขณะที่การใช้แป้งที่ความเข้มข้น 1.5% ทำให้ *A. oryzae* U1521 มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งในระดับ 2% การผลิตเอนไซม์ลดลงเกือบ 40% จะเห็นว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่กดดันการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้เร็วกว่าแป้งเนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่ายกว่า จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกดดันได้เร็วกว่า เช่นเดียวกับสุภาวดี (2544) ได้ทำการศึกษาผลของการกดดันจากแหล่งคาร์บอน โดยการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน *A. oryzae* U1521 พบว่า การใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้เชื้อรา *A. oryzae* U1521 มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสน้อยกว่าการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นต่ำกว่า โดยที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร จะให้การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสต่ำสุด เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในอาหารมากจึงทำให้เกิดการกดดันการผลิต ส่วนการใช้กลูโคส 1 และ 3 กรัมต่อลิตร รามีการใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงจนใกล้หมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ที่กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร รามีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด รองลงมาคือ 3 กรัมต่อลิตร ส่วนกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรยังคงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่มากกว่าการใช้กลูโคส 3 กรัมต่อลิตร จึงทำให้การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสน้อยกว่า แต่เมื่อสุภาวดี (2544) ทำการป้อนแหล่งคาร์บอนและหรือไนโตรเจนมากกว่า 1 ครั้ง ลงไปในสูตรอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นฐาน พบว่าการเติมสารอาหารเหล่านั้นเพิ่มลงไปทำให้ *A. oryzae* U1521 มีการเจริญสูงขึ้น แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ อาจเนื่องจากมีสารยับยั้งการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเกิดขึ้น นอกจากนี้การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน *A. oryzae* 4a (Ruenwai, 2001) กลูโคสมีผลต่อการกดดันการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงเช่นกัน โดยเมื่อทำการย้ายเซลล์ลงสู่อาหารใหม่ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (minimal salt medium) *A. oryzae* 4a สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเซลล์ที่ย้ายลงสู่อาหารที่ประกอบด้วย minimal salt medium และกลูโคส จากการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมักเกิดการกดดันจากแหล่งคาร์บอน จึงมีความพยายามที่จะลดผลของการกดดันการผลิตเอนไซม์ ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การจำกัดสารอาหารเพื่อช่วยลดผลของการกดดันจากแหล่งคาร์บอน การผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดการกดดันจากแหล่งคาร์บอน เนื่องจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีค่า water activity ต่ำ และไม่มีการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแพร่ผ่านสู่เซลล์ได้น้อย มีรายงานว่า Nandakumar และคณะ (1999) ได้ทำการผลิต α-amylase และ amyloglucosidase จาก *A. niger* CFTRI 1105 บนอาหารแข็ง ซึ่งสามารถลดการกดดันจากแหล่งคาร์บอนทั้งที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงถึง 150 mg/g wheat bran ในสารอาหาร โดยสามารถผลิต α-amylase สูงถึง 1200 U/gm dry mouldy bran และ amyloglucosidase สูงถึง 18,000 U/gm dry mouldy bran

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์มีหลายชนิดและที่สำคัญในการลดต้นทุนการผลิตจะต้องหาแหล่งคาร์บอนที่หาง่าย ราคาถูก ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด และปัจจุบันยังมีการหันมาใช้ รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และจมูกข้าวสาลี ซึ่งองค์ประกอบของรำข้าวเจ้า รำข้าวสาลีและจมูกข้าวสาลี แสดงได้ดังตารางที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ ดังนี้

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า (อรอนงค์, 2542)

ส่วนประกอบ	ข้าวเปลือก (เปอร์เซ็นต์)	ข้าวซ้อมมือ (เปอร์เซ็นต์)	ข้าวที่สีแล้ว (เปอร์เซ็นต์)	รำข้าว (เปอร์เซ็นต์)
คาร์โบไฮเดรต	87.2	91.5	66.8	46.6
โปรตีน	8.3	7.6	13.2	14.6
เถ้า	1.7	0.5	7.1	10.6
ไขมัน	2.0	0.3	10.7	13.4
เส้นใย	1.1	0.4	3.3	12.7
ไนโตรเจนสกัด	82.4	88.8	62.5	45.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี (อรอนงค์, 2542)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	48.0
โปรตีน	14.2
เถ้า	8.6
ไขมัน	12.0
เส้นใย	13.3
ไนโตรเจนสกัด	43.5

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของจมูกข้าวสาลี (อรอนงค์, 2542)

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรต	45.7
โบ่รตีน	18
เถ้า	5
ไขมัน	8.6
เส้นใย	12
ไนโตรเจนสกัด	40.9

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนนอกจากเป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างเซลล์แล้วยังทำหน้าที่ควบคุมกลไกการทำงาน ได้แก่ cellular metabolism, catabolic activity และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส การผลิตเอนไซม์ส่วนมากมักถูกควบคุมโดยแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหาร ทั้งการมีแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป หรือการขาดแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ (Marzluf, 1981 ; Marzluf, 1997; Scazzocchio และคณะ, 1995) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย กลูตามีน กรดนิวคลีอิคและโปรตีน เพื่อการดำรงชีวิตได้ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *A.oryzae* NISL 1913 (Fukushima และคณะ, 1989) การเติมโปรตีนโดยเฉพาะ defatted soybean flour (DSF) ที่นำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ได้ แต่ถ้าทำการเติมในปริมาณที่มากเกินไปการผลิตเอนไซม์โปรติเอสถูกกดดันเนื่องจากกรดอะมิโนอิสระและแอมโมเนียที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีน เช่นเดียวกับใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. oryzae U1521 (สุภาวดี, 2544) ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนคือ defatted soybean ร่วมกับกลูโคสในสูตรอาหารพื้นฐาน พบว่าการเติมสารอาหารเพิ่มทำให้รามีจำนวนเซลล์มากกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่ไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่ม และเมื่อเติม defatted soybean ในปริมาณมากขึ้นทำให้รามีจำนวนเซลล์มากขึ้นด้วย เนื่องจากราสามารถใช้ defatted soybean เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีการเติมสารอาหารเพิ่มไม่ได้ทำให้ *A. oryzae* U1521 มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นทั้งที่รามีจำนวนเซลล์สูงขึ้น อาจเนื่องจาก defatted soybean ถูกใช้ไปและทำให้เกิดกรดอะมิโนหรือเพปไทด์ขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนและเพปไทด์เหล่านี้ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตโปรติเอสได้ ใน *Bacillus firmus* NRS 783 (Moon และ Parulekar, 1991) ที่ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า yeast extract ที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในขณะที่ความเข้มข้นของ yeast extract ที่เพิ่มขึ้นทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง เนื่องจากกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน yeast extract ไปกดดันการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่นเดียวกับในรายงานของ Samarntarn (1998) พบว่าการใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.75% การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสและปริมาณเซลล์ของ *A. oryzae* U1521 เพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า yeast extract สามารถใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract ในระดับที่ สูงกว่า 0.75% แม้เซลล์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นได้แต่การผลิตเอนไซม์ลดลง ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน *Pseudomonas fluorescens* NCDI 2085 (Fairbairn และ Law, 1987) พบว่าเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเชิงซ้อน เช่น โปรตีน มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่ในช่วง exponential phase แต่ถ้าเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหรือส่วนผสมของกรดอะมิโน การผลิตเอนไซม์ผลิตในช่วง early stationary phase แสดงให้เห็นว่าการที่เอนไซม์โปรติเอสผลิตได้ช้ากว่านั้น เนื่องจากเกิดการกดดันจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end-product repression) ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีมากในระหว่างช่วง exponential phase นอกจากโปรตีนที่นำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการกดดันการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแล้ว กรดอะมิโนที่ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการกดดันการผลิตเอนไซม์เช่นกัน Deepti และคณะ ได้ทำการใช้โปรตีนถั่วเหลืองเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Penicillium* sp. พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนถั่วเหลืองลงในอาหาร เอนไซม์โปรติเอสที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นด้วยโดยที่ปริมาณของโปรตีนถั่วเหลือง 25 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร จะได้ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด แต่ถ้าเพิ่มปริมาณของโปรตีนถั่วเหลืองกว่านี้พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้ลดลง Jorge และ Terenzi (1984) พบว่ากรดอะมิโนมีผลต่อการกดดันการผลิต nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) glycohydrolase (NAD(P)ase) และอัลคาไลน์โปรติเอสใน *N. crassa* ซึ่งกรดอะมิโน methionine, cystein, phenylalanine และ tryptophane กดดันการผลิต NAD(P)ase และอัลคาไลน์โปรติเอสมากกว่า 75% ในขณะที่ alanine และ glycine กดดันการผลิต NAD(P)ase เพียง 25% ส่วน casamino acid เป็นกรดอะมิโนที่กดดันการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด อย่างรุนแรง เช่นเดียวกับการผลิตอัลคาไลน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรติเอสใน *A. oryzae* 4a (Ruenwai, 2001) พบว่ากรดอะมิโน cystein มีผลยับยั้งการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส โดยเมื่อทำการย้ายเซลล์ลงสู่ minimal salt medium และ minimal salt medium ร่วมกับ cystein การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในอาหารที่มี cystein เป็นส่วนประกอบมีการผลิตเอนไซม์ลดลง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ในอาหารที่ประด้วย minimal salt medium เพียงอย่างเดียว การใช้แหล่งไนโตรเจนนอกจากจะมีผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์แล้วยังส่งผลต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ได้เช่นกัน Cohen และคณะ (1975) พบว่าการเติมโปรตีนลงไปในอาหาร vogel's medium มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรดิเอสโดย *N. crassa* 74A โดยเมื่อทำการย้ายเซลล์ลงสู่อาหารที่ขาดแหล่งไนโตรเจนและมีการเติมโปรตีน การผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มสูงขึ้น 20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีการเติมโปรตีน แสดงว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสถูกเหนี่ยวนำโดยโปรตีน ในขณะที่ Hanson และ Marzluf (1973) ได้ทำการศึกษาสารประกอบโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ โพลีเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง เพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ กรดอะมิโนผสมและโปรตีน ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน *N. crassa* เช่นกัน พบว่ามีเพียงโพลีเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลสูงเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ Wight และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาการกระตุ้นการผลิต extracellular protein โดย *B. brevis* 47 พบว่าการเติม polypeptone ที่ชั่วโมงที่ 21 (stationary phase) สามารถกระตุ้นการผลิตโปรตีนได้สูงถึง 14 g/L สำหรับการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนพบว่ายีน *pep* A และ *pep* B ที่ควบคุมการผลิต acidic extracellular proteases ใน *A. niger* (Jarai และ Buxton, 1994) ถูกเหนี่ยวนำด้วยโปรตีน เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติม Bovine serum albumin (BSA) เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน *pep* A และ *pep* B ในระดับของ transcription สูง แสดงว่าโปรตีน (BSA) ทำหน้าที่เหนี่ยวนำและควบคุมการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิด กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการกระตุ้นการผลิตโปรติเอสพบว่ากรดอะมิโนฮีสทิดีนและกรดยูโรคานิค กระตุ้นการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Vibrio alginolyticus* (Long และคณะ, 1981) ใน minimal media ในขณะที่ Samarntarn (1998) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของกรดอะมิโนต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรดิเอสใน *A. oryzae* U1521 พบว่า กรดอะมิโน ได้แก่ กรดกลูตามิค ทริปโตเฟน แอสปาราจีน และ ไกลซีน ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ โดยทริปโตเฟนเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์สูงสุด ตามด้วยกรดกลูตามิค แอสปาราจีน และ ไกลซีน ตามลำดับ ในขณะที่เมทไธโอนีนและฮีสทิดีนไม่มีผลในการเหนี่ยวนำ

อิทธิพลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N Ratio)

โปรตีนประกอบด้วย ไนโตรเจน 15% แม้ว่าไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์และเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิคและไคติน แต่คาร์บอนจัดว่าเป็นแหล่งพลังงานที่เซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตเช่นกัน ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (C/N Ratio) จึงมีความจำเป็นต่อเซลล์ โดยพบว่า C/N Ratio ในปริมาณสูง เช่น 50:1 ทำให้เกิดการสะสมของ alcohol, acetate-derived secondary metabolites,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipid หรือ extracellular polysaccharide ซึ่ง C/N Ratio ยังมีความสำคัญต่อเทคโนโลยีการหมักเช่นกัน (Carlile และ Watkinson, 1996) Pandey และคณะ (2000) ศึกษาผลกระทบของ yeast extract ต่อ specific cellular yield ของ Ovine growth hormone (OGH) ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะโดย *E. coli* ซึ่งส่วนใหญ่การใช้ความหนาแน่นของ *E. coli* ในปริมาณสูงช่วยให้ volumetric productivity ของ recombinant protein มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ specific cellular OGH yield ลดต่ำลง ดังนั้น กระบวนการที่จะรักษาระดับของ specific cellular OGH yield ใน *E. coli* ทำได้โดยการป้อนกลูโคสกับ yeast extract ลงไปในกระบวนการหมักระหว่างที่เซลล์มีความหนาแน่นสูง ซึ่งพบว่าการป้อนกลูโคสและ yeast extract ลงไปในอัตราส่วน 0.75 ช่วยลดการปลดปล่อยของ acetic acid และช่วยให้เซลล์มีการเจริญสูงขึ้น สามารถรักษาระดับของ specific cellular OGH yield ให้อยู่ที่ 66 mg/g dry weight cell เป็นผลทำให้ volumetric productivity ของ recombinant OGH เพิ่มขึ้นถึง 0.166 g/L/h และการผลิต OGH สูงถึง 2 g/L Bhattacharya และ Dubey (1997) ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้ heterologous gene ใน *E. coli* มีการแสดงออกดีที่สุด โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไกลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้คงที่ที่ 10 g/L แต่ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไกลซีนให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5-40 g/L พบว่า C/N Ratio เท่ากับ 15 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้อัตราการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (rate of expression of target gene), yield coefficient of target gene production (YP/X), yield coefficient of cellular growth (YX/S), จำนวนพลาสมิด (plasmid copy number) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specfic growth rate ; μ) ดีที่สุด คือ 2.9x103 U/mg/p/h, 5.5x106 U/mg/g, 0.48 g/g, 78 per genome และ 0.5 h^{-1} ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า C/N Ratio ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของ heterologous gene ใน *E. coli* นอกจากนั้น Luciana และคณะได้ทำการศึกษาผลของสับสเทรตต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Penicillium janthinellum* โดยใช้ เปลือกมันสำปะหลัง เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด เปลือกข้าวโอ๊ต และชานอ้อย เป็นสับสเทรต ซึ่งสับสเทรตเหล่านี้มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่สูง แต่มีโปรตีนต่ำ พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนั้นแทบจะไม่มีการสร้างเอนไซม์ขึ้นเลยซึ่งแสดงว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

อิทธิพลของแหล่งฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (DNA, RNA) และโปรตีน ในขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส ฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ RNAase หรือช่วยให้เอนไซม์โปรติเอสที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น ถ้าปริมาณของฟอสเฟตมีมากเกินไปในการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์โปรติเอสด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิทธิพลของแหล่งซัลเฟอร์

ใน *N. crassa* 74A (Hanson และ Marzluf, 1973) การใช้แหล่งซัลเฟอร์ที่ใช้ได้ง่าย เช่น ซัลเฟต และเมทไธโอนีนสามารถกดดันการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งการผลิตเอนไซม์ถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของแหล่งซัลเฟอร์และมีการเติมโปรตีนลงไป โดยการใช้ซัลเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 mM ร่วมกับการเติมโปรตีนลงไปด้วยสามารถพบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในขณะที่การใช้แหล่งซัลเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง 2 mM ถึงแม้มีการเติมโปรตีนลงไปในอาหารก็ไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ส่วนใน *A. oryzae* U1521 (Samarntarn, 1998) มีรายงานว่าการใช้กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบคือ เมทไธโอนีน มีผลต่อการยับยั้งการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในขณะที่การใช้ยีสทิดีนไม่ยับยั้งการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส อย่างไรก็ดีการยับยั้งการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยเมทไธโอนีนอาจเนื่องมาจากผลของพีเอช เนื่องจากการเติมเมทไธโอนีนทำให้พีเอชลดต่ำลง ซึ่งมีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส Tomonaga (1966) ศึกษาผลกระทบของการขาดแหล่งซัลเฟอร์ คือ Na_2SO_4 และแหล่งไนโตรเจน คือ $NaNO_3$ ต่อการผลิตโปรติเอสใน *A. oryzae* 1716 พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีทั้งแหล่งซัลเฟอร์และไนโตรเจนเป็นเวลา 1 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงสู่อาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ ขาดแหล่งไนโตรเจนและขาดทั้งแหล่งซัลเฟอร์กับไนโตรเจน แล้วทำการเปลี่ยนอาหารทุกวันพร้อมทั้งตรวจวัดปริมาณการผลิตโปรติเอสในอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่า เซลล์ที่ทำการย้ายลงในอาหารที่ขาดเพียงแหล่งซัลเฟอร์มีการผลิตโปรติเอสต่อเนื่องมากกว่า 1 สัปดาห์ ในขณะที่เซลล์ที่ทำการย้ายลงในอาหารที่ขาดเพียงแหล่งไนโตรเจนและขาดทั้งแหล่งซัลเฟอร์และไนโตรเจนตรวจพบการผลิตโปรติเอสได้น้อยมาก แสดงว่าการผลิตโปรติเอสถูกเหนี่ยวนำเมื่อทำการย้ายเซลล์ลงสู่อาหารที่ขาดแหล่งซัลเฟอร์ นอกจากแหล่งซัลเฟอร์มีผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอสแล้ว แหล่งซัลเฟอร์สามารถกดดันการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นได้เช่นกัน เช่น ใน *Klebsiella aerogenes* W70 (Adachi และคณะ, 1975) การผลิต arylsulfatase ถูกกดดันด้วย inorganic sulfate, sulfite, sulfide, thiosulfate และ cystein แต่เมทไธโอนีนยับยั้งการเจริญเติบโต ในขณะที่ *A. nidulans* (Siddiqi และคณะ, 1966) ที่ทำการปรับปรุงสายพันธุ์แล้ว พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ arylsulfatase ได้เมื่อใช้ inorganic sulfate ที่ความเข้มข้นสูงถึง 2 mM แต่การผลิตเอนไซม์ถูกกดดันโดย ซีสเทอีน ซีสทีน และเมทไธโอนีนใน *Flavobacterium heparinum* (Cerbelaud และคณะ, 1986) การสังเคราะห์ haparinase และ sulfatase ถูกควบคุมโดยซัลเฟอร์ ซึ่งการสังเคราะห์ haparinase จะถูกกดดันอย่างรุนแรง ส่วน sulfatase ถูกกดดันบางส่วนโดย sulfate คือ Na_2SO_4 และ Lcysteine เมื่อใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า $7.5x10^{-3}$ และ $8.3x10^{-3}$ mM ตามลำดับ

อิทธิพลของแอมโมเนียม

แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้ง่ายจึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ จากการที่แอมโมเนียมสามารถใช้ได้ง่ายจึงมักเกิดการกดดันต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเช่นกัน ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *P. aeruginosa* ATCC 10145 (Whooley และคณะ, 1983) ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชิงซ้อนที่มี inorganic nitrogen คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ จะยับยั้งการผลิตโปรติเอสเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น การผลิตโปรติเอสลดลงแม้ปริมาณของชีวมวลเพิ่มขึ้น Cohen (1972) ได้ทำการศึกษาการกดดันของแอมโมเนียมในการผลิตเอนไซม์โดย *A. nidulans* wild type และ recombinant *xprDI* พบว่า แอมโมเนียม ไนเตรท หรือ เมทไธโอนีน ที่เติมลงใน milk medium ที่ขาดแหล่งไนโตรเจน กดดันการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน wild type เมื่อใช้ความเข้มข้น 2 mM และเกิดการกดดันอย่างรุนแรงที่ความเข้มข้น 5-10 mM ในขณะที่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน recombinant *xprDI* ไม่ถูกกดดันการผลิตที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมหรือไนเตรท 100 mM และเมทไธโอนีน ที่ความเข้มข้น 50 mM อีกทั้งใน *A. nidulans biAI* (Cohen, 1973) การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส (α ,γ, ε) และโปรติเอส (β) ถูกกดดันการผลิตเอนไซม์เมื่อในอาหารมีการเติมแอมโมเนียมไอออน เข้มข้น 50 mM

อิทธิพลของการให้อากาศและอัตราการกวน

การให้อากาศและอัตราการกวนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้การผลิตเอนไซม์แตกต่างกันด้วย

<u>การให้อากาศ</u>

อากาศประกอบด้วยออกซิเจน 21% จุลินทรีย์นำออกซิเจนไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการหายใจหรือในกระบวนการหมัก (Carlile และ Watkinson, 1996) ในกระบวนการหมัก การขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ส่งผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยาใน metabolic pathway และการเปลี่ยนแปลงของ metabolic flux มีผลต่อรูปแบบของการผลิตผลิตภัณฑ์ จึงมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปร่างลักษณะของจุลินทรีย์กับความต้องการการถ่ายเทออกซิเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ขึ้น (Çalik และคณะ, 1994) Çalik และคณะ (2000) ศึกษาผลกระทบของการถ่ายเทออกซิเจนต่อการผลิตเอนไซม์ serine alkaline protease (SAP) โดย *B. licheniformis* DSM 1969 พบว่าการถ่ายเทออกซิเจนในสภาวะที่มีอัตราการให้อากาศ (air-inlet rate) 0.5 vvm และอัตราการกวน (agitation rate) 750 min-1 ในระดับปานกลาง เป็นสภาวะที่ดีที่สุด ที่ทำให้การผลิตและความเข้มข้นของ serine alkaline protease สูงสุด คือ 500 $U.cm^{-3}$ และ 0.198 $kg.m^{-3}$ ตามลำดับ ส่วนอัตราการให้อากาศในระดับต่ำคือ 0.2 vvm และอัตราการกวน 750 min^{-1} เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดในขณะที่เมื่อจำกัดอัตราการให้อากาศคือ 0.2 vvm และอัตราการกวน 150 min^{-1} ; 0.5 vvm และอัตราการกวน 150 min^{-1} ; 0.2 vvm และอัตราการกวน 500 min^{-1} ทำให้การถ่ายเทออกซิเจนไม่ดี เซลล์มีการเจริญเติบโตต่ำและการผลิต serine alkaline protease ต่ำเช่นกัน ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มการผลิดโดยใช้กระบวนการ two-step oxygen-transfer strategy โดยในช่วงแรกใช้สภาวะการถ่ายเทออกซิเจนต่ำ คืออัตราการให้อากาศ 0.2 vvm และอัตราการกวน 750 min^{-1} ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *B. licheniformis* DSM 1969 สภาวะนี้ใช้ในช่วง lag ถึง exponential phase หลังจากนั้นในช่วงที่ 2 สภาวะที่มีการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิต serine alkaline protease คืออัตราการให้อากาศ 0.5 vvm และอัตราการกวน 750 min^{-1} เป็นผลทำให้การผลิตและความเข้มข้นของ serine alkaline protease เพิ่มขึ้นจากการผลิตแบบขั้นตอนเดียวถึง 0.36 เท่า คือ 680 $U.cm^{-3}$ และ 0.225 $kg.m^{-3}$ ตามลำดับ สำหรับการผลิต pectolytic enzymes โดย *A. niger* A138 (JoŽica และคณะ, 1989) พบว่าเมื่อทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศในกระบวนการหมักจาก 0.5 vvm เป็น 1.2 vvm ทำให้การผลิต pectolytic enzymes เพิ่มขึ้น 2 เท่า จาก 30 U/ml เป็น 68 U/ml เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราการให้อากาศเพียง 0.5 vvm ตลอดการทดลอง

อัตราการกวน

โดยทั่วไปเมื่ออัตราการกวนสูงรามีการเจริญเป็นเส้นใย ในขณะที่การใช้อัตราการกวนต่ำทำให้รามีการเจริญเป็น pellet การให้อัตราการกวนจึงมีผลกระทบต่อการเจริญของรา (Cui และคณะ, 1998) เช่น ใน *Trichoderma reesei* (Lejeune และ Baron, 1995) พบว่าการใช้อัตราการกวนต่ำ 130 rpm ทำให้ปริมาณออกซิเจนต่ำมีผลให้รามีการผลิตเอนไซม์ต่ำ การใช้อัตราการกวนต่ำทำให้รามีการเจริญเติบโตเป็น pellet ขนาดใหญ่ การแพร่ผ่านของเอนไซม์ออกจาก pellet ได้ยาก อย่างไรก็ดีการใช้อัตราการกวนสูงเกินไป เช่นที่ 400 rpm ทำให้การผลิตเอนไซม์ต่ำเช่นกัน เนื่องจากอัตราการกวนสูงทำให้เกิดแรงเฉือน (shear stress) มาก เอนไซม์จึงถูกทำลาย Cui และคณะ (1998) พบว่า ในเชื้อรา *A. awamori* CBS 115.52 การใช้อัตราการกวนสูง (250 และ400 rpm) ทำให้รามีการเจริญเติบโตเร็วกว่าการใช้อัตราการกวนต่ำ (200 rpm) เมื่อทำการเปรียบเทียบที่อัตราการเจริญเติบโตระหว่าง 250 และ 400 rpm พบว่าที่ 400 rpm มีอัตราเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าการใช้อัตราการกวนที่ 250 rpm เนื่องจากเกิดผลกระทบของอัตราการแพร่ผ่านของออกซิเจนเข้าไปในเซลล์ทำให้การเจริญเติบโตแตกต่างกัน รวมทั้งแรงกล (machanical force) ที่เกิดขึ้นจากการกวนที่สูงขึ้นมีผลกระทบต่อรูปร่างของราทำให้ราถูกทำลายมากกว่า ใน *A. niger* A138 (Jožica และคณะ, 1989) การเพิ่มอัตราการกวนจาก 300 rpm เป็น 500 rpm เพิ่มการผลิต pectolytic enzymes ได้ถึง 2 เท่า แต่ในการศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดย recombinant *A. oryzae* (Jožica และคณะ, 1999) พบว่าการลดอัตราการกวนจาก 1000 rpm เป็น 550 rpm ทำให้รามีการเจริญเติบโตเป็นเส้นใยมากขึ้น อีกทั้งเส้นใยมีความยาวและกิ่งก้านเพิ่มมากขึ้น แต่การผลิตโปรตีนระหว่างการใช้อัตราการกวน 1000 rpm และ 550 rpm นั้นไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าอัตราการกวนส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของราแต่ไม่มีผลต่อการผลิตโปรตีน

อิทธิพลของการเจริญเติบโตของเซลล์

การเจริญเติบโตของเซลล์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ จากรายงานการผลิตโปรตีนโดย *B. brevis* 47 (Wight และคณะ, 1989) พบว่าการเติม polypeptone ลงไปในช่วง stationary phase (ชั่วโมงที่ 21) กระตุ้นการผลิตโปรตีนให้เพิ่มขึ้นเป็น 14 g/L เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม polypeptone ลงไปในช่วง late exponential phase (ชั่วโมงที่ 12) ที่ผลิตโปรตีนเพียง 8 g/L แสดงว่าการเติม polypeptone ลงไปในระยะที่เหมาะสมทำให้การผลิตโปรตีนเพิ่มขึ้น ใน *Thermus sp.* Rt41A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Janssen และคณะ, 1994) พบว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสเริ่มผลิตเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง early log phase จนกระทั่งการเจริญของเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase ปริมาณการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเริ่มลดลง เนื่องจากสารอาหารที่เชื้อนำมาใช้ในการเจริญเติบโตหมดลง เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Escherichia coli* TG1 (Sakamoto และคณะ, 1994) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) พบว่าการเติม IPTG ลงในอาหารในช่วง log phase สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าเมื่อทำการเติม IPTG ลงในช่วง stationary phase ถึงแม้ว่าในช่วงนี้มีปริมาณเซลล์จำนวนมากก็ตาม เช่นเดียวกับการผลิต recombinant rat anionic ใน *E. coli* X90 (Yee และ Blanch, 1993) ที่มีพลาสมิด pZ3 พบว่าการเติม IPTG ลงในช่วง late log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงถึง 92 DCW g/L สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิต recombinant rat anionic ได้สูงถึง 56 mg/L ในขณะที่การเติม IPTG ลงไปในช่วง early log phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตเพียง 14 DCW g/L สามารถผลิต recombinant rat anionic ได้เพียง 13 mg/L Sotiriadis และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการผลิต singlechain antibody fragment (scFv) ภายใต้การควบคุมของ xylanase promoter โดย recombinant *A. awamori* ใน stirred tank reactor พบว่าการเหนี่ยวนำโดย xylose ในช่วง late exponential phase สามารถผลิต scFv ได้สูงถึง 16.2 mg/L ในขณะที่เมื่อทำการเหนี่ยวนำในช่วง early exponential phase สามารถผลิต scFv ได้เพียง 14.5 mg/L ใน *Lactobacillus curvatus, L.carnis* และ *L. sake* (Papon และ Talon, 1988) การผลิตเอนไซม์ lipase เริ่มมีการผลิตเมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง logarithmic phase การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและการผลิตลดลงเมื่อการเจริญเข้าสู่ในช่วง stationary phase ในขณะที่ *B. thermoshacta* (Papon และ Talon, 1988) การผลิตเอนไซม์ lipase เกิดขึ้นเมื่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่างช่วง logarithmic phase และการผลิตลดลงเมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง late stationary phase

อิทธิพลของความเข้มข้นของเซลล์

Agger และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการผลิต α-amylase โดย *A. oryzae* A1560 และ recombinant *A. nidulans* ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องและกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งเมื่อทำการเลี้ยง *A. oryzae* A1560 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ dilution rate 0.075 h^{-1} และจำกัดความเข้มข้นของกลูโคสในถังหมักประมาณ 5 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เกิดการกดดันการผลิต โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักให้อยู่ในช่วง 2-12 g DW/L พบว่าค่า specific rate ของ α-amylase production ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเมื่อทำการเลี้ยง *A. oryzae* A1560 ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยรักษา specific growth rate ให้คงที่ที่อัตราการเจริญสูงสุด (μ_m) เท่ากับ 0.075 h^{-1} พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นค่า specific rate ของ α-amylase production จะลดลงเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมีผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการจำกัดของออกซิเจนที่เซลล์นำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์

อิทธิพลของสัณฐานวิทยา (Morphology)

สัณฐานวิทยาเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จากรูปร่างลักษณะหนึ่งไปเป็นลักษณะหนึ่ง รูปร่างลักษณะของราเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเลี้ยงเซลล์และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Deshpande, 1992) เช่น การเจริญของราในอาหารเหลวอยู่ในรูปของเส้นใย เป็นผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ซึ่งมักเป็นปัญหาต่อการถ่ายเทอากาศและของเหลวในถังหมัก ในขณะที่เมื่อรามีการเจริญอยู่ในรูปของ pellet สามารถทำให้ง่ายต่อการผสมและการถ่ายเทอากาศ ดังนั้นรูปร่างลักษณะของราจึงมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ (Carlsen และคณะ, 1996) นอกจากรูปร่างลักษณะของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์แล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อสัณฐานวิทยาของรา ได้แก่

<u>สารอาหาร</u>

มีรายงานว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *A. oryzae* L-83 (Ueno และคณะ, 1987) ใน soybean meal รามีการเจริญเติบโตแต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้แม้ว่ารามีการเจริญเติบโตสูง แต่เมื่อทำการเติมฟอสเฟต เช่น KH_2PO_4, NaH_2PO_4 หรือ $NH_4H_2PO_4$ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.2 M ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นภายหลังจากการผลิตเอนไซม์สูงสุด รามีลักษณะเป็น conidiophores แสดงว่าสารอาหารจำพวกฟอสเฟตที่เติมลงไปมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างลักษณะของรา Papagianni และคณะ (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อรูปร่างลักษณะของ *A. niger* และการผลิต phytase บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว พบว่าเมื่อทำการเติม wheat bran ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งการเลี้ยงบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวทำให้ *A. niger* มีการเจริญเติบโตและการผลิต phytase เพิ่มขึ้น และรูปร่างลักษณะของราเปลี่ยนแปลงจาก pellet ไปเป็น filamentous ซึ่งลักษณะของราแบบ filamentous mycelium และ pellet ขนาดเล็กทำให้การผลิต phytase สูงกว่าราที่มีลักษณะเป็น pellet ขนาดใหญ่ แสดงว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและรูปร่างลักษณะของรามีผลกระทบต่อการผลิต phytase นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนยังมีผลกระทบต่อการผลิต arachidonic acid (AA) และรูปร่างลักษณะของ *Mortierella alpina* CBS 754.68 (Park และคณะ, 1999) โดยเมื่อใช้ yeast extract, gluten หรือ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน รูปร่างลักษณะของราเป็น pellet กลม ในขณะที่เมื่อใช้ pharmamedia, fish meal หรือ soybean meal *M. alpina* มีลักษณะเป็น filamentous mycelia ซึ่งพบว่ารูปร่างลักษณะของราเมื่อใช้ soybean meal เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้ AA yield สูงถึง 0.14 g/g dry weight ซึ่งสูงเป็น 2 เท่าเมื่อทำการเลี้ยงใน yeast extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเชื้อเริ่มต้น (inoculum)

Domingues และคณะ (2000) รายงานว่าการเลี้ยง *Trichoderma reesei* Rut C-30 ในอาหารที่ไม่มีการเติม tween 80 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นต่ำ 10^5 spores/ml รามีการเจริญเป็น pellet ขนาดใหญ่ แต่เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นสูง 10^7 spores/ml ราจะมีการเจริญเป็น flocs ขนาดเล็กและสามารถผลิต soluble protein ได้สูงกว่าเมื่อใช้จำนวนเชื้อเริ่มต้นต่ำ Deepti และคณะ (2004) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Penicillium* sp. จะเพิ่มขึ้นในลักษณะแปรผันตามปริมาณเชื้อเริ่มต้นในรูปของกราฟเอกซ์โพเนนเชียล

พีเอช

Carlsen และคณะ (1996) รายงานว่า pH มีผลกระทบต่อรูปร่างลักษณะและการผลิต α-amylase ใน *A. oryzae* A1560 เมื่อใช้ pH ต่ำ (pH $\leq$2.5) ผนังเซลล์ของราขยายใหญ่ ทำให้การเจริญเติบโตต่ำ ที่ pH 3.0-3.5 รามีลักษณะเป็นเส้นใยอิสระ ที่ pH 4-5 รามีลักษณะเป็นทั้ง pellet และเส้นใยอิสระ ในขณะที่ pH สูงกว่า 6 รามีการเจริญเติบโตเป็น pellet อย่างเดียว รูปร่างลักษณะของรามีผลต่อการผลิต α-amylase โดยเมื่อรามีการเจริญเป็น pellet ผลิต α-amylase 3.0 FAU (gDW)-1h $^{-1}$ ในขณะที่รามีการเจริญเป็นเส้นใยอิสระผลิต α-amylase ได้ 7.5 FAU (gDW)-1h $^{-1}$ การที่รามีการเจริญเป็น pellet และทำให้การผลิต α-amylase ต่ำนั้นเป็นผลเนื่องจากการจำกัดออกซิเจนภายใน pellet

อุณหภูมิ

มีรายงานว่าอุณหภูมิมีผลกระทบต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน *Rhizopus oryzae* โดยอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้มีการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน *R. oryzae* สูงสุด คือ 341 U/g wheat bran นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิมีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นเช่นกัน ในการผลิต bacteriocins โดย *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mensenteroides* FR52 (Revol-Junelles และคณะ, 1998) พบว่า อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้มีการผลิต mesenterocin 52A และ mesenterocin 52B ดีที่สุด และในการผลิต α-amylase โดย *Streptomyces sp.* IMD 2679 (Mc Mahon และคณะ, 1997) พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ไม่มี cobalt ทำให้มีการผลิต α-amylase สูงสุดคือ 520 U/ml แต่เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าในอาหารประกอบด้วย cobalt ก็ตาม การผลิต α-amylase ลดลงเป็น 150 U/ml ใน *Lactobacillus sakei* CCUG 42687 (Aasen และคณะ, 2000) พบว่า ที่อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส) เป็นอุณหภูมิที่ทำให้การผลิต sakacin P สูงสุด ในขณะที่เมื่อใช้อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตต่ำ เนื่องจากความสามารถในการใช้กลูโคสลดลง เป็นผลให้การผลิต sakacin P ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เกิดผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมาหรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้นเป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา (Wang และ Hesseltine, 1965)

ใน *A. oryzae* U1521 (Samarntarn, 1998) การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสถูกควบคุมโดยพีเอชที่ระดับ transcription พบว่า ที่พีเอช 7 สามารถตรวจพบปริมาณ mRNA และการผลิตเอนไซม์มากกว่าที่พีเอช 5 Ruenwai (2001) ได้ทำการศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีน *alp A* ในการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *A. oryzae* 4a โดยทำการควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็น 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 พบว่า เมื่อควบคุมพีเอชอยู่ระหว่าง 5-9 มีการแสดงออกของยีน *alp A* และการสร้างอัลคาไลน์โปรติเอสลดลง ในขณะที่เมื่อควบคุมให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเป็น 3.0 พบว่าไม่สามารถตรวจพบการสร้างเอนไซม์และการแสดงออกของยีน *alp A* ใน *Thermus sp.* Rt 41A (Janssen และคณะ, 1994) การผลิตโปรติเอสสูงสุดเมื่อ พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 คือ 27.5 U/mg cell dry weight เมื่อพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงเป็น 5.0 การผลิตลดลงเป็น 9.3 U/mg cell dry weight เช่นเดียวกับการผลิตโปรติเอสใน *R. oryzae* ที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 5.5-6.0 ทำให้การผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ 337.5 U/g wheat bran Jarai และ Buxton (1994) รายงานว่า พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อมีบทบาทสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *pep* A และ *pep* B ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผลิต acidic proteases ของ *A niger* ซึ่งพบว่า ยีน *pep* A และ *pep* B ไม่มีการแสดงออกเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง ถึงแม้ว่าภายในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยโปรตีนก็ตาม และใน recombinant *A. niger* เมื่อทำการลดค่า พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลงจาก 5.4 เป็น 4.0 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ glucoamylase เพิ่มขึ้น 31%

ปริมาณน้ำอิสระ

Patrick และ Paul (2003) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของน้ำอิสระในกระบวนการ SSF ซึ่งพบว่าปริมาณของน้ำอิสระมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยพบว่า *Penicillium roqueforti* สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ปริมาณน้ำอิสระ (A_w) 0.97 แต่ถ้าเพิ่มปริมาณน้ำอิสระเป็น 0.98 เชื้อจะสร้างเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยลงและสร้างสปอร์มากขึ้น แต่ถ้าลดปริมาณน้ำอิสระให้เหลือ 0.96 พบว่าเชื้อราจะสร้างสารที่ให้กลิ่นในปริมาณที่สูงมากซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำอิสระก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

Moistening media

สารที่เติมลงไปในสับสเทรตที่เป็นของแข็งเพื่อเพิ่มความชื้นนั้นโดยปกติแล้วมักใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเพิ่มความชื้นให้กับสับสเทรต แต่ได้มีการทดลองนำอาหารต่างๆมาใช้เป็นตัวเพิ่มความชื้นซึ่งทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย โดยอาหารที่ใช้ คือ M-9, M-5, Czapek-Dox และ MS โดยเทียบกับน้ำประปาพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้นั้นเพิ่มขึ้นโดย M-9 และ Czapek-Dox สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด

2.4 การพัฒนาและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

การเลือกใช้วัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์มีความสำคัญโดยจะช่วยให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ แหล่งวัตถุดิบที่พิจารณามักเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว มีราคาถูก และจำนวนมากตลอดเวลาไม่มีข้อจำกัดทางฤดูกาล เช่น วัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช กากเมล็ดธัญพืชที่สกัดเอาน้ำมันออกแล้ว ส่วนใหญ่จะใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ แต่ยังมีสารอาหารเหลืออยู่มากโดยเฉพาะโปรตีนจะยังคงมีเหลืออยู่ถึง 40 % การนำเอาวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปทางอุตสาหกรรมที่ดีทางหนึ่ง แต่ถ้าสามารถนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่า ก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยหาแหล่งวัตถุดิบราคาถูกในประเทศที่เหมาะสมจะใช้เป็นสารต้นตอไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูง แล้วจึงขยายสเกลการผลิตเพื่อให้ได้เอนไซม์มากขึ้น

2.4.1 ตัวอย่างของแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

1.รำข้าวสาลี (อรอนงค์, 2532)

โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสาลี

โครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี

ลักษณะของเมล็ดข้าวสาลีที่มนุษย์นำมาบริโภคเป็นส่วนใหญ่ แบ่งได้เป็นสองส่วน คือ ด้านสันหลัง (dorsal side) ซึ่งจะเป็นส่วนที่ติดอยู่กับเลมมา (lemma) มีลักษณะโค้งเป็นสัน ส่วนอีกด้านคือ ด้านท้อง (ventral side) อยู่ติดกับพาเลีย (palea) มีลักษณะเป็นร่อง (crease) โดยที่บริเวณที่อยู่สองข้างร่องจะนูนเรียกว่าแก้ม (cheeks) ทางโคนของเมล็ดด้านสันหลังจะเป็นคัพภะ (germ) และส่วนปลายเมล็ดทางยอดจะมีขนสั้นๆ (beard) ติดอยู่ เมล็ดข้าวสาลีนี้จะมีความกว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 4-8 มิลลิเมตร รูปร่างยาวรีคล้ายรูปไข่ เมื่อตัดตามขวางจะมีรูปคล้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวใจมีร่องด้านหนึ่ง ส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวสาลีแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือ เปลือกหุ้มผลและเมล็ด ดังแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งจะอธิบายในส่วนของรำข้าวสาลี ดังนี้

1. เปลือกหุ้มผล

ก. ชั้นนอก

เป็นชั้นนอกสุดที่ห่อหุ้มผลเพื่อป้องกันอันตรายให้แก่ผล ประกอบด้วยเซลล์ชั้นย่อย 3 ชั้น คือ เซลล์ชั้นนอกสุดซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปแท่งตามความยาวของผล แถวเดียว ลักษณะบางกันน้ำได้ ชั้นนี้จะมีลักษณะเป็นขน บริเวณตอนบนของเมล็ดอยู่เป็นกระจุกยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร หรือสั้นกว่าแล้วแต่ชนิดของข้าวสาลี ชั้นถัดจากเซลล์ชั้นเปลือกนอกสุดจะเป็นเซลล์ตามยาวของผลมีแถวเดียว หรือสองแถว มีหนังบาง ถัดไปเป็นชั้นของเซลล์ที่มีผนังบางมาก กันน้ำและเชื้อราไม่ให้เข้าไปทำอันตรายเมล็ดได้

ข. ชั้นใน

ประกอบด้วยเซลล์อีก 3 ชั้น ชั้นระหว่างกลาง เป็นเซลล์คั่นชั้นนอกกับชั้นใน มีรูปร่างหลายแบบไม่สม่ำเสมอ และอาจไม่พบในบางส่วนของเมล็ด ชั้นนอกจะเป็นเซลล์ขวางรูปสี่เหลี่ยม ชั้นในเป็นเซลล์รูปแท่งยาวรีทรงกระบอกซึ่งจะพบในบางส่วนของเมล็ดเท่านั้น

2. เมล็ด

ก. เปลือกหุ้มเมล็ดและชั้นของรงควัตถุ

ตรงส่วนที่เป็นร่องนั้นเปลือกหุ้มเมล็ดจะเชื่อมต่อกับชั้นรงควัตถุ รวมกันเป็นชั้นหุ้มเนื้อของเมล็ดและคัพภะไว้ ทำให้เปลือกของเมล็ดข้าวสาลีมีสี ซึ่งใช้บอกชนิดของข้าวสาลีได้

ข. เยื่อโปร่งใส

ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์บาง โปร่งใส แต่มีคุณสมบัติกันน้ำไม่ให้เข้าสู่ภายในเมล็ด

ค. เนื้อเมล็ด

ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด เป็นเซลล์รูปสี่เหลี่ยม มีผนังเซลล์หนา และมีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าวสาลี

ผล (Kernel หรือ caryopsis)

1. เปลือกหุ้มผล (pericarp หรือ fruit coat)

รำ (bran)

ก. ชั้นนอก

- ชั้นเปลือกนอกสุด (epidermis หรือ epicarp)
- ชั้นถัดจากเปลือกนอก (hypoderm)
- ชั้นของเซลล์ที่มีผนังบาง (remnants of the walled cells)

ข. ชั้นใน

- เซลล์ระหว่างกลาง (intermediate cells)
- เซลล์ขวาง (cross cells)
- เซลล์รูปแท่ง (tube cells)

2. เมล็ด (seed)

ก. เปลือกหุ้มเมล็ดและชั้นของรงควัตถุ

ข. เยื่อโปร่งใส (nucellar หรือ hyaline layer)

ค. เนื้อเมล็ด (endosperm)

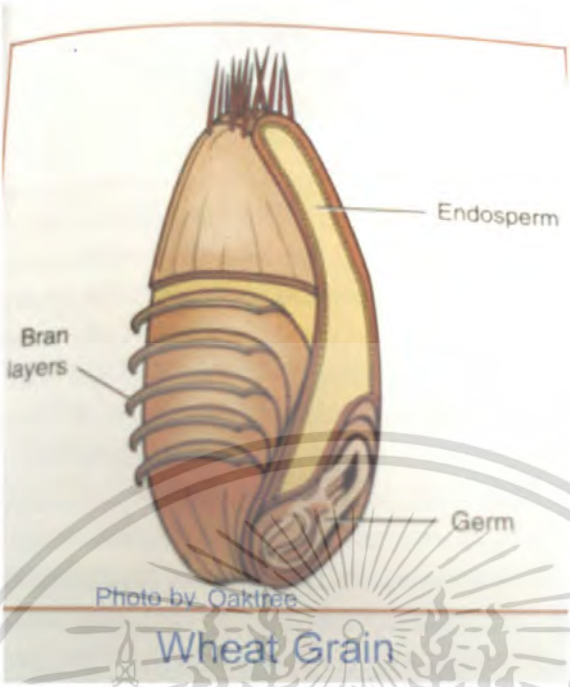
- เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด (aleurone layer)
- สตาร์ชในเนื้อเมล็ด (starchy endosperm)

ง. คัพภะ (germ หรือ embryo)

- ใบเลี้ยงอ่อน (scutellum หรือ cotyledon)
- แกนกลางของคัพภะ (embryonic axis)
- ส่วนยอด (plumule)
- ส่วนรากแขนง (secondary root)
- ส่วนรากแก้ว (primary root)
- รอยต่อ (epiblast)

ที่มา : อรอนงค์ (2532)

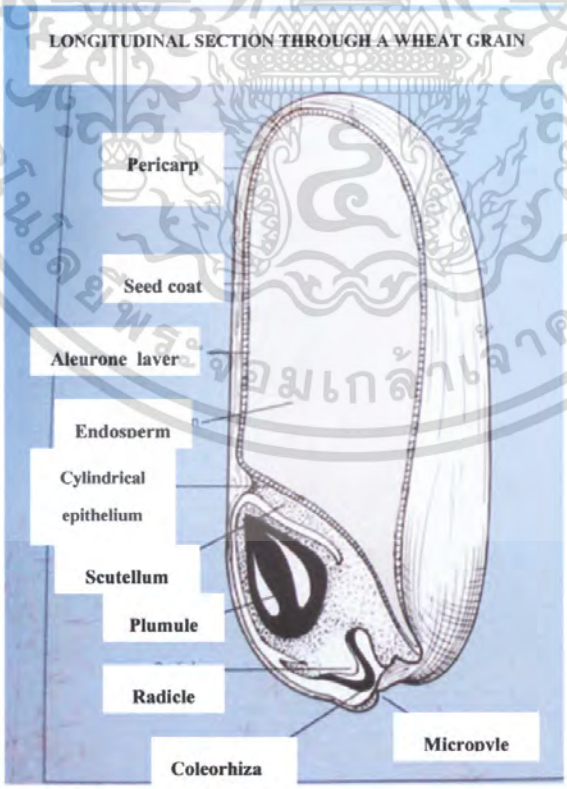
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าวสาลี

ที่มา:

http://www.pantown.com/board.php?id=5495&area=4&name=board8&topic=253&action=view



รูปที่ 4 แสดงรายละเอียดโครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี

ที่มา:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

http://www.pantown.com/board.php?id=5495&area=4&name=board8&topic=253&action=view

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัดส่วนของโครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี

ตามลักษณะโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าวสาลีนั้น เมื่อนำมาหาสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อการเปรียบเทียบปริมาณของแต่ละส่วนในเมล็ดข้าวสาลีนี้ (ตารางที่ 11) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในสัดส่วนเมล็ด 100 ส่วน จะมีเนื้อเมล็ดมากที่สุดคือ ประมาณ 81-84 ส่วน นอกจากนั้นเป็นส่วนเปลือกชั้นต่างๆ ที่รวมกันเป็นรำอีกประมาณ 14-16 ส่วน และส่วนที่เหลือคือคัพภะอีก 2-3 ส่วน

ตารางที่ 11 สัดส่วนโครงสร้างของเมล็ดข้าวสาลี

โครงสร้างของเมล็ด	% น้ำหนักแห้ง
เปลือกหุ้มผล	
ชั้นนอก	4.35
ชั้นใน	1.44
เมล็ด	
เปลือกหุ้มเมล็ดและชั้นโปร่งใส	2.21
เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด	6.7 – 7.0
รำ	14.1 – 15.9
เนื้อเมล็ด	81.4 – 84.1
แกนกลางของคัพภะ	1.0 – 1.6
ใบเลี้ยงอ่อน	1.4 – 2.0
คัพภะทั้งหมด	2.5 – 3.6

ที่มา : อรอนงค์ (2532)

องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวสาลี

รำข้าวสาลีเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวสาลี สามารถแบ่งแยกออกได้หลายชนิด เช่น รำหยาบ รำละเอียด นอกจากนี้ยังมีการนำรำละเอียดไปทำการสกัดน้ำมันรำข้าว กากที่เหลือเรียกว่า กากรำ หรือรำสกัดน้ำมัน

<u>รำหยาบ</u> มีส่วนของเปลือกนอกติดกับเมล็ดข้าว (Bran) ส่วนของจมูกข้าว (germ) ส่วนของปลายข้าว (broken rice) ส่วนของเมล็ดข้าว (endosperm) และอาจมีส่วนของแกลบปนมาบ้าง

<u>รำละเอียด</u> ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ปลายข้าวและมีแกลบปนเล็กน้อย

<u>รำสกัดน้ำมัน</u> ได้จากการนำรำละเอียด หรือรำสดไปสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงลักษณะของรำข้าวสาลี

รำเป็นส่วนรวมของเปลือก ซึ่งต้องทำการแยกออกในกระบวนการบดข้าวสาลีให้เป็นแป้ง และจัดเป็นผลพลอยได้ขายเป็นอาหารสัตว์ จึงมีผู้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบไว้ละเอียดหลายองค์ประกอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โปรตีน แร่ธาตุ ไขมัน วิตามิน และเอนไซม์ ในตารางที่ 12 นี้แสดงปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนในรำ โดยมีโปรตีนระหว่าง 12-14% และในปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีกรดอะมิโนพวกกรดกลูทามิกเป็นองค์ประกอบมากที่สุด (ประมาณ 3%) มีอาร์จินีน กรดแอสพาร์ติก และโปรลีน ประมาณ 1% นอกจากนั้นก็มีกรดอะมิโนที่มีปริมาณน้อยกว่า 1% แต่มากกว่า 0.5% ได้แก่ ฮีสทิดีน ไอโซลิวซีน เมทไธโอนีน และไทโรซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของโปรตีนและกรดอะมิโนในรำข้าวสาลี

องค์ประกอบ	% (ที่ความชื้น 14%)
โปรตีน (N x 5.7)	11.8-14.5
อะลานีน (alanine) Ala	0.7-0.8
อาร์จินีน (arginine) Arg	1.01-1.12
กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) Asp	1.05-1.20
ซีสทีน (cystine) Cys	0.32-0.42
กรดกลูทามิก (glutamic acid) Glu	2.16-3.21
ไกลซีน (glycine) Gly	0.82-0.94
ฮีสทิดีน (histidine) His	0.39-0.50
ไอโซลิวซีน (isoleucine) Ileu	0.39-0.50
ลิวซีน (leucine) Leu	0.80-0.96
ไลซีน (lysine) Lys	0.56-0.61
เมทิโอนีน (methionine) Meth	0.20-0.26
ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) Phen	0.51-0.62
โปรลีน (proline) Prol	0.70-1.0
เซอรีน (serine) Ser	0.57-0.76
ทริโอนีน (threonine) Thre	0.36-0.53
ทริปโทแฟน (tryptophan) Tryp	0.26
ไทโรซีน (tyrosine) Tyr	0.38-0.47
วาลีน (valine) Val	0.54-0.79

ที่มา : Pomeranz (1971)

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมดและแร่ธาตุอื่นๆ แสดงไว้ในตารางที่ 13 โดยในส่วนของรำนี้มีเถ้าอยู่ประมาณ 5-9% และมีแร่ธาตุหลายชนิด โดยเฉพาะพวกโพแทสเซียม และฟอสฟอรัสใรปริมาณสูงกว่าแร่ธาตุอื่น เช่น แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุปริมาณน้อยในอัตราส่วนในล้านส่วนอีกหลายอย่างได้แก่ ทองแดง อะลูมิเนียม โซเดียม นิกเกิล โคบอลต์ รวมทั้งซีลีเนียม และรูบิเดียมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 องค์ประกอบของเถ้าและแร่ธาตุอื่นในรำข้าวสาลี

องค์ประกอบ	% (ที่ความชื้น 14%)
เถ้า	5.3-9.5
โพแทสเซียม (potassium) K	0.61-1.32
ฟอสฟอรัส (phosphorus) P	0.9-1.55
แมกนีเซียม (magnesium) Mg	0.035-0.64
แคลเซียม (calcium) Ca	0.041-0.13
เหล็ก (iron) Fe	0.0047-0.018
แมงกานีส (manganese) Mn	0.009-0.043
สังกะสี (zinc) Zn	0.0056-0.048
ซัลเฟอร์ (sulfur) S	0.106-0.232
คลอรีน (chlorine) Cl	0.0332
	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)
ทองแดง (copper) Cu	8.4-22
อะลูมิเนียม (aluminium) Al	5-23
โซเดียม (sodium) Na	31-410
นิกเกิล (nickel) Ni	0.33-140
โคบอลต์ (cobalt) Co	0.0095-0.12
ตะกั่ว (lead) Pb	3
ดีบุก (tin) Sn	1.6
เงิน (silver) Ag	0.9
แบเรียม (barium) Ba	9.0-26
สตรอนเซียม (strontium) Sr	1.0-6.2
โบรอน (boron) B	2.2-9.8
ซีลีเนียม (selenium) Se	0.1-0.75
รูบิเดียม (rubidium) Rb	1.97
ไอโอดีน (iodine) I	0.007-0.210

ที่มา : Pomeanz (1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันในส่วนของรำ ปรากฏว่ามีประมาณ 5% แบ่งแยกได้เป็นไขมันประเภทต่าง ๆ รวมทั้งกรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 องค์ประกอบของไขมันในรำข้าวสาลี

องค์ประกอบ	**% (ที่ความชื้น 14%)**
ไขมันสกัดโดยใช้อีเทอร์	3.1-4.82
ไขมันยึดเหนี่ยวกับสารอื่น (bound lipid)	0.36
ฟอสฟอลิพิด	0.07-0.75
	%
โมโนกาแล็กโทซิลกลีเซอไรด์	0.068
ไดกาแล็กโทซิลกลีเซอไรด์	0.131
ฟอสฟาทิดิลโคลีน	0.298
ไขมันไม่ผ่านกระบวนการการสะพอนิฟิเคชัน	0.09-0.36
	% ของกรดไขมันทั้งหมด
กรดไขมันอิ่มตัว	16
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	84

ที่มา : Pomeanz (1971)

วิตามินที่พบในรำจะเป็นพวกวิตามินบีชนิดต่างๆ รวมทั้ง ไบโอติน กรดโฟลิก อิโนซิทอล และโทโคฟีรอล ดังตารางที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 วิตามินในรำข้าวสาลี

ชนิดของวิตามิน	หน่วย	ปริมาณที่มีในรำ
ไบโอติน (biotin)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	0.44
โคลีน (choline)	%	0.154
กรดโฟลิก (folic acid)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	0.88
อิโนซิทอล (inositol)	%	1.34
ไนอะซิน (niacin)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	266
กรดแพนโทธินิก (pantothenic acid)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	39.1
ไรโบฟลาวิน (riboflavin)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	3.34
ไทอะมีน (thiamine)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	6.29
โทโคฟีรอล (tocopherol)	ส่วนในล้านส่วน (ppm.)	65

ที่มา : Pomeranz (1971)

สำหรับคาร์โบไฮเดรตจะประกอบด้วยเส้นใยหยาบประมาณ 10% เพนโทแซนและเซลลูโลส ประมาณ 21-26% ซึ่งมากกว่าคาร์โบไฮเดรตอื่น ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 คาร์โบไฮเดรตในรำข้าวสาลี

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	%
เส้นใย	8.0-10.7
เพนโทแซน	21.6-26.5
เซลลูโลส	21.4
สตาร์ช	7.51-9.0
น้ำตาลทั้งหมด	4.6-5.57
ซูโครส	5.0-5.58
น้ำตาลรีดิวซ์	0.2-4.42

ที่มา : Pomeanz (1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กากถั่วเหลือง

โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง (มยุรฉัตรและสุจิตรา, 2548)

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีนและไขมันจากพืชที่มีมากที่สุดแหล่งหนึ่ง ปริมาณโดยประมาณของสารอาหารดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าในเนื้อถั่วเหลืองซึ่งเป็นส่วนของใบเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนและไขมันรวมกันอยู่ในราว 60% ของน้ำหนักถั่วทั้งหมด และ 30% เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งรวมถึงน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ มีประมาณ 3.8% raffinose มีประมาณ 1.1% และซูโครสมีประมาณ 5.0% ส่วนที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีสารอาหารประเภท ฟอสฟาทิเดส สเตอรอลแอช ซึ่งจัดเป็นพวกแร่ธาตุ และวิตามิน เป็นต้น

รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง

ที่มา : http://www.doa.go.th/pl_data/SOYBEAN/IMAGE/soy03.jpg

ตารางที่ 17 ส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง (โดยน้ำหนักแห้ง) (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527)

ถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เถ้า
ถั่วเหลืองทั้งหมด	40	21	34	4.9
ใบเลี้ยง	43	23	29	5.0
เปลือกถั่ว	8.8	1	86	4.3
ยอดอ่อน	41	11	43	4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนจากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูงเมื่อคิดเปรียบเทียบทางด้านน้ำหนักกับอาหารประเภทอื่น ๆ เช่น เทียบกับเนื้อสัตว์มีปริมาณสูงกว่า 2 เท่า เทียบกับไข่ไก่และข้าวสาลีมีปริมาณสูงกว่า 4 เท่า โปรตีนในถั่วเหลืองมีคุณค่าทางอาหารของกรดอะมิโนสูง โปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกสะสมในเซลล์ของเนื้อถั่วเหลืองเรียกว่า proteinbodies หรือ storageproteins

ไขมันจากถั่วเหลือง

ไขมันเป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณรองลงมาจากโปรตีน การสะสมปริมาณของไขมันในถั่วเหลือง และปริมาณด้านส่วนประกอบของกรดไขมันในไขมันถั่วเหลือง เป็นผลมาจากคุณสมบัติของพันธุ์ถั่วเหลืองนั้น ๆ สภาพแวดล้อมในช่วงของการสะสมไขมันในเมล็ดโดยเฉลี่ยแล้วถั่วเหลืองของไทยจะมีไขมัน 16-18 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าปีใดฝนแล้งและถั่วเหลืองไม่เจริญงอกงามก็จะมีปริมาณของไขมันลดลงเหลือ 14-15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองของสหรัฐอเมริกามีไขมัน 18-20 เปอร์-เซ็นต์

ปริมาณของกรดไขมันที่พบ ถั่วเหลืองจะประกอบด้วยไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และมักจะมีอัตราส่วนค่อนข้างคงที่ คือประมาณ 15 ต่อ 85 ในกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวนี้พบว่า มีไขมันชนิดที่ดีและมีประโยชน์ต่อการบริโภค (essential fatty acids) มีอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง คือ 30-40 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะเป็นพวก linoleic acid และ linolenic acid เป็นต้น ในส่วนของไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งมีสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณนั้นก็จะประกอบไปด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 18 ตัวอยู่ และมีจำนวนของ Double bond อยู่มากจึงมีผลต่อการเกิดการออกซิเดชันได้ง่ายอันจะยังให้เกิดผลิตภัณฑ์ในลักษณะที่มีกลิ่นเหม็นหืน หรือ rancid ดังที่เราพบกันอยู่ทั่วไป จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นนี้จึงนำมาใช้ในการควบคุมเพื่อป้องกันในช่วงของการเก็บถั่วเหลืองในรูปของเมล็ด หรือน้ำมันถั่วเหลืองหรือแม้กระทั่งผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองโดยที่ต้องกำหนดอุณหภูมิในการเก็บ

นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังประกอบไปด้วยสารที่เรียกว่า phospholipid หรือ phosphatides ซึ่งเป็นสารไขมันที่มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

คาร์โบไฮเดรตในถั่วเหลือง

สารคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วเหลืองอาจแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1. <u>คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้</u> (water soluble carbohydrates) ส่วนใหญ่ก็จะได้แก่น้ำตาลต่าง ๆ เช่น disaccharide ได้แก่ sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) Trisaccharide ได้แก่ raffinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) tetrasaccharide ได้แก่ stachyose ($C_{24}H_{42}O_{21}$)

2. <u>คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ</u> (water insoluble carbohydrate) คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในใบเลี้ยงได้แก่ Arabinan, Arabinogalactan และอาจรวมถึงสารในกลุ่ม pectic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เถ้าและแร่ธาตุในถั่วเหลือง

แร่ธาตุส่วนใหญ่ที่พบเป็นประเภท โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกเนเซียม แคลเซียม โซเดียม และซัลเฟอร์ เป็นต้น

ปริมาณของธาตุแต่ละตัวมีโดยประมาณดังนี้

โปแตสเซียม	1.83%
ฟอสฟอรัส	0.78%
แมกเนเซียม	0.31%
แคลเซียม	0.24%
โซเดียม	0.24%
ซัลเฟอร์	0.24%

ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ ที่พบอยู่ในปริมาณที่น้อยมากได้แก่ คลอไรด์ โบรอน แมงกานิส เหล็ก ทองแดง แบเรียม และสังกะสี

วิตามิน

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งวิตามินบีรวมค่อนข้างสูง เช่น thiamine, riboflavin, และ nicotinic acid ในส่วนของวิตามินที่ละลายได้ใน ไขมัน พบว่ามีปริมาณ ß-carotene ในเมล็ดถั่วเหลืองอยู่ 2-7 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนวิตามินอีพบว่ามีในน้ำนมถั่วเหลืองในปริมาณ 1.4 ไมโครกรัมต่อกรัม

องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลือง มี 2 ชนิด คือ กากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการอัดน้ำมันและกากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี

กากถั่วเหลือง เป็นผลผลิตที่ได้จากเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งผ่านขบวนการแยกน้ำมันออกแล้ว ปัจจุบันมีกากถั่วเหลืองที่ได้จากขบวนการแยกน้ำมันออกที่นิยมใช้มี 3 วิธี คือ

1. วิธี Hydraulic process กากถั่วเหลืองที่ได้จะมีลักษณะเป็นแผ่นแข็ง มีน้ำมันเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 7 - 8

2. วิธี Expeller process กากถั่วเหลืองที่ได้จะมีน้ำมันเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 3 - 4 มีโปรตีนประมาณร้อยละ 44 - 45

3. วิธี Solvent extraction สกัดน้ำมันด้วยเคมี กากถั่วเหลืองที่ได้มีโปรตีนร้อยละ 44.3 และมีไขมันต่ำเพียงร้อยละ 0.5 - 1.0 จึงสามารถเก็บได้นานกว่าแบบอัดน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 แสดงลักษณะของกากถั่วเหลือง

ตารางที่ 18 ส่วนประกอบโดยประมาณของกากถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ (%)	
ความชื้น	10.0
โปรตีน	44.0
ไขมัน	1.0
เยื่อใย	7.0
เถ้า	6.0
แคลเซียม	0.25
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.20

ที่มา : http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน (%)	
ไลซีน	2.73
เมทไธโอนีน	0.59
เมทไธโอนีน+ซีสตีน	1.26
ทริปโตเฟน	0.59
ทรีโอนิน	1.72
ไอโซลูซีน	2.17
อาร์จินีน	3.18
ลูซีน	3.39
เฟนิลอะลานีน+ไทโรซีน	3.82
ฮิสติดีน	1.11
เวลีน	2.24
ไกลซีน	1.83

ที่มา : http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm

2.5 กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งเป็นกระบวนการหมักที่ใช้อาหารแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ น้ำที่อยู่ในระบบการหมักแบบนี้จะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับอาหารแข็ง ซึ่งปฏิกิริยาของจุลินทรีย์จะหยุดชะงักลงถ้าปริมาณความชื้นของอาหารมีประมาณ 12% กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งนี้ไม่รวมถึงการหมักในอาหารเหลวที่มีของแข็งที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูง หรือการหมักของแข็งที่อยู่ในอาหารเหลว วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแบบนี้ได้แก่ เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง) รำข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (เช่น ไม้ ฟางข้าว) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร (Smith, 1985 ; Mudgett, 1986 ; Smith and Aidoo, 1988) วัตถุดิบเหล่านี้มีโมเลกุลใหญ่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย มีอยู่เป็นจำนวนมาก หาได้ง่าย มีราคาถูก และมีสารอาหารในปริมาณมาก

การใช้อาหารแข็งในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่ที่สุด (Hesseltine, 1977) โดยกระบวนการหมักชนิดนี้มีในแถบตะวันออกไกลเป็นเวลานานหลายร้อยปีในขณะที่กระบวนการนี้เพิ่งเริ่มมีไม่นานในแถบตะวันตก กระบวนการหมักที่ใช้อาหารแข็งนี้ได้แก่ การผลิตเทมเป้ ซีอิ๊ว อองจอม (ontjom) เนยแข็ง การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ การทำปุ๋ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมัก และการกำจัดน้ำเสีย (ตารางที่ 18) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถผลิตได้จากอาหารแข็ง แต่การใช้อาหารแข็งในกระบวนการผลิตมีข้อจำกัดเนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายมากกว่าการผลิตโดยใช้อาหารเหลว

การหมักในอาหารแข็งส่วนใหญ่จะใช้กับเชื้อราที่สร้างเส้นใย ยีสต์บางชนิด แบคทีเรียบางชนิด เช่น พวก actinomycetes และ *Bacillus* 1 สายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารเหลวหรืออย่างน้อยนั้นจะต้องมีน้ำอยู่ในรูปอิสระ ด้วยเหตุนี้กระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปจึงใช้อาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งต่างจากเชื้อราที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ท่อนไม้ ราก ลำต้น ใบ และเมล็ดของพืช และบริเวณที่แห้งของสัตว์ เช่น หนัง กระดูก และมูลสัตว์ที่มีความชื้นต่ำ ตัวอย่างเช่น *Eurotium halophilicum* จะเจริญได้บนข้าวสาลีที่มีความชื้นเพียง 13-14 % (Hesseltine, 1977) ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง แต่มีจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่นำมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นการค้า ตัวอย่างเช่น การหมักอาหารในแถบตะวันออกไกล จะใช้เชื้อราพวก *Mucor, Rhizopus, Amylomyces, Aspergillus, Monascus* และ *Neurospora* การผลิตเนยแข็งจะใช้เชื้อต่าง ๆ เป็นตัวให้กลิ่นรสในระหว่างการบ่มเนยแข็ง การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเชื้อ *Phanerochaete, Trichoderma* และ *Chaetomium* และการผลิตเห็ดโดยเชื้อ *Agaricus, Lentinus* และ *Volvariella* (Smith and Aidoo, 1988)

แบคทีเรียและยีสต์จะมีบทบาทสำคัญในการหมักโดยใช้อาหารแข็งบางชนิด เช่น ยีสต์พวก *Saccharomyces, Saccharomycopsis* และ *Candida (Torulopsis)* หรือแบคทีเรียพวก *Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Bacillus* เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการหมักอาหารต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็งอาจเป็นจุลินทรีย์ 1 หรือ 2 ชนิด หรือหลายชนิดผสมกัน (mixed culture) ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การหมักในอาหารแข็งบางชนิดจะเจาะจงใช้จุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อผสมของ *Chaetomium cellulolyticum* และ *Candida lipolytica* ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้ฟางข้าวแทนการใช้เชื้อราตัวเดียวในการย่อยสลายฟางข้าว (Smith, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 ตัวอย่างของกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง (Smith and Aidoo, 1988)

ตัวอย่าง	วัตถุดิบ	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
การผลิตเห็ด	ฟางข้าว มูลสัตว์ ไม้	*Agaricus bisporus, Lentinus edodes, Volvariella volvaceae*
ซีอิ๊ว	ข้าวสาลีและถั่วเหลือง	*Aspergillus oryzae*
เทมเป้ (tempeh)	ถั่วเหลือง	*Rhizopus sp.*
อองจอม (ontjom)	กากถั่วลิสงที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	*Neurospora sitophila*
เนยแข็ง	นม	*Penicillium roqueforti*
การชะล้างโลหะ	แร่เกรดต่ำ	*Thiobacillus spp.*
กรดอินทรีย์	น้ำตาลทราย กากน้ำตาล	*Aspergillus niger*
เอนไซม์	รำข้าวสาลี อื่นๆ	*Aspergillus niger*
ปุ๋ยหมัก	อินทรียวัตถุต่างๆ	รา แบคทีเรีย actinomycetes
การกำจัดของเสีย	ส่วนประกอบต่างๆ ของของเสีย	แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว

2.5.1 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

เมื่อเปรียบเทียบการหมักในอาหารแข็งและอาหารเหลว เฮสเซลไทน์ (Hesseltine, 1972) ได้เสนอแนะข้อดีข้อเสียของกระบวนการหมักในอาหารแข็งไว้ ดังนี้

ข้อดีของการหมักในอาหารแข็ง

(1) อาหารแข็งส่วนใหญ่จะต้องเติมเพียงน้ำลงไปเท่านั้น แต่อาจมีการเติมสารอาหารอื่นๆ ลงไปด้วยก็ได้

(2) ปริมาตรของถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลที่ได้จากกระบวนการ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อย และมีสารอาหารอยู่ในปริมาณเข้มข้น

(3) การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อในถังหมัก (seed tank) ไม่มีความจำเป็น โดยสามารถใช้ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ได้

(4) อาหารแข็งมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้

(5) สภาพแวดล้อมของการเจริญของเชื้อราในอาหารแข็งค่อนข้างคล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ

(6) การเขย่าอาหารแข็งจะช่วยยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เชื้อราจะเจริญในรูปของเส้นใย ซึ่งเป็นการลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

(7) อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหารและอนุภาคจุลินทรีย์ได้อย่างสะดวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(8) ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมักอาจมากกว่าผลิตผลที่ได้จากการหมักในอาหารเหลวและผลิตผลที่ได้ค่อนข้างคงที่

(9) ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถนำมาสกัดออกจากอาหารแข็งได้ทันที โดยการเติมสารละลายลงไป หรืออาจนำมาเก็บแช่แข็งไว้ก่อนที่จะนำมาสกัด

(10) ผลิตผลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องแยกออกจากอาหารแข็งก่อน

ข้อเสียของการหมักในอาหารแข็ง

(1) การเขย่าหรือการกวนอาหารแข็งตลอดเวลาการหมักต้องอาศัยพลังงานสูง

(2) การเติมน้ำลงไปในอาหารแข็งในช่วงแรกของการหมัก อาจมีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้

(3) ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่ใช้อาจต้องมีปริมาณมาก ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

(4) วัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกรรมวิธีอื่นๆ ก่อนการใช้ เช่น นำมาทำให้แตก

(5) อาจต้องมีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อให้แน่ใจว่า ผลิตผลที่ต้องการในปริมาณมากมีความเป็นไปได้สูง

อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งยังมีข้อเสียเปรียบอีกหลายประการเช่น ข้อจำกัดของการส่งผ่านมวลสารภายในสับสเทรตที่เป็นของแข็งและความยากในการควบคุมความเข้มข้นของสับสเทรต นอกจากนี้อาหารที่ใช้มีข้อจำกัดเนื่องจากสับสเทรตที่เป็นของแข็งเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ดังนั้นความเหมาะสมขององค์ประกอบของอาหารจึงเป็นไปได้ยาก

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ SMF แล้วพบว่ามีส่วนที่แตกต่างกันหลายด้านโดนจะชี้แจงรายละเอียดออกเป็นข้อๆ ดังนี้ (Holker และ Lenz., 2005)

1. <u>พิจารณาในแง่ของประวัติศาสตร์</u>

เมื่อทำการเปรียบเทียบแล้วพบว่า SSF ได้ถือกำเนิดมานานแล้วในแถบทวีปเอเชีย แต่ในประเทศแถบยุโรปนั้นเพิ่งถือเริ่มกำเนิดขึ้นมา โดย SSF นั้นถือเป็นเทคโนโลยีที่มีทั้งศาสตร์และศิลป์ในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในทวีปเอเชีย เช่น การผลิต Koji โดยใช้ *A. oryzae* หรือในกระบวนการย่อยแป้งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ เช่น สาเก การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Trichoderma* sp. จะเห็นได้ว่าในเอเชียส่วนใหญ่การผลิตเอนไซม์และสารเมทาบอไลส์ส่วนใหญ่จะใช้กระบวนการ SSF ในการผลิตและเป็นกระบวนการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศในแถบนี้ซึ่งสูตรที่ใช้นั้นเป็นความลับและจะถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งสู่อีกรุ่นหนึ่ง ต่างจากในประเทศในแถบยุโรปที่กระบวนการ SSF ถูกขัดขวางโดยกระบวนการ SmF ที่ทำได้ง่ายกว่าและมีการพัฒนาเป็นอย่างมากตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 1940 เนื่องจากความจำเป็นในการผลิตยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากซึ่งในปัจจุบัน SSF นั้นแทบจะไม่เหลือให้เห็นในแถบยุโรปแล้ว เนื่องจากความต้องการขยายขนาดในระดับอุตสาหกรรมและมาตรฐานของกระบวนการ ผิดกับประเทศในแถบเอเชีย SSF ยังคงมีอยู่อย่างมากมายในหลายประเทศในรูปของการผลิตในระดับครัวเรือน ซึ่งได้มีการพัฒนาให้นำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในปัจจุบัน

2. ลักษณะทางชีววิทยา

SSF นั้นเป็นการจำลองสภาวะการเจริญคล้ายกับสภาวะการเจริญของเชื้อรากลุ่มเส้นสายจำพวก Ascomycetes, Basidiomycetes และ Deuteromycetes ในธรรมชาติซึ่งเจริญบนสับสเทรตที่มีความชื้น ด้วยเหตุนี้ SSF จึงเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงในกรณีที่ต้องการ เช่น การสร้าง conidiospores ด้วยเหตุนี้ SSF จึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการสร้าง conidiospores ในการผลิตชีส โดย *P. roqueforti* และ *P. camemberti* หรือการปรับปรุงคุณภาพซาลามี โดย *P. nalgiovensis* เป็นต้น ซึ่งสปอร์ที่ได้จากกระบวนการ SSF นั้นมีความเสถียรที่สูงกว่าและมีความต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้งและสารยับยั้งการงอกได้ดีเมื่อเทียบกับสปอร์ที่ผลิตโดยกระบวนการ SmF ทั้งนี้เนื่องมาจาก conidiospores ที่ผลิตจากกระบวนการ SSF มีความเป็น hydrophobic ที่สูงกว่า เนื่องจากการที่มีโปรตีนชนิดที่ไม่ชอบน้ำอยู่ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้นแต่มีขนาดที่เล็กลง นอกจากนี้การใช้เชื้อผสมในการหมักนั้น กระบวนการ SSF สามารถให้ผลลัพธ์ที่หาไม่ได้จาก SmF ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างที่เชื้อราเจริญบนสับสเทรตเชื้อราจะสร้างและหลั่งเอนไซม์ออกมาหลายชนิด ซึ่งการที่ใช้เชื้อผสมจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์บางตัวเพิ่มขึ้น แต่เอนไซม์ชนิดอื่นไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้พร้อมกันกับกระบวนการ saccharification และกระบวนการหมักได้โดยวางระเบียบในการเชื่อมต่อระหว่างสภาวะใช้อากาศและไม่ใช้อากาศเข้าด้วยกัน หลายๆกระบวนการทางอุตสาหกรรมอาหารมักจะใช้กระบวนการ SSF เช่นการผลิตหน่อไม้ดองที่ใช้เชื้อผสมในการหมัก ซึ่งระหว่างการหมักนั้นเชื้อผสมที่ใช้จะสร้างสารให้กลิ่นขึ้นมามากถึง 29 ชนิดซึ่งกลิ่นนี้จำเพาะต่อชนิดของอาหาร ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัวต่อผลิตภัณฑ์นั้นๆ

3. พิจารณาในแง่ของสิ่งแวดล้อม

ข้อได้เปรียบของกระบวนการ SSF ทางด้านสิ่งแวดล้อม คือ เนื่องจากการที่เป็นกระบวนการที่ไม่มีน้ำอิสระหรือมีน้ำน้อยมาก จึงทำให้กระบวนการนี้ไม่สิ้นเปลืองทรัพยากรน้ำ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำอยู่น้อยจึงไม่เกิดฟองทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้สารป้องกันการเกิดฟอง (antifoam) และการที่เป็นกระบวนการที่ไม่ต้องเข้มงวดในการฆ่าเชื้อ เนื่องจากปริมาณน้ำบริสุทธิ์ที่น้อยทำให้จุลินทรีย์น้อยชนิดจะสามารถเจริญได้ในสภาวะนี้ ทำให้ประหยัดการใช้พลังงานในการฆ่าเชื้อและใช้เครื่องมือน้อยชิ้นลง นอกจากนี้ยังเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจากการที่นำของเสียทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเทรต ทำให้ช่วยลดปัญหาขยะลงได้อีกทางหนึ่งด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. พิจารณาในแง่ของวิศวกรรม

ปัญหาที่สำคัญที่ทำให้กระบวนการ SSF ไม่เป็นที่แพร่หลายในประเทศแถบยุโรปก็เนื่องมาจากปัญหาทางด้านวิศวกรรมเนื่องจากการที่สัดส่วนที่ใช้ไม่มีความตายตัวทำให้ไม่มีมาตรฐานและมีข้อจำกัดในการขยายขนาดการผลิตเนื่องจากปัญหาในเรื่องของอุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มข้นของสับสเทรต เป็นต้น การเจริญของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนนั้นทำให้เกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลให้เอนไซม์บางชนิดเสียสภาพ และเนื่องจากกระบวนการ SSF เป็นกระบวนการที่ไม่มีน้ำหรือมีน้อยมากทำให้การกำจัดความร้อนนั้นเป็นไปได้ยาก โดยต้องทำการระบายความร้อนโดยการระเหย ซึ่งทำให้อาจต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และการระเหยนี้ทำให้ปริมาณน้ำอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ต้องมีการเติมน้ำลงไปเพื่อเพิ่มความชื้น ซึ่งการเติมน้ำลงไปถ้าเติมในปริมาณที่มากไปจะทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญแข่งขันได้ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนหรือถ้าไม่เกิดการปนเปื้อนก็จะเกิดปัญหาการถ่ายเทของออกซิเจนไม่เพียงพอ ซึ่งการกวนจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้แต่ก็จะทำให้เกิดปัญหาอื่นตามมาเนื่องจากแรงเฉือนที่เกิดจากการกวนอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่ถึงแม้จะมีปัญหามากมาย แต่การพัฒนาของกระบวนการ SSF ที่ผ่านมานับทศวรรษ ทำให้มีความเข้าใจทางด้านชีวภาพและกายภาพระหว่างการหมักในกระบวนการ SSF มากขึ้น ดังรูปที่ 5 และ 6 ซึ่งผลที่ตามมาคือชนิดของถังหมักที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนั้นมีหลากหลายชนิด ดังรูปที่ 7–10 แต่ถึงกระนั้นก็ยังไม่สามารถขยายขนาดสู่ระดับอุตสาหกรรมได้เนื่องจากปัญหาทางด้านวิศวกรรมที่ได้กล่าวมา ซึ่งถ้าสามารถแก้ปัญหาทางวิศวกรรมเหล่านี้ได้ SSF ก็น่าจะประสบความสำเร็จในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเหนือ SmF ได้

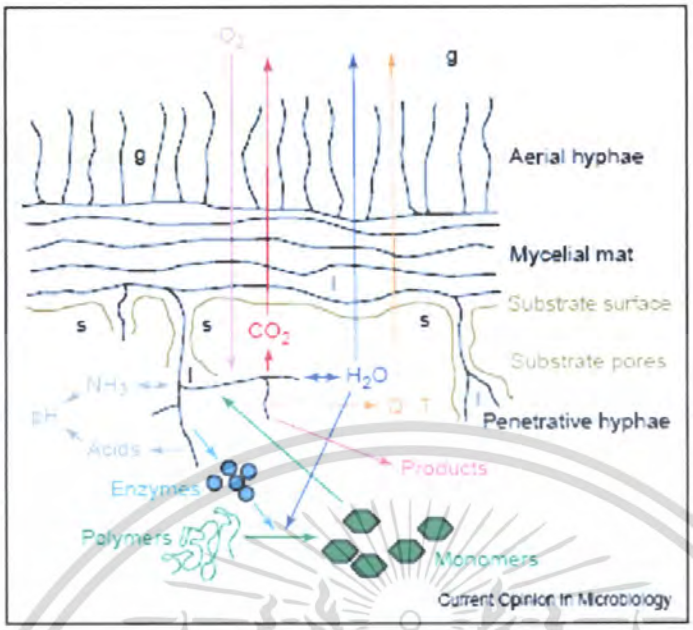
5. พิจารณาในแง่ของเศรษฐศาสตร์

กระบวนการ SSF นั้นสามารถทำให้เกิดข้อได้เปรียบทางเศรษฐศาสตร์ เช่น ในกระบวนการผลิตเอนไซม์โดยทำการเปรียบเทียบราคาระหว่างเอนไซม์ที่ผลิตได้ในกระบวนการ SmF กับ กระบวนการ SSF พบว่า ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งในกระบวนการ SmF สามารถผลิตได้ 10 กรัมต่อลิตรสับสเทรต แต่ค่าใช้จ่ายในการผลิตอยู่ที่ 200 ดอลล่าร์ต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งเมื่อคำนวณราคาขั้นต่ำของเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้พบว่ามีราคา 20 ดอลล่าร์ต่อกิโลกรัม ส่วนกระบวนการ SSF นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 20 มิลลิกรัมต่อกรัมสับสเทรต แต่เสียค่าใช้จ่ายในการผลิต 25 ดอลล่าร์ต่อตารางเมตร เมื่อคำนวณราคาของเอนไซม์พบว่ามีราคา 0.2 ดอลล่าร์ต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่าราคาของเอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการ SSF มีราคาถูกกว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการ SmF ถึง 100 เท่า ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากราคาของสับสเทรตที่มีราคาถูก ความจำเป็นในการฆ่าเชื้อมีน้อย การใช้เครื่องมือและวิธีการต่างๆมีน้อย และ กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ลดขั้นตอนน้อยลง คือลดขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ เพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ SSF นั้นมีความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงอยู่แล้ว

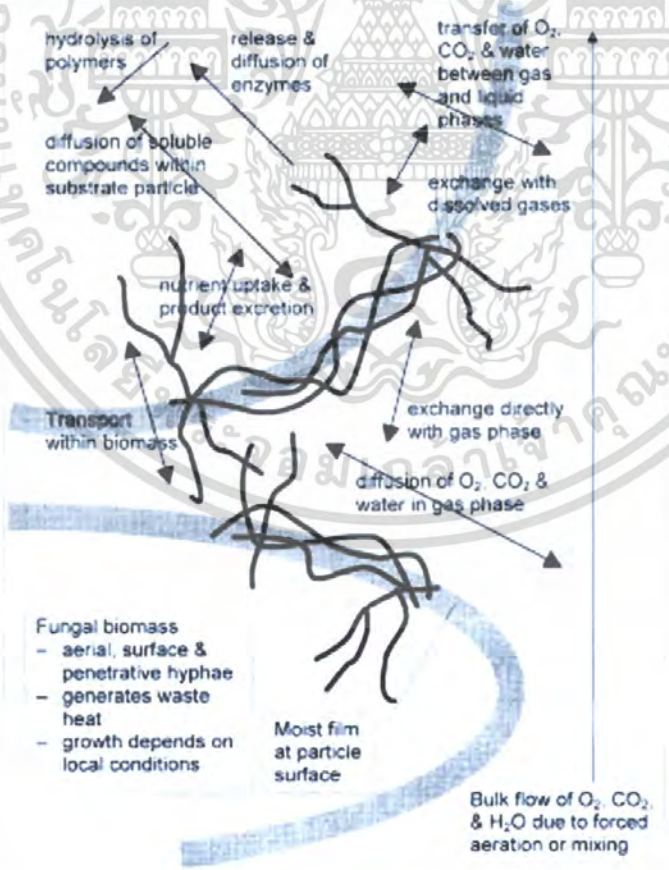
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น SSF จึงเป็นวิธีการหมักแบบดั้งเดิมมีขั้นตอนการผลิตง่าย ความชื้นต่ำจึงป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียสภาวะที่ใช้ในการเจริญของเชื้อมีลักษณะคล้ายกับที่อยู่ในธรรมชาติจึงทำให้เชื้อใช้เวลาในการปรับตัวสั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้เร็ว ให้ผลผลิตสูง ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรงทำให้ประหยัดพลังงานและลดปัญหามลพิษ และเป็นวิธีการที่เหมาะกับการผลิตเอนไซม์ขนาดเล็กเนื่องจากมีการลงทุนต่ำ แต่การหมักแบบนี้มีข้อจำกัด คือ ใช้ได้เฉพาะจุลินทรีย์บางชนิดที่เจริญได้ในที่ที่มีความชื้นต่ำ การควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช และความชื้น ทำได้ยาก (Hesseltine, 1987 ; Battaglino, 1991) ตัวอย่างของการผลิตโปรติเอสโดยใช้การหมักบนอาหารแข็ง เช่น Battaglino และคณะ (1991) ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตโปรติเอสใน *A. oryzae* NRRL 2160 บนอาหารแข็ง พบว่า ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารมีผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอส โดยราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 7,000 U/g substrate เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย รำข้าวและถั่วในอัตราส่วน 7:3 ที่พีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 ค่าความชื้นเริ่มต้น 35-40% และ ค่า water activity อยู่ในช่วง 0.982-0.986 สำหรับการผลิตโปรติเอสใน *A. oryzae* CFTRI (Padmanabhan, 1993) บนอาหารแข็ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ราสามารถผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น คือค่าความชื้นเริ่มต้น 60% อายุเซลล์เริ่มต้น 6 วัน และจำนวนเชื้อเริ่มต้น 8 ml conidial suspension/10 g sieved wheat bran ($1x10^8$ conidia/ml) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 191,869 U/g dry moludy bran

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

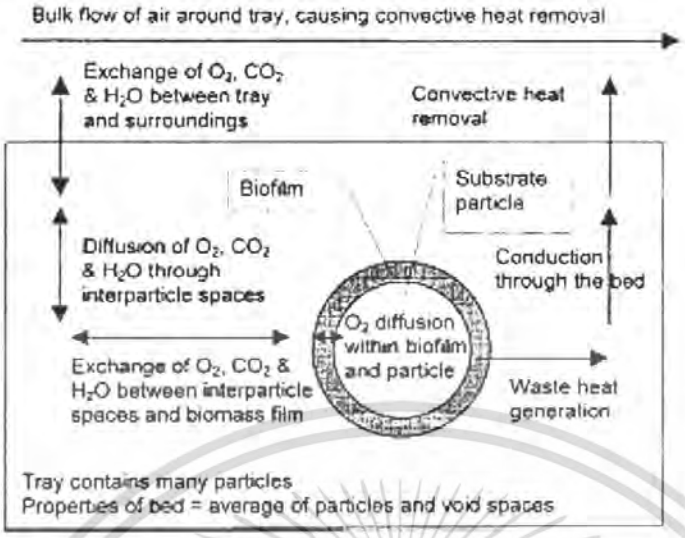


รูปที่ 8 แสดงกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักในกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อรา (Holker และ Lenz., 2005)

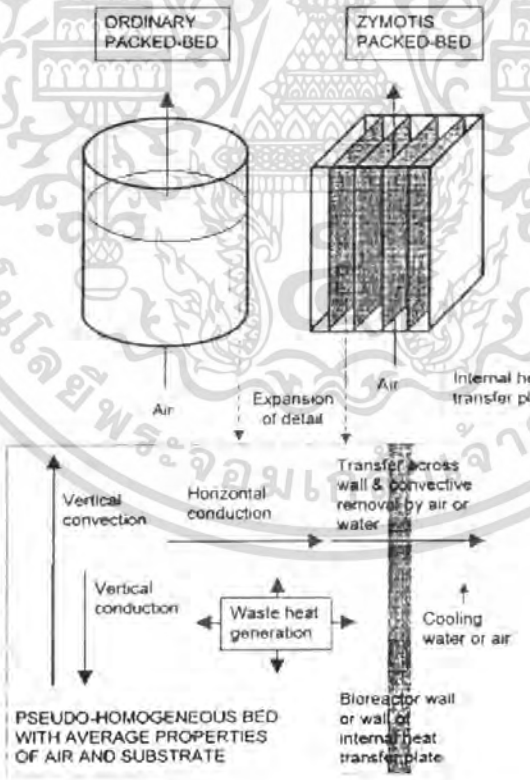


รูปที่ 9 แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักแบบ SSF โดยใช้เชื้อรา (Mitchell และคณะ, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

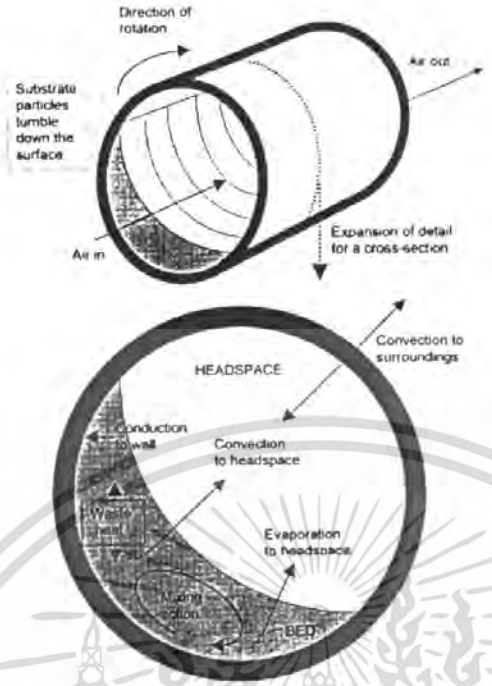


รูปที่ 10 แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักชนิดถาด (Mitchell และคณะ, 2000)

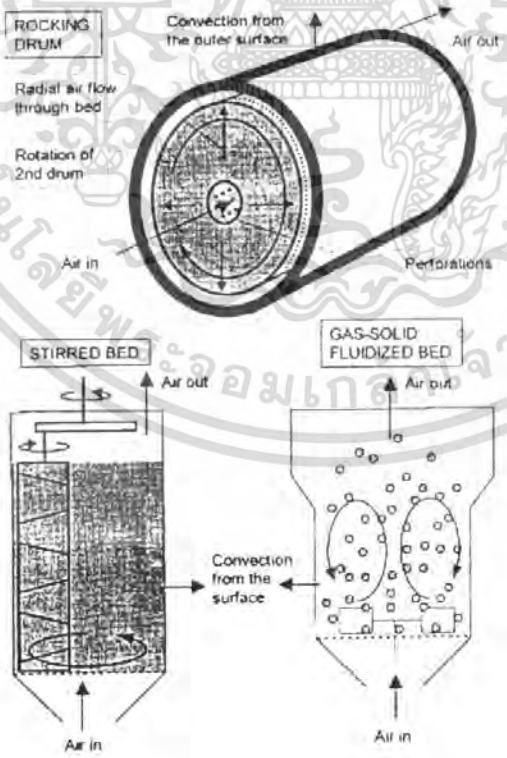


รูปที่ 11 แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ packed bed (Mitchell et al., 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ rotating drum (Mitchell และคณะ, 2000)



รูปที่ 13 แสดงการถ่ายเทมวลสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ SSF โดยใช้ถังหมักแบบ Rocking drum, Stirred bed และ Gas-solid fluidized bed (Mitchell และคณะ, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

แบ่งการวิเคราะห์ตามชนิดของสับสเทรต ดังนี้

2.6.1 โปรตีนเป็นสับสเทรต มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ

2.6.1.1 ประเมินจากผลผลิตของการทำปฏิกิริยา

เป็นปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ เช่น Trichloroacetic acid (TCA) perchloric acid เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้แก่ เคซีน ฮีโมโกลบินที่ผ่านการบำบัดโดยกรดหรือยูเรีย (acid- or urea-denatured hemoglobin) วัดปริมาณ TCA-soluble peptides คือส่วนของ aromatic compound ที่ OD_{280} แล้วประเมินค่าด้วยไทโรซีน (tyrosin) ในสารปฏิกิริยา ปริมาณของไทโรซินจะผันตามแอคติวิตีของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกถึงจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์

2.6.1.2 ประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์

ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ที่เป็นผลผลิต จะแปรผันตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนอิสระจะทำปฏิกิริยากับ ninhydrin reagent ให้สีที่ OD_{570} เทียบค่าดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของ leucine

2.6.2 สับสเทรตสังเคราะห์ ได้แก่ สับสเทรตที่มีพันธะ ester, amide, peptide ในตำแหน่งพันธะเปปไทด์เดิม ใช้เพื่อพิจารณาความจำเพาะและกลไกทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

2.6.2.1 ใช้สับสเทรตเป็น nitrophenyl ester ซึ่งเป็น chromogenic substrate สามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยวัด OD_{400} ถ้า pH > 7 และวัด OD_{340} ถ้าวัด pH < 7

2.6.2.2 ใช้สับสเทรตพวก ester เช่น alpha-N-benzoyl-L-arginine ethyl ester หรือ amide ทำให้ผลผลิตเป็นหมู่คาร์บอกซิลที่สามารถติดตามปฏิกิริยาได้ที่ OD_{253}

2.7 การเก็บรักษาเชื้อรา (Preservation of Fungi) (สมบูรณ์, 2544)

การเก็บรักษาเชื้อรานั้นจะได้รับผลดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมตามระยะเวลาที่กำหนด ถึงแม้ว่าเชื้อแต่ละชนิดจะมีความต้องการอาหารแตกต่างกัน แต่เชื้อราในสกุลหรือชนิดเดียวกันสามารถเจริญได้ดีในอาหารอย่างเดียวกัน สิ่งที่มีผลต่อการเจริญจึงได้แก่ อาหารหรือสารอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณน้ำอิสระ (A_w) อุณหภูมิ แสง และอากาศ (เชื้อราส่วนใหญ่ต้องการอากาศจึงต้องให้อากาศอย่างเพียงพอ)

2.7.1 วิธีการเก็บรักษา (Preservation methods)

เชื้อราที่เจริญดีสามารถเก็บรักษาได้หลายปีโดยเลี้ยงบนอาหารในสภาวะที่เหมาะสมแล้วถ่ายไปยังอาหารใหม่ก่อนที่อาหารจะแห้งหรือหมดไป สิ่งเหล่านี้ต้องอาศัยความรู้ในการดูแล ต้องตรวจสอบว่าควรต่อเชื้อในช่วงเวลาที่เหมาะสมไหม และต้องไม่มีเชื้ออื่นปะปนและเกิดการกลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ของเชื้อเริ่มแรก การต่อเชื้อแต่ละครั้งมีความเสี่ยงและเสียเวลา ดังนั้นควรมีงานอื่นทำระหว่างที่ว่างจากการต่อเชื้อ

2.7.1.1 การเก็บรักษาโดยการเจริญแบบต่อเนื่อง (Continuous growth)

1. การต่อเชื้อบ่อย (frequent transfer) ต่อเชื้อจากอาหารหนึ่งไปยังอาหารใหม่ ให้เชื้อเจริญในภาวะเหมาะสม เมื่อเจริญหรือสร้างสปอร์แล้วเก็บรักษาไว้จนถึงเวลาต่อเชื้อใหม่ ควรเลี้ยงเชื้อบนวุ้นผิวเอียงภายในหลอดหรือขวด การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องหากต้องการเก็บช่วงสั้น การรอดชีวิตและช่วงเวลาการต่อเชื้อใหม่จะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อรา อย่างไรก็ตามควรต่อเชื้อทุก 2-6 เดือน อย่างไรก็ตามการต่อเชื้อบ่อยๆ อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ สูญเสียความเป็นเชื้อโรคหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป เกิดปะปนโดยสปอร์จากอากาศหรือตัวไรเข้าไป ต้องมีผู้เชี่ยวชาญที่สามารถบอกได้ว่าเชื้อนั้นมีเชื้ออื่นปะปนหรือไม่ จึงต้องใช้แรงงานมากและเสียเวลา แต่การเก็บรักษาวิธีนี้สามารถเก็บได้นานพอควร ประหยัดค่าใช้จ่ายไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและทำได้ง่าย

2. การเก็บรักษาภายใต้น้ำมันแร่ (storage under mineral oil) การเทน้ำมันแร่ทับเชื้อที่เจริญบนผิววุ้นช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำ ช่วยลด metabolic activity และลดออกซิเจน ทำให้เชื้อเจริญน้อย หลังจากที่เชื้อเจริญเต็มที่แล้วปิดทับด้วยน้ำมันแร่สูง 1 เซนติเมตร (liquid paraffin หรือ medical paraffin) การทำให้น้ำมันปราศจากเชื้อนั้นทำได้ยาก แต่การให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที 2 ครั้ง ก็เพียงพอหากหลอดอาหารนั้นมีขนาดสั้นต้องใช้น้ำมันแร่ปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามสมควรเทให้ทั่ว เพราะเมื่อทิ้งไว้นานจะทำให้เส้นใยที่ไม่ถูกปิดทับนั้นแห้ง ควรเติมน้ำมันแร่เพียงครั้งเดียว เพราะขณะที่เติมจะทำให้สปอร์หลุดออกจากผิว ถ้าเติมหลาย ๆ ครั้งจะกระจายติดน้ำมันแร่ ควรเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า (15 องศาเซลเซียส) การนำเชื้อออกมาเลี้ยงใช้เข็มเขี่ยส่วนของเส้นใยนำไปเพาะลงบนอาหาร การเลี้ยงครั้งแรกอัตราการเจริญลดลงและปรากฏโคโลนีคล้ายเมือก การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้อาจเกิดปะปนโดยเชื้อจากอากาศ และเมื่อนำเชื้อออกมาเลี้ยงใหม่เชื้อจะเจริญช้า เชื้อบางชนิดอาจสูญเสียความสามารถในการสร้าง ascospores วิธี การนี้ไม่เหมาะสมต่อการเก็บเชื้อราที่ก่อโรคเพราะน้ำมันแร่ที่ใช้อาจเป็นอันตรายได้ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงและตัวไรไม่เข้าสู่เชื้อ บางเชื้อเก็บรักษาไว้ได้นาน

3. การเก็บรักษาในดิน (soil storage) เตรียมซัสเพนชันของสปอร์โดยใช้น้ำที่ปราศจากเชื้อ เติมซัสเพนชันลงในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปล่อยให้เจริญประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 2-3 วันสำหรับเชื้อที่เจริญอย่างรวดเร็ว แล้วเก็บรักษาไว้ภายในตู้เย็น 4-7 องศาเซลเซียส โดยไม่ปิดฝาแน่น การนำเชื้อออกมาเลี้ยงใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเม็ดดินที่มีเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม การเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นเชื้อจะมีชีวิตรอดได้ยาวนานและมีความคงตัว เช่น *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Penicillium วิธีการนี้ก็ใช้เก็บรักษาเชื้อ *Fusarium* ซึ่งเก็บไว้ไม่ได้ในน้ำมันแร่ วิธีการนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง ไม่ต้องใช้แรงงานมากและเชื้อจะไม่ปะปนด้วยตัวไร

4. การเก็บเชื้อไว้ในน้ำ (water storage) เป็นวิธีการง่ายๆ และราคาถูก ทำโดยตัดชิ้นวุ้นจากโคโลนีนำไปวางลงในน้ำที่ปราศจากเชื้อภายในขวด McCartney เก็บรักษาไว้ในห้องเย็น (15 องศาเซลเซียส) วิธีการนี้ใช้เก็บรักษาเชื้อโรคพืชในกลุ่ม Phycomycetes และ Ascomycetes การนำเชื้อออกมาเลี้ยงทำโดยนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อวางลงบนอาหารที่เหมาะสม

2.7.1.2 การเก็บรักษาโดยการทำแห้งและเก็บรักษาเชื้อโดยชักนำให้พักตัว (Induced dormancy)

สปอร์ของเชื้อราหลายชนิดคล้ายกับเมล็ดพันธุ์ดอกไม้ รอดชีวิตได้แม้จะมีสภาพแห้ง เชื้อจะเจริญขึ้นอีกเพียงแต่ได้รับความชื้น จึงมักพบเชื้อพักตัวในฝุ่นระหว่างที่ปลิวสู่อากาศ ดิน และสิ่งอื่นๆ ราหลายชนิดมีผนังสปอร์หนารอดชีวิตได้ในภาวะแห้ง จึงสามารถเก็บรักษาได้ การกระตุ้นให้พักตัวโดยอุณหภูมิต่ำและการแช่เยือกแข็งจะช่วยลด metabolic ของเชื้อ

5. การเก็บรักษาในซิลิกาเจล (silica gel storage) วิธีการนี้ใช้เก็บรักษาเชื้อราที่สร้างสปอร์ได้นานมากกว่า 11 ปี โดยใช้ซัสเพนชันของสปอร์เติมลงในซิลิกาเจลที่เย็น ปล่อยให้แห้งที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน จนเห็นเม็ดซิลิกาแยกจากกัน ปิดขวดให้แน่นและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสหรือที่อุณหภูมิห้องภายในภาชนะปิดซึ่งอากาศเข้าไม่ถึง ซึ่งเชื้อราหลายชนิดที่สร้างสปอร์รอดชีวิตด้วยวิธีการนี้ เชื้อที่สปอร์มีผิวบาง หรือสปอร์มีรยางค์ และเชื้อราที่มีเฉพาะเส้นใยจะไม่มีชีวิตรอด เทคนิคนี้พบว่าใช้เก็บได้ปานกลาง เมื่อไม่สามารถเก็บเชื้อได้โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แม้จะเก็บเชื้อได้ไม่นานนัก แต่ก็เป็นวิธีง่ายๆ และราคาถูก เชื้อไม่เปลี่ยนแปลงและตัวไรเข้าไม่ได้

6. การเก็บรักษาเชื้อในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen storage) การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำมาก (-196 องศาเซลเซียส) ภายในไนโตรเจนเหลว ปัจจุบันนิยมใช้ทั่วไป เชื้อจะอยู่ในสภาพพักตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype และ genotype ทำให้ปลอดภัย พอสมควร ใช้เก็บเชื้อราที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ แต่ใช้ไม่ได้กลับเชื้อบางกลุ่มเท่านั้น การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้เก็บเชื้อได้นาน ไม่เกิดการปะปนของเชื้ออื่นเก็บได้ทั้งเชื้อที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ แต่อุปกรณ์ที่ใช้ราคาแพง การใช้ไนโตรเจนเหลวอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เชื้อในกลุ่ม Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomyces, Hyphomycetes และ Coelomycetes มีอัตรารอดชีวิตได้สูง หลังจากเยือกแข็งและเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ เชื้อกลุ่ม Mastigomycotina ได้ผลไม่ดีเพราะเจริญไม่ดี ดังนั้นควรปรับปรุงวิธีการเก็บรักษา

7. การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) การเก็บรักษาเชื้อราด้วยวิธีนี้พบว่าได้ผลดี เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ระยะยาวและไม่มีปัญหา บางเชื้อรอดชีวิตหลังจากเก็บไว้ถึง 35 ปี เชื้อที่ใช้ทำให้แห้งแบบเยือกแข็งโดยทั่วไปควรเจริญดีและสร้างสปอร์ ควรเลือก suspending medium เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันเชื้อระหว่างกระบวนการและให้สะดวกหรือง่ายต่อการใส่ลงในหลอดหรือขวด สารนี้ต้องช่วยป้องกันสปอร์จากการถูกทำลายขณะเยือกแข็ง และป้องกันออกซิเดชันระหว่างการเก็บรักษา มักใช้ skim milk ซีรัม เปปโตน น้ำตาลหลายชนิด หรือส่วนผสมของสารดังกล่าว น้ำตาลบางชนิดมีปัญหาเมื่ออยู่รวมกับสารอื่นขณะทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง สำหรับเชื้อราควรทำให้เยือกแข็งอย่างช้าๆ อุณหภูมิลดลง 1 องศาเซลเซียสต่อนาทีเป็นอัตราปกติที่ดีที่สุด การทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยการหมุนเหวี่ยง เชื้อจะเยือกแข็งพร้อมการระเหยของน้ำภายใต้ระบบสูญญากาศ ซึ่งอัตราความเย็นจะพอเหมาะแต่กลไกที่เกิดขึ้นอาจเป็นอันตรายต่อเชื้อ

การทำแห้งแบบเยือกแข็งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำลาย DNA ควรให้มีความชื้นเหลืออยู่ 1-2 % การเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งแล้วไม่ควรมีอากาศและไอน้ำอยู่ภายในหลอดเชื้อนั้น ให้ปิดหลอดหรือขวดโดยหลอมด้วยเปลวไฟ ขณะที่ดูดอากาศออกไปการเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยยืดอายุได้ พบว่าที่ 4 องศาเซลเซียสนั้นเหมาะสม หรืออาจเก็บไว้ที่ 15-20 องศาเซลเซียส เชื้อจะรอดชีวิตมากกว่า 15 ปี การนำเชื้อออกมาเลี้ยงหลังจากเก็บรักษาไว้นาน ควรให้เชื้อสัมผัสความชื้นอย่างช้าๆก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม สำหรับเชื้อที่มีความไวต่อสภาวะแวดล้อมสูงต้องควบคุมภาวะให้เหมาะสมการนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยงและตรวจสอบการรอดชีวิตต้องทำอย่างสม่ำเสมอหากเก็บเชื้อไว้เป็นระยะเวลานาน

ผลดีของการทำแห้งแบบเยือกแข็ง คือ ป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น ทำให้รอดชีวิตได้ยาวนาน เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในสภาพคงที่ (stable) แต่บางเชื้ออาจไม่รอดชีวิตด้วยวิธีการนี้ จึงไม่เหมาะต่อการเก็บเชื้อที่ใช้เป็น starter อาจเกิดอันตรายต่อยีน ถึงแม้จะมีอัตราการรอดชีวิตสูง ขั้นตอนซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายสูง เหมาะสมเฉพาะเชื้อที่สร้างสปอร์เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อราที่แยกได้จากถั่วเน่า ที่เก็บรักษาไว้ในอาหาร PDA และ acidified PDA

3.1.2 Micropipette และ Tip ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร

3.1.3 Appendorf tube

3.1.4 หลอดหยด (Dropper)

3.1.5 ตะแกรงใส่หลอด (Rack)

3.1.6 สไลด์ (Slide)

3.1.7 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loops)

3.1.8 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.1.9 ตะขอเขี่ยเชื้อ (Hook)

3.1 10 ช้อนตักสาร

3.1.11 กระดาษฟอยล์

3.1.12 ขวดเตรียมอาหาร

3.1.13 แท่งแก้วคนสาร

3.1.14 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50, 100 และ 5000 มิลลิลิตร

3.1.15 กระบอกตวง ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.16 บีกเกอร์แก้ว ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.17 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร

3.1.18 จานเพาะเชื้อ (Plate)

3.1.19 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.1.20 หลอดทดลอง

3.1.21 หลอด Ampoule

3.1.22 พาสเจอร์ปิเปต

3.1.23 ตะกร้า

3.1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.25 ผ้าขาวบาง

3.1.26 สำลี

3.1.27 กรวยกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.28 ขวดสีชา

3.1.29 ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 20 mesh

3.1.30 ที่เจาะรู (Cock borer) เบอร์ 0 และ เบอร์ 5

3.1.31 หลอดย่อยและกลั่นโปรตีน

3.1.32 บิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.33 Glasses beads

3.1.34 รำข้าวสาลี (Wheat bran) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน)

3.1.35 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออก (Defatted soybean cake) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) (HIRAYAMA HA-300 M IV)

3.2.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (WIT binder)

3.2.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (EUTECT instruments)

3.2.4 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) (JULABO)

3.2.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (CLIFTON unstirred bath)

3.2.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (HERMLE Z 383 K)

3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดขนาดเล็ก(Microcentrifuge)(NATIONAL LABNET spectrafuge 16 M)

3.2.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (SHIMADZU UV -1607)

3.2.9 ชุดเครื่องย่อยสลาย (Digestion apparatus) (VELP sciencetifica DK 20)

3.2.10 เครื่องกลั่นหาแอมโมเนีย (Ammonia distillation) (Gerhardt รุ่น Vapodest)

3.2.11 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

3.2.12 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS)

3.2.13 เครื่องชั่งละเอียด (SARTORIUS analytic)

3.2.14 ตู้บ่มเชื้อ (MEMMERT)

3.2.15 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)

3.2.16 เครื่องไลโอฟิไลเซอร์ (Lyophilizer)

3.2.17 เตาไมโครเวฟ

3.2.18 ตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 Potato infusion

3.3.2 Agar

3.3.3 Alcohol 95%

3.3.4 Skim milk

3.3.5 Tartaric acid

3.3.6 ทวีน 80 (Tween-80)

3.3.7 Lactophenol cotton blue

3.3.8 Sodium azide (NaN_3)

3.3.9 Sodium chloride (NaCl)

3.3.10 Sodium hydroxide (NaOH)

3.3.11 Potassium sulfate (K_2SO_4)

3.3.12 Copper sulfate ($CuSO_4$)

3.3.13 Sulphanilamide azocasein MW 23.6 kDa

3.3.14 Trichloroacetic acid (TCA)

3.3.15 Citrate buffer

3.3.16 Citrate-Phosphate buffer

3.3.17 Phosphate buffer

3.3.18 สารละลายเคซีน 1 %

3.3.18 สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

3.3.20 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)

3.3.21 Phenylmethane sulfonylfluoride (PMSF)

3.3.22 L-3- Carboxytrans-2,3-epoxypropyl –leucylamido (4-guanidine) (E-64)

3.3.23 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI)

3.3.24 Pepstatin A

3.3.25 1,10-Phenanthrolene

3.3.26 Potassium permanganate ($KMnO_4$)

3.3.27 Sulfuric acid (CONC. H_2SO_4)

3.3.28 Boric acid ($B(OH)_3$)

3.3.29 Hydrochloric acid (HCl)

3.3.30 Pumic Stone

3.3.31 Indicator (Methyl red และ Methylene blue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อรา

ทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่า จากจังหวัดต่างๆในภาคเหนือดังต่อไปนี้ ตาก แม่ฮ่องสอน และเชียงราย ซึ่งถั่วเน่าที่นำมาแยกเชื้อจะใช้ถั่วเน่าที่มีลักษณะทั้งแบบสดและแบบแห้ง (แคบ) แล้วทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้มาทำการคัดแยกเชื้อราตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. นำตัวอย่างที่ทำการเก็บไว้ในตู้เย็นมาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆจากนั้นนำมาวางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิด potato dextrose agar และ acidified potato dextrose agar (ภาคผนวก ก) โดยตรง (Direct plating method) (สุรีย์, 2549)
2. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน จากนั้นทำการตรวจผล
3. ทำการแยกเชื้อราที่ขึ้นบน potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar โดยการตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราวางลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารชนิดเดียวกัน
4. ทำการแยกเชื้อราที่ได้โดยการ streak plate จนกระทั่งได้เชื้อที่บริสุทธิ์
5. สังเกตลักษณะสีของเชื้อราที่เจริญบน potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar และสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อระบุสกุลของเชื้อราตามวิธีของ Pitt และ Hocking (1997) และ Samson และ Van Reenen-Hoekstra (1988)
6. ทำการถ่ายเชื้อที่บริสุทธิ์จากจานเพาะเลี้ยงที่ได้ทำการระบุสกุลเรียบร้อยแล้วลงบนอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเตรียมสารละลายสปอร์ (Germano และคณะ, 2003)

1. นำเชื้อราที่เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงชนิดเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลาประมาณ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส
2. เมื่อบ่มจนครบ 4 วัน เติมสารละลาย Tween-80 0.1% ลงไป และทำการขูดสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้มีปริมาณสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก จ)

3.4.3 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อราไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรดิเอสสูงที่สุด (Saran และคณะ, 2007)

1. นำสารละลายสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ 10^5สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (คนึงกานต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอัญชลี, 2543) หยดลงในจานอาหาร Skim milk agar (ภาคผนวก ก) ที่เจาะรูด้วย cock borer เบอร์ 0 เรียบร้อยแล้ว

2. บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. สังเกตการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา โดยดูจากขนาดของวงใส (clear zone)
4. คัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด (ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุด) เพื่อนำมาศึกษาต่อไป

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรต

การหาปริมาณโปรตีนของสับสเทรตชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted soybean cake) นั้นจะใช้วิธีค Kjeldahl (AOAC., 2000) (ภาคผนวก ข)

3.4.5 การทดสอบเพื่อหาชนิดของสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Germano และคณะ, 2003 และ Agrawal และคณะ, 2004 และ Sandhya และคณะ, 2005)

ในการศึกษาผลของสับสเทรตที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนั้นจะใช้สับสเทรด 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted soybean cake) (ภาคผนวก ซ) และสับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว อัตราส่วน 1:1 การทดลองทั้งหมดจะแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลีแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร)

ชุดการทดลองที่ 2 รำข้าวสาลีแบบละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร)

ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร)

ชุดการทดลองที่ 4 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร)

ชุดการทดลองที่ 5 สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร) อัตราส่วน 1:1

ชุดการทดลองที่ 6 สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร) อัตราส่วน 1:1

1. เตรียมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วและรำข้าวสาลี โดยนำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนที่มีขนาด 20 mesh ซึ่งอนุภาคที่ร่อนได้จะมี 2 ลักษณะ คือ หยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร) และละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร) จากนั้นนำไปอบ (ภาคผนวก ง) ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน นำสับสเทรตทั้ง 6 ชุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปรับความชื้นให้ได้ 55% (ภาคผนวกจ) โดยใช้ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ค) และธาตุอาหารรอง (Micronutrients) (ภาคผนวก ก)

2. ฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที
3. เติมสารละลายสปอร์ของเชื้อราไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดสองอันดับแรกลงไป 1 มิลลิลิตร (จำนวนสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
4. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (A_w) เริ่มต้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (ภาคผนวก ง) ทุกๆ 24 ชั่วโมง ควบคู่ไปด้วย

3.4.6 การสกัดเอนไซม์ (Germano และคณะ, 2003)

1. เติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1% ลงไปในฟลาสก์ที่มีเชื้อราเจริญบนสับสเทรตทั้ง 6 ชุดการทดลอง ที่บ่มไว้เป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์
2. ผสมให้เข้ากันโดยเข้าเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. กรองสารละลายผ่านผ้าขาวบาง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านสำลีในกรวยกรองอีกครั้งเพื่อกำจัดเศษวัสดุที่ไม่ต้องการออกให้หมด
4. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. เก็บส่วนใสที่ได้ซึ่งจะใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) และนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

(Germano และคณะ, 2003 และ Leighton และคณะ, 1973)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) นั้นจะใช้ Sulphanilamide azocasein เป็นสับสเทรต (ภาคผนวก ค) โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

1. เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Sulphanilamide azocasein ความเข้มข้น 1% ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ค) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาจะทำการหยุดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก(TCA) ความเข้มข้น 10% (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร
4. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด appendorf จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร โดยมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดควบคุม (Blank) ซึ่งทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) โดยหนึ่งหน่วยของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร (A_{440}) เปลี่ยนแปลงไปภายในเวลา 1 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ทดสอบ (ภาคผนวก จ)

3.4.8 การหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (คนึงกานต์ และ อัญชลี, 2543)

1. นำ Skim milk agar (ภาคผนวก ก) ที่ได้เตรียมไว้แล้วมาผสมกับ Inhibitor 7 ชนิด (ภาคผนวก ค) ดังนี้ PMSF, DCI, Pepstatin A, 1,10 – phenantroline, E-64, EDTA, $KMnO_4$ โดยปริมาตรของ Inhibitor ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับจำนวนของจานเพาะเชื้อ (จานละ 100 ไมโครลิตร) จากนั้นเท Skim milk agar ที่ผสมกับ Inhibitor ใส่จานเพาะเชื้อ โดยใส่จานละ 20 มิลลิลิตร จะได้ความหนาของ skim milk agar ที่เท่ากันทุกจาน
2. หยดสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการบ่มวันที่ 3 (72 ชั่วโมง) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในจานอาหาร Skim milk agar ที่เจาะรูด้วย cock borer เบอร์ 5 เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน
3. สังเกตการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยดูจากขนาดของวงใส (clear zone) เทียบกับชุดควบคุม แล้วคำนวณค่าที่ได้ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เพื่อหา Inhibitor ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด

3.4.9 การเก็บรักษาเชื้อราด้วยการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization หรือ Freeze dry) (คนึงกานต์, 2550)

1. นำเชื้อราที่เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียงชนิดเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง เป็นเวลาประมาณ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส
2. เตรียม Skim milk 15 % ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
3. เตรียมหลอด ampoule พิมพ์รหัสเชื้อ วันเดือนปี ลงบนกระดาษขนาดเล็ก บรรจุในหลอดและปิดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ
4. เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา โดยใช้ Skim milk 15 % ผสมกับเชื้อราในอาหารวุ้นเอียง potato dextrose agar (PDA) และ acidified potato dextrose agar หลอดละ 1 มิลลิลิตร และทำการขูดสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
5. ใช้พาสเจอร์ปิเปตที่อบแห้งแล้ว ดูดสารละลายสปอร์ของเชื้อราใส่ลงในหลอด ampoule 0.1 มิลลิลิตร แล้วอุดปลายหลอดด้วยสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำหลอด ampoule มาทำสารละลายสปอร์ของเชื้อราให้แข็งตัวก่อน โดยกลิ้งบนเอทานอล 95 % ที่เย็นจัด เป็นเวลาประมาณ 30 นาที โดยพยายามกลั้วสารละลายสปอร์ให้บางที่สุด ระวังอย่าให้เอทานอลเข้าไปในหลอด
7. หลังจากการแช่แข็งเซลล์แล้ว นำสำลีที่อุดปากหลอด ampoule ออก ก่อนนำมากำจัดความชื้นออกโดยอยู่ในรูปของไอภายใต้สุญญากาศ โดยเชื่อมต่อเข้ากับเครื่อง lyophilizer ประมาณ 1-2 ชั่วโมง
8. ทำการเชื่อมปิดปากหลอด ampoule ภายใต้สุญญากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน
9. นำหลอด ampoule ที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดแยกเชื้อรา

จากการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าจากที่ต่างๆ ในจังหวัดภาคเหนือ อาทิเช่น เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ และตาก แล้วนำมาคัดแยกเชื้อราตามวิธีการ (3.4.1) พบว่า มีเพียง 3 จังหวัดเท่านั้นที่สามารถคัดแยกเชื้อราได้ (เชียงราย แม่ฮ่องสอน ตาก) จากนั้นกำหนดไอโซเลตให้กับเชื้อบริสุทธิ์แต่ละชนิด และระบุชนิดของเชื้อรา ได้ผลดังแสดงตามตารางที่ 19 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทุกไอโซเลต ดังภาคผนวก ช

ตารางที่ 21 เชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากถั่วเน่าที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือ

หมายเลขไอโซเลต	ชนิดของถั่วเน่า	จังหวัด	อาหารที่ใช้เลี้ยง	ชนิดของเชื้อราที่ได้ระบุสกุลแล้ว
CH 1	แบบแคบ	เชียงราย	PDA	*Aspergillus* sp.
CH 2	แบบแคบ	เชียงราย	PDA	*Aspergillus* sp.
CH 3	แบบแคบ	เชียงราย	PDA	*Penicillium* sp.
CH 4	แบบแคบ	เชียงราย	PDA	*Aspergillus* sp.
CHA 1	แบบแคบ	เชียงราย	acidified PDA	*Streptomyces* sp.
CHA 2	แบบแคบ	เชียงราย	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
CHA 3	แบบแคบ	เชียงราย	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
MAA 1	แบบแคบ	แม่ฮ่องสอน	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
MAA 2	แบบแคบ	แม่ฮ่องสอน	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
MAA 3	แบบแคบ	แม่ฮ่องสอน	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
MAA 4	แบบแคบ	แม่ฮ่องสอน	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
MAA 5	แบบแคบ	แม่ฮ่องสอน	acidified PDA	*Aspergillus* sp.
TK 1	แบบแคบ	ตาก	PDA	*Aspergillus* sp.
TK 2	แบบแคบ	ตาก	PDA	*Aspergillus* sp.
TK 3	แบบแคบ	ตาก	PDA	*Aspergillus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

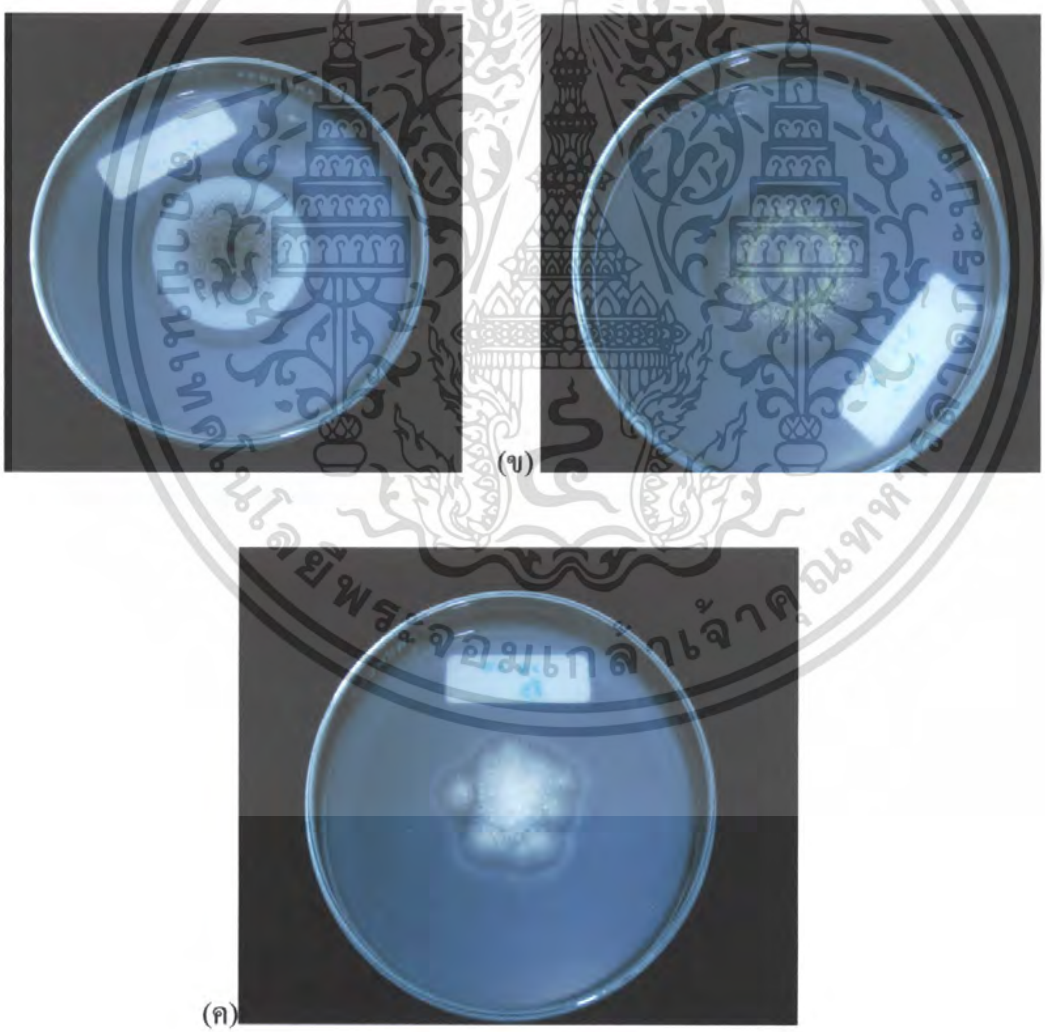
<u>หมายเหตุ</u> ตัวอักษร 2 ตัวแรกของหมายเลขไอโซเลต หมายถึง จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่าง มีดังนี้

CH = เชียงราย , MA = แม่ฮ่องสอน , TK = ตาก

ตัวอักษรตัวที่ 3 ของหมายเลขไอโซเลต หมายถึง อาหารที่ใช้เลี้ยง A = acidified PDA

4.2 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเชื้อรา ไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด (Saran และคณะ, 2007)

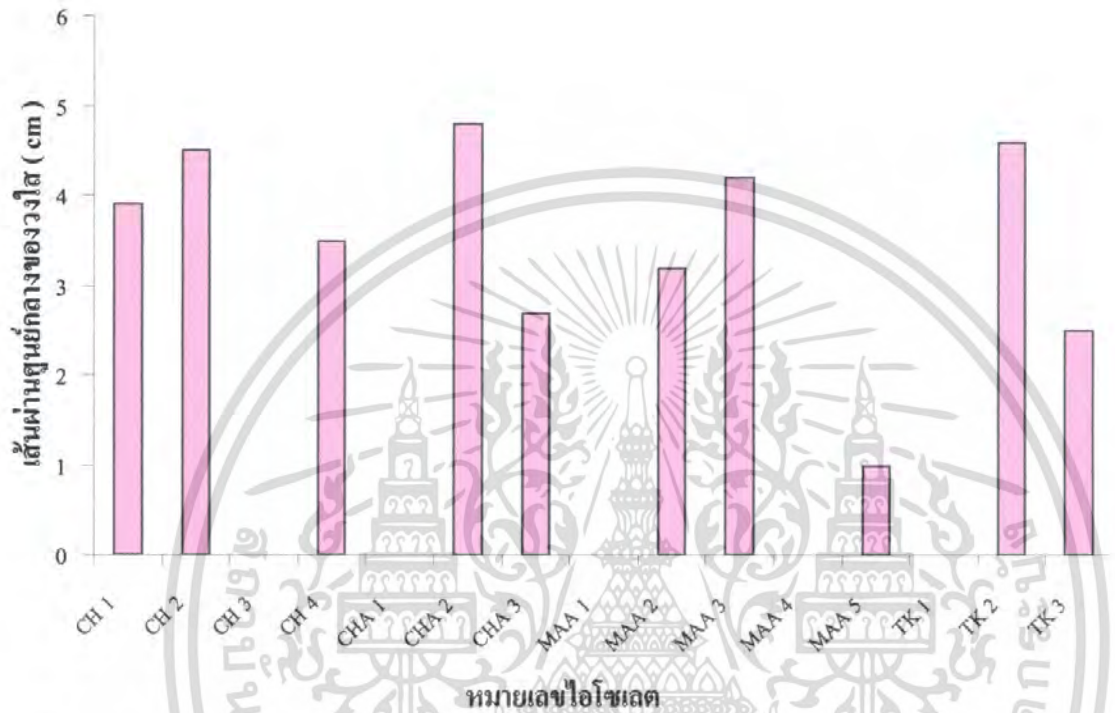
หลังจากหยดสารละลายสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงบน skim milk agar แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำไอโซเลตละ 2 ชุด แล้วนำมาวัดขนาดวงใส (3.4.3) แสดงผลดังรูปที่ 11 และ รูปที่ 12



รูปที่ 14 แสดงลักษณะวงใสของเชื้อราไอโซเลตต่างๆ ดังนี้

ก. CHA 2 ข. CH 2 ค. CHA 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสบน skim milk agar ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต

จากรูปที่ 11 และรูปที่ 12 จะเห็นว่า ไอโซเลต CHA 2 ให้ขนาดวงใสกว้างที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 4.8 เซนติเมตร เพราะฉะนั้นเชื้อราไอโซเลต CHA 2 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด รองลงมาคือเชื้อราไอโซเลต TK 2 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 4.6 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราไอโซเลต CH 3, CHA 1, MAA 1, MAA 4 และ TK 1 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส จึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรต

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่จะนำมาใช้เป็นสับสเทรต โดยวิธี Kjeldhal นั้น แสดงผลดังตารางที่ 20 พบว่า กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วนั้นมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูง คือ 39.45 % และรำข้าวสาลีมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 14.95 % เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด (ภาคผนวก ช) ในตอนแรกนั้นจะพบว่าผลปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่ได้จากการทดลองนั้นมีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่ากากถั่วเหลืองที่ได้รับมาในตอนแรก คือ 45.41% นั่นแสดงว่ามีการสูญเสียโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษาเกิดขึ้น

ตารางที่ 22 แสดงปริมาณโปรตีนของสับสเทรตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลตต่างๆ

ชนิดของสับสเทรต	เปอร์เซ็นต์โปรตีน	เฉลี่ย
รำข้าวสาลี	14.53	14.95
	15.37	
กากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว	39.63	39.45
	39.27	

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเทรตจะเห็นได้ว่ากากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้วมีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่ารำข้าวสาลีมากกว่า 2 เท่า ซึ่งปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ในสับสเทรตนั้นน่าจะมีผลในการชักนำการสร้างเอนไซม์โปรติเอสด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง (Agrawal และคณะ, 2004)

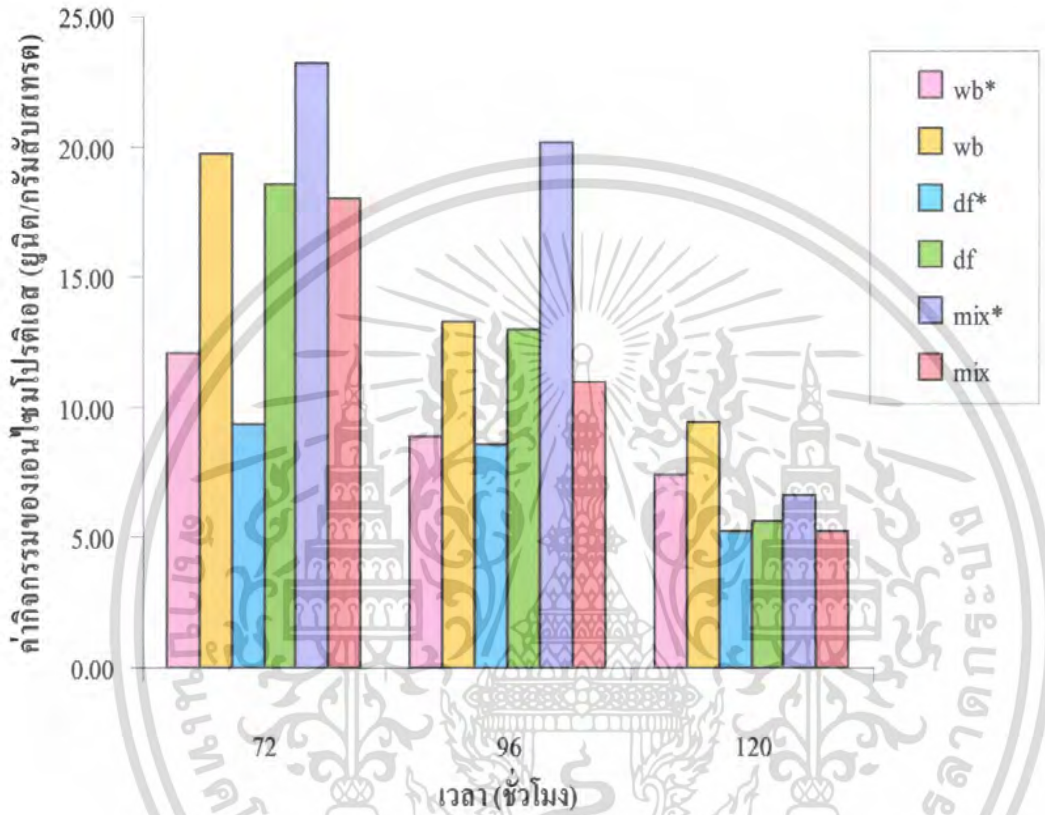
4.4 การทดสอบเพื่อหาชนิดของสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Germano และคณะ, 2003 และ Agrawal และคณะ, 2004 และ Sandhya และคณะ, 2005)

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ในสับสเทรตที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ รำข้าวสาลีแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร) กับแบบละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร) กับแบบละเอียด (ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร) และ สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (ขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร) กับแบบละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

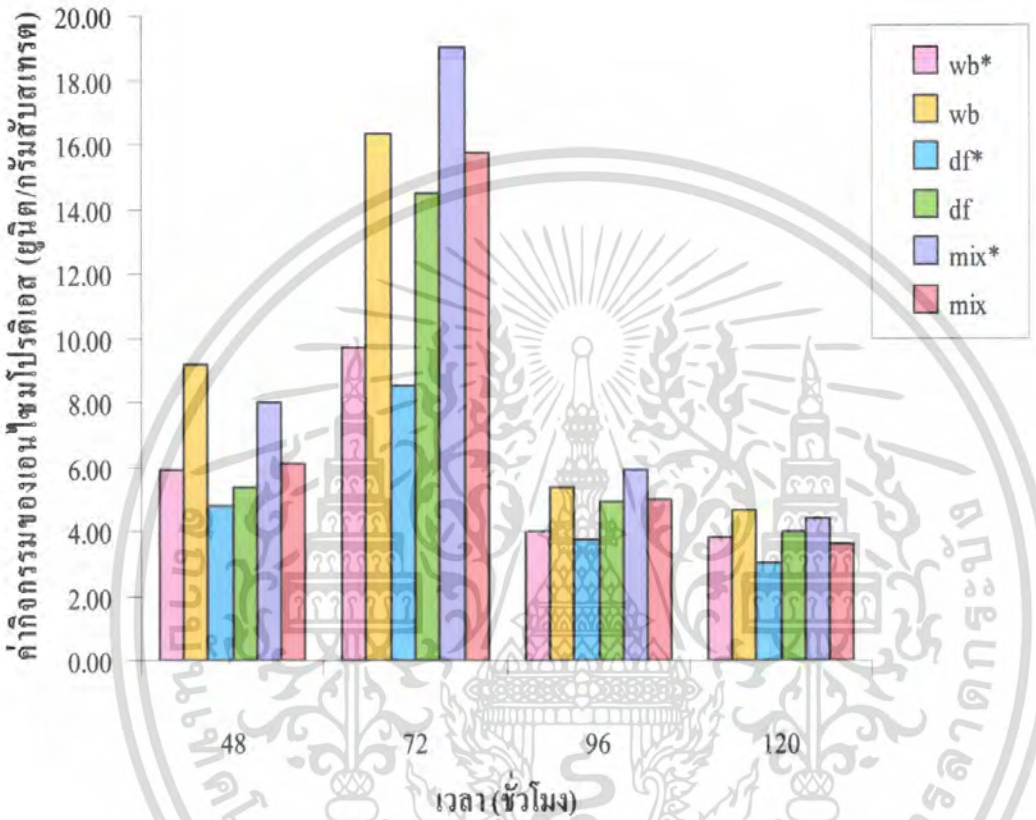
(ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 นั้นจะมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sandhya และคณะ (2005) และ Agrawal และคณะ (2004) ที่ได้ทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราซึ่งพบว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Penicillium* sp. จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงหลังการหมัก โดยเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในอาหารที่ใช้สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก โดยเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่ใช้สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียดให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 23.23 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต รองลงมาคือ รำข้าวสาลีแบบหยาบ กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ รำข้าวสาลีแบบละเอียด และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 19.70 18.60 18.07 12.10 และ 9.40 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต ตามลำดับ ส่วนในเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่ใช้สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียดให้กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสเท่ากับ 19.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต รองลงมาคือ รำข้าวสาลีแบบหยาบ รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ รำข้าวสาลีแบบละเอียด และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 16.33 15.73 14.47 9.70 และ 8.53 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต ตามลำดับ ดังรูปที่ 13 และ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต TK 2 โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

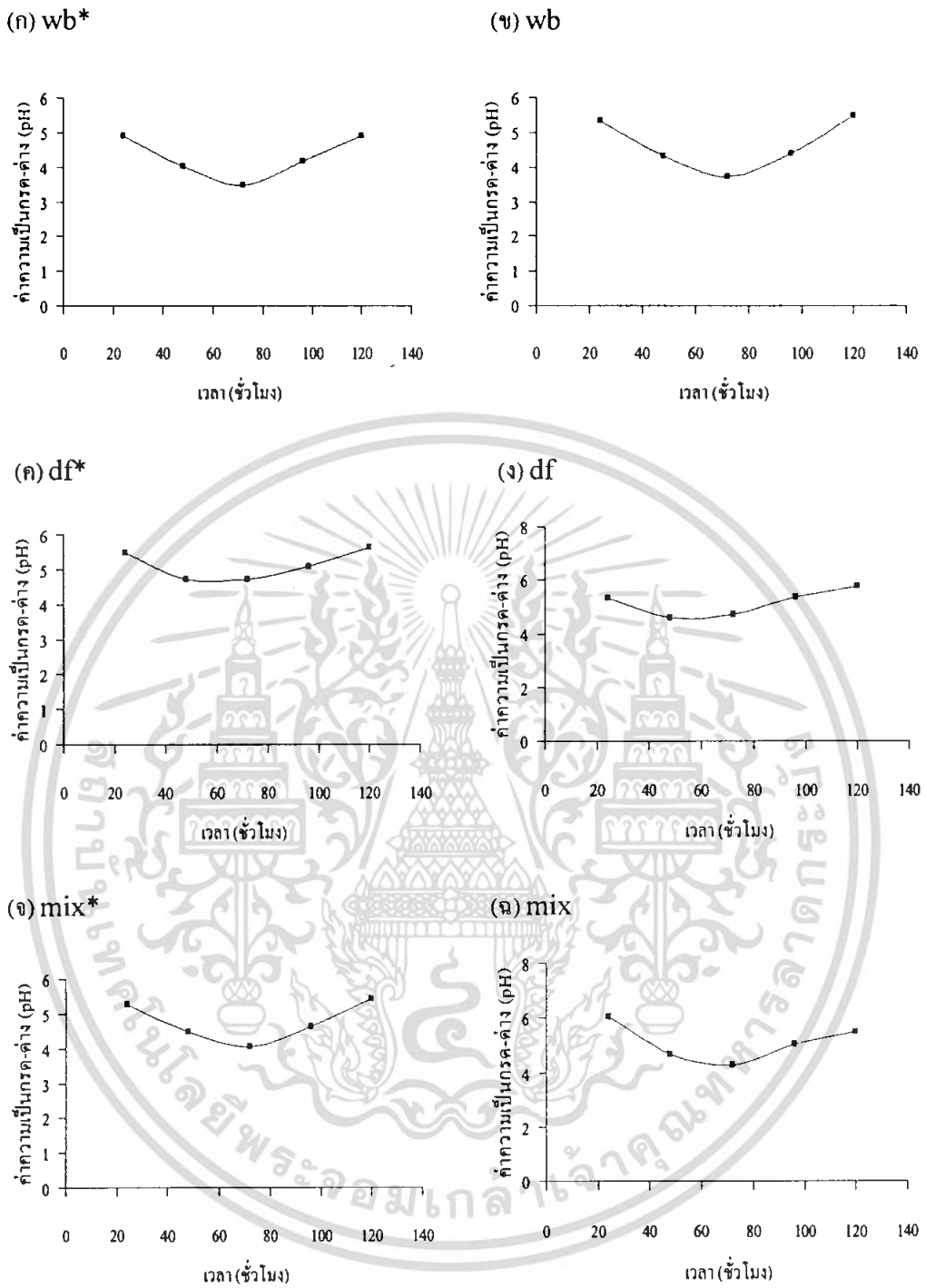
จากผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับการทดลอง Agrawal และคณะ (2004) ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราโดยการเลี้ยงแบบอาหารแข็งที่ใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเทรต เปรียบเทียบกับรำข้าวสาลีที่มีการเติมโปรตีนที่สกัดจากกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วพบว่า การใช้รำข้าวสาลีที่มีการเติมโปรตีนที่สกัดจากกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงกว่าการใช้รำข้าวสาลีเพียงอย่างเดียว โดยถ้าเติมโปรตีนที่สกัดจากกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อรำข้าวสาลี 1 กรัมจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าการใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเทรตอย่างเดียวมากกว่า 2 เท่า และการทดลองของ Oliveira และคณะ (2006) และของ Sandhya และคณะ (2005) ที่มีการใช้ผลพลอยได้จากเกษตรชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี แกลบข้าว รำข้าว กากเมล็ดธัญพืชที่ใช้ในการทำเบียร์ กากของเสียจากการทำน้ำมันมะพร้าว กากของเสียจากเมล็ดปาล์ม กากของเสียจากการทำน้ำมันงา ผงเมล็ดขนุน เปลือกมันสำปะหลัง ชานอ้อย ซังข้าวโพด แกนข้าวโพด เปลือกข้าวโอ๊ต และกากของเสียจากการทำน้ำมันมะกอก มาใช้เป็นสับสเทรตในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา ซึ่งพบว่า สับสเทรตส่วนใหญ่ที่ได้นั้นจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ต่ำ ยกเว้นรำข้าวสาลีที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าสับสเทรตชนิดอื่นๆ ถึง 2 เท่า ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากปริมาณของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสับสเทรตแต่ละชนิดนั้นจะพบว่า สับสเทรตแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมากในขณะที่รำข้าวสาลีกลับมีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่สูงกว่ามาก (Agrawal และคณะ, 2004) ดังนั้นปริมาณโปรตีนจึงน่าจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วย

ค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเทรตระหว่างการหมักที่ชั่วโมงต่างๆ ของเชื้อราทั้งสองไอโซเลตนั้นพบว่า ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-72 ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงและจะมีค่าต่ำสุดที่ชั่วโมงที่ 72 โดยเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่ใช้สับสเทรตรำข้าวสาลีแบบละเอียดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุด เท่ากับ 3.47 รองลงมาคือ รำข้าวสาลีแบบหยาบ รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด ซึ่งจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.72 4.05 4.27 4.70 และ 4.73 ตามลำดับ ส่วนในเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่ใช้สับสเทรตรำข้าวสาลีแบบละเอียดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดเท่ากับ 3.70 รองลงมาคือ รำข้าวสาลีแบบหยาบ รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ ซึ่งจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.07 4.57 4.68 4.87 และ 5.00 ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 72-120 ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าเชื้อราไอโซเลต TK 2 ดังรูปที่ 15 และ 16 ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Oliveira และคณะ (2006) ซึ่งได้ใช้ผลพลอยได้ทางการเกษตรชนิดต่างๆ มาใช้เป็นสับสเทรตในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา พบว่า ค่าความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

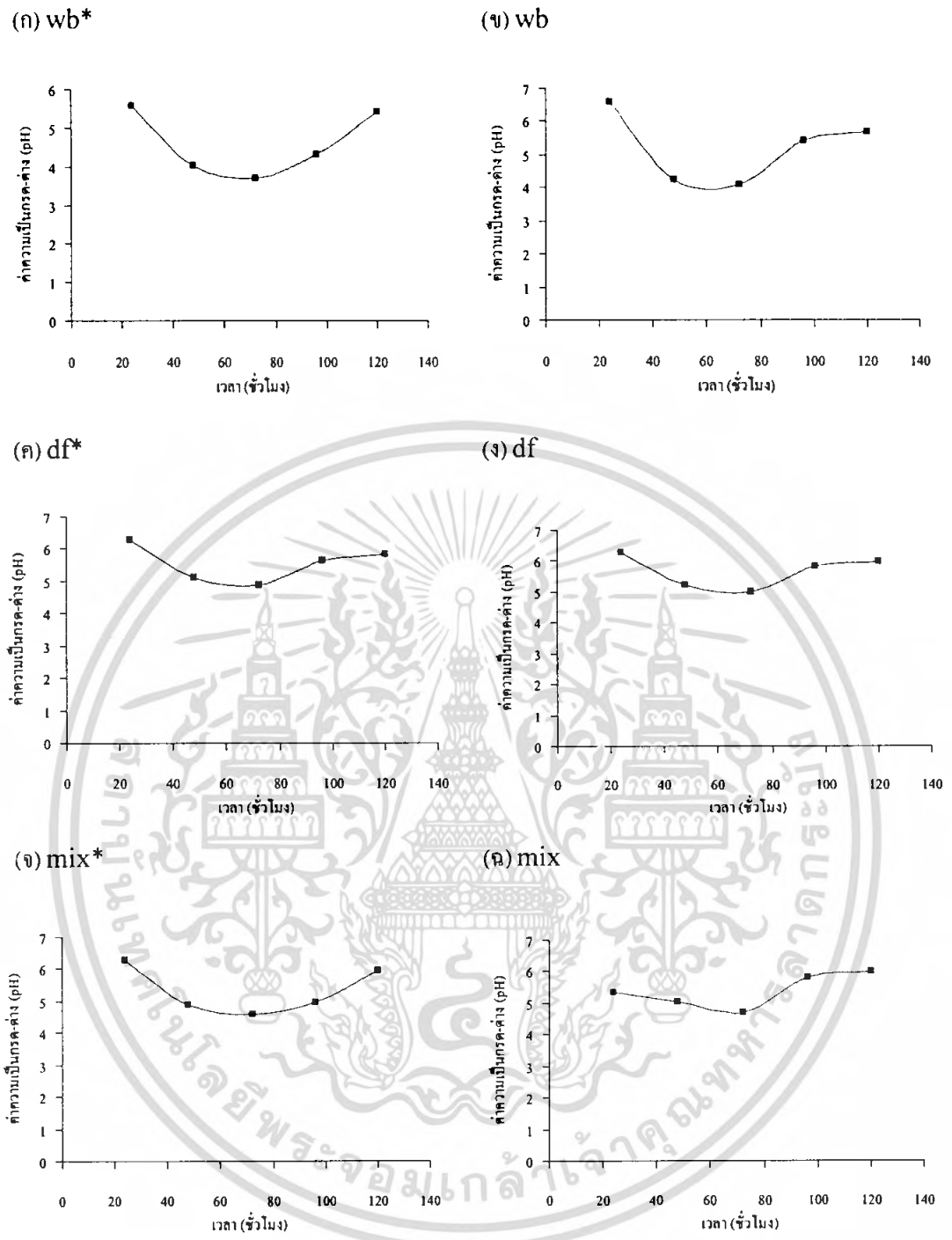
เป็นกรด-ด่างจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราและความสามารถในการผลิตกรดระหว่างการเจริญซึ่งจะส่งผลต่อประเภทของเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้น (North, 1982) อีกทั้งเชื้อราสามารถเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสภาพแวดล้อมได้เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญ โดยเชื้อราสามารถสร้างกรดขึ้นระหว่างการเจริญซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอีกด้วย (Deacon., 1997) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการที่เชื้อราใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งของไนโตรเจนซึ่งจะทำให้เกิดแอมโมเนียขึ้น ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นด้วย (Wang และ Hesseltine, 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับ-สเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

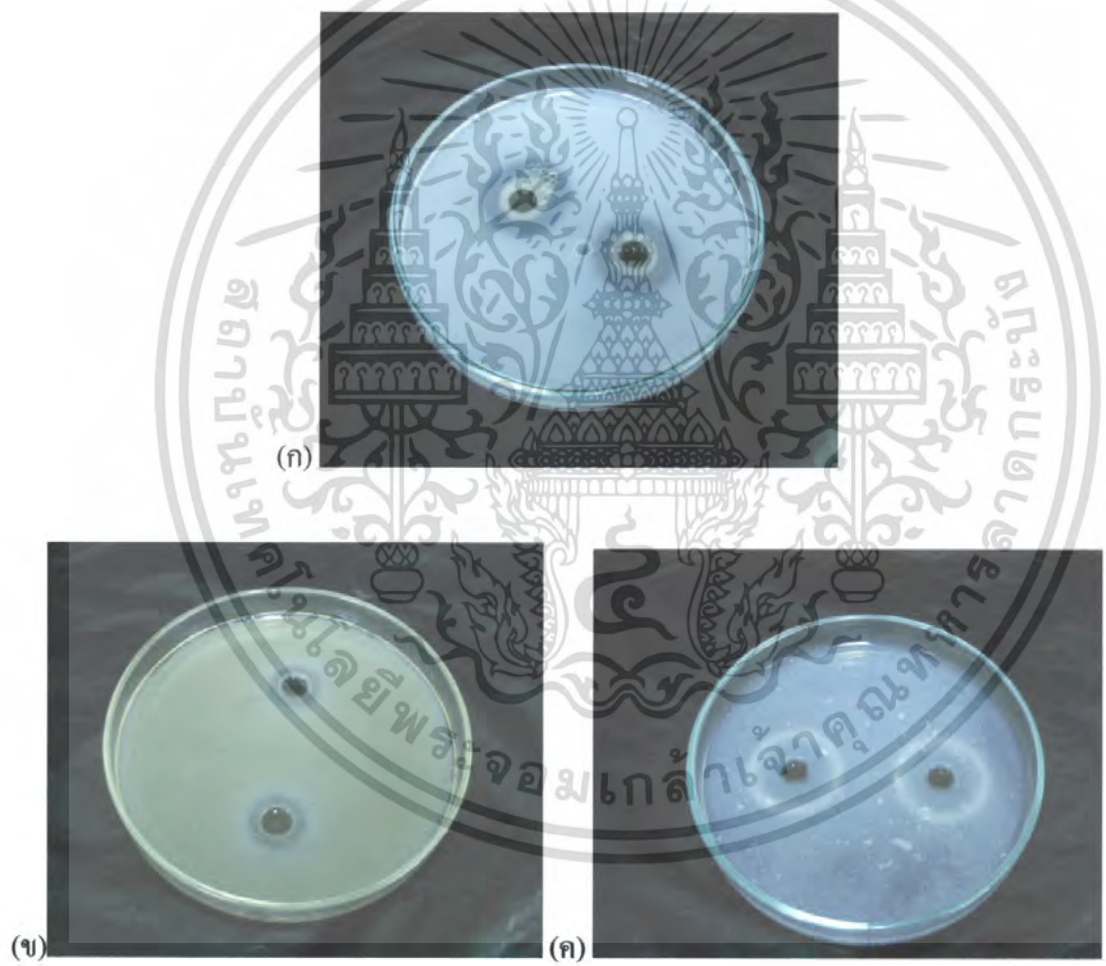


รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับ-สเทรตชนิดต่างๆของเชื้อราไอโซเลต TK 2 โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การหา Inhibitor ที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบื้องต้น

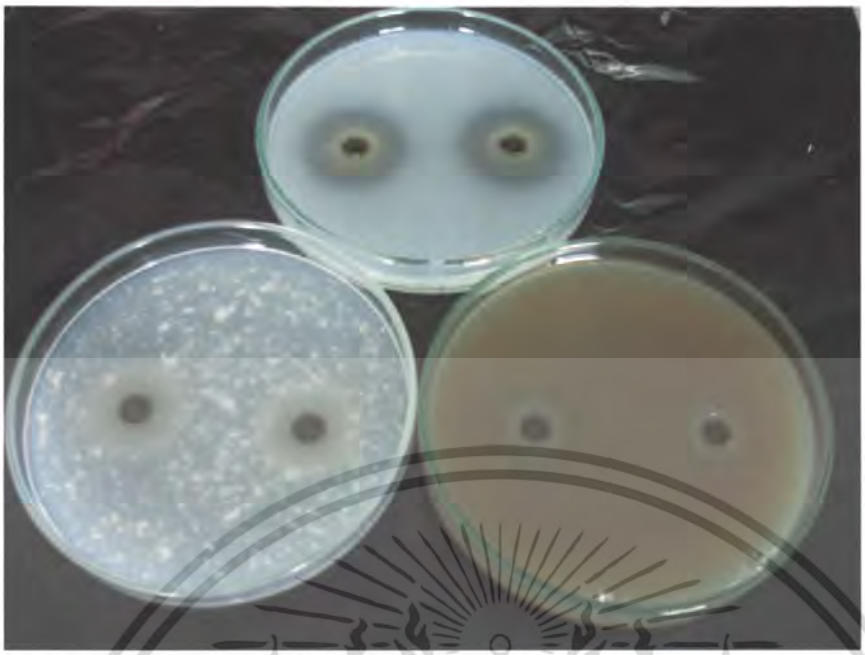
ผลการศึกษาตัวยับยั้งการทำงานเอนไซม์โดยใช้สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme extract : CEE) เติมลงในอาหาร skim milk agar ที่มีตัวยับยั้งชนิดต่างๆ คือ PMSF, DCI, O-phenanthrolene, E-64, Pepstatin A, EDTA และ $KMnO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และชุดควบคุม โดยหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่ได้เทียบกับชุดควบคุมพบว่า เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ถูกยับยั้งการทำงานจาก $KMnO_4$ มากที่สุด และเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดย $KMnO_4$ มากที่สุดเช่นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17 18 19 และ 20



รูปที่ 20 แสดงผลของตัวยับยั้งที่มีต่อสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2

ก. Control ข. Skim milk agar ผสม $KMnO_4$ ค. Skim milk agar ผสม EDTA

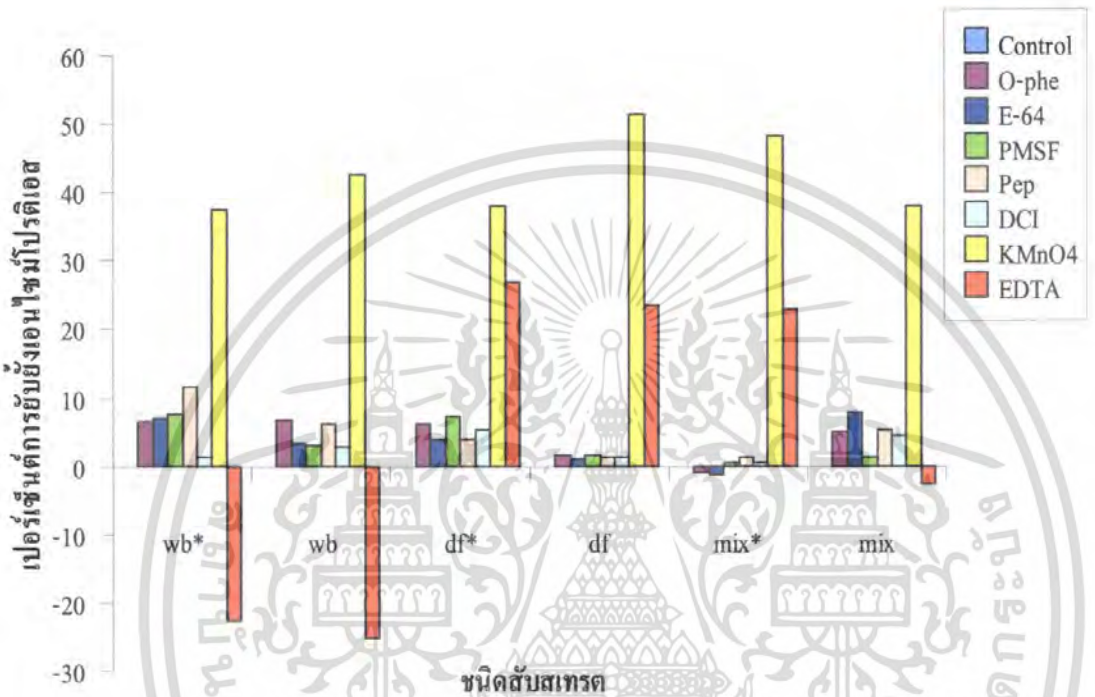
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 แสดงผลของตัวยับยั้งที่มีต่อสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2
รูปบน คือ Control รูปล่างซ้าย คือ Skim milk agar ผสม EDTA และ
รูปล่างขวา คือ Skim milk agar ผสม $KMnO_4$

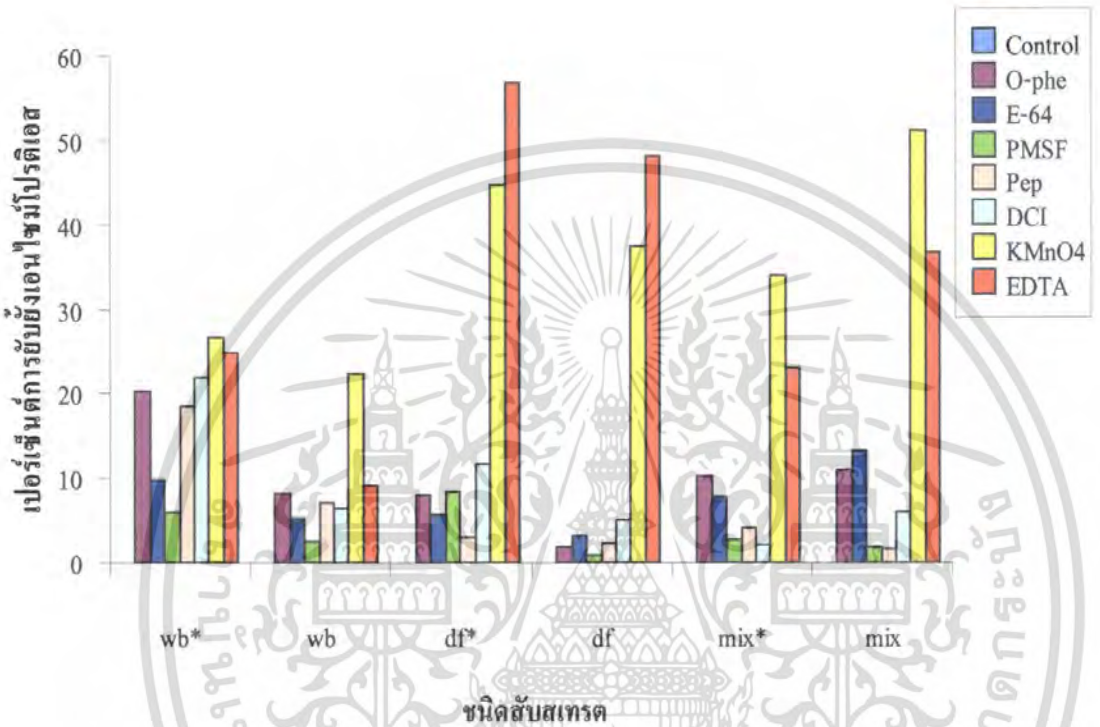
เมื่อพิจารณาจากผลของตัวยับยั้งที่มีผลต่อสารละลายเอนไซม์และค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเทรตที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งพบว่า มีความเป็นกรด ทำให้สามารถคาดได้ว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราทั้งสองไอโซเลตเป็นเอนไซม์โปรติเอสประเภทแอสปาร์ติกโปรติเอส หรือ แอซิดโปรติเอส โดยเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มแอสปาร์ติกโปรติเอสนั้นมีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.0 - 4.0 และสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ คือ Pepstatin A แต่ทั้งนี้เอนไซม์โปรติเอสประเภทแอสปาร์ติกโปรติเอสนั้นไม่ใช่ทุกชนิดที่จะถูกยับยั้งโดย Pepstatin A โดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา แต่เอนไซม์โปรติเอสประเภทแอสปาร์-ติกโปรติเอสจากเชื้อราจะมีความไวต่อไอโอดีน (I_2) และ $KMnO_4$ ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไทโรซีนและเอนไซม์โปรติเอสประเภทแอสปาร์ติกโปรติเอสจากเชื้อราที่สามารถสร้างได้นั้นมักจะถูกสร้างในสภาวะการเจริญของเชื้อราที่มีความเป็นกรดและเอนไซม์โปรติเอสประเภทแอสปาร์-ติกโปรติเอสนั้นจะไม่เสถียรในสภาวะที่เป็นด่าง ดังนั้นจึงไม่พบเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ในสภาวะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นกลาง-ด่าง (North, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 แสดงผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์) โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 23 แสดงผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่มีต่อเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต TK 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (เปอร์เซ็นต์) โดยสับสเทรตชนิดต่างๆ มีดังนี้ รำข้าวสาลีแบบละเอียด (wb*) รำข้าวสาลีแบบหยาบ (wb) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (df*) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (df) รำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด (mix*) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ (mix)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการคัดแยกเชื้อราจากอาหารประเภทถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) จากแหล่งต่างๆ โดยใช้อาหาร Potato dextrose agar และ Acidify potato dextrose agar นั้น สามารถทำการคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลตและแอคติโนมัยซีส 1 ไอโซเลต ซึ่งได้ทำการระบุไอโซเลตแก่เชื้อราและแอคติโนมัยซีสที่ทำการคัดแยกได้

2) จากนั้นนำเชื้อราและแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จำนวน 15 ไอโซเลตมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสบน skim milk agar ตามวิธีของ Saran และคณะ (2007) พบว่าไอโซเลต CHA 2 ให้ขนาดวงใสกว้างที่สุด คือ 4.8 เซนติเมตร และรองลงมาคือ ไอโซเลต TK 2 ให้ขนาดวงใส 4.6 เซนติเมตร

3) สำหรับการวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ที่ชั่วโมงต่างๆ ในสับสเทรตแต่ละชนิดเพื่อหาเวลาเหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์เพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไปนั้น พบว่าชั่วโมงที่ 72 เชื้อราทั้งสองไอโซเลตให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงที่สุด

4) ในการทดสอบการหาสับสเทรตที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ลงในสับสเทรตชนิดต่างๆ พบว่า ในชั่วโมงที่ 72 สับสเทรตผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตรในอัตราส่วน 1:1 เชื้อราทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุด โดยเมื่อตรวจกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ในชั่วโมงที่ 72 โดยวิธีของ Germano และคณะ มีค่าเท่ากับ 23.23 และ 19.03 ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต ตามลำดับ

5) จากการหาประเภทของเอนไซม์เบื้องต้นโดยดูจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากตัวยับยั้งชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อราหมายเลยไอโซเลต CHA 2 และ TK 2 ถูกยับยั้งการทำงานใน Skim milk agar ที่มี $KMnO_4$ 0.2 M และเมื่อพิจารณาร่วมกับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสับสเทรต ที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.47 - 5.00 ซึ่งเป็นสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นเมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากตัวยับยั้ง ทำให้สามารถบอกได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราทั้งสองไอโซเลตน่าจะเป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มแอสปาติกโปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งการทำเอนไซม์โปรติเอสให้บริสุทธิ์มากขึ้นนี้จะสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น และหากมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ความชื้นเริ่มต้น Moistening medium ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น และอัตราส่วนระหว่างรำข้าวสาลีกับกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมัน หรือชนิดของสารที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ รวมไปถึงหากมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ และความเสถียรของเอนไซม์ ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมต่อไปได้ ทั้งนี้เพื่อพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ดลอดจนการดัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้น รวมถึงความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง และสามารถทนสภาวะที่เป็นกรดได้ดี เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูง และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อน และกรดในกระบวนการผลิต

เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่ใช้สับสเทรตที่มีราคาถูกนั่นก็คือกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันถั่วเหลืองโดยนำมาใช้แทนรำข้าวสาลีบางส่วนซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง โดยสามารถให้เอนไซม์ในปริมาณที่มากกว่าการใช้รำข้าวสาลีเพียงอย่างเดียวอีกทั้งยังเป็นกระบวนการผลิตแบบใช้อาหารแข็งทำให้ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตน้อย สามารถทำได้ง่าย ให้ผลผลิตในปริมาณมาก และเกิดของเสียจากการผลิตน้อยกว่าแบบอาหารเหลว ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านต่างๆ เพราะใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถให้เอนไซม์ในปริมาณที่มากกว่าการผลิตแบบอาหารเหลวอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คนึงกานต์ กลั่นบุศย์. 2550. บทปฏิบัติการการเก็บรักษาพันธุ์สาหร่าย. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ และ อัญชลี อ่อนเจริญ. 2543. การศึกษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านในภาคเหนือ. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทวีสิริ มาลาพันธุ์. 2546. การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus usamii* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นวพร ล้ำเลิศกุล และ สุพจน์ บุญแรง. 2544. การปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่า : อาหารหมักพื้นบ้านภาคเหนือ. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร. 2543. การศึกษาถั่วหมักอาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ. วิทยาสาร. 36 : 1-8.

มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และ สุจิตรา ยนต์สิงห์. 2548. การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาวดี วิทยาอนุมาส. 2544. ผลของการเพิ่มชีวมวลของ *Aspergillus oryzae* U1521 ในอาหารเหลวต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2549. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2532. ข้าวสาลี : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ : กราฟฟิคแอนด์ปริ้นติ้งเซ็นเตอร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2542. ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 25-26.

Aasen, I.M., Møretrø, T., Katla, T. and Axelsson, L. 2000. Influence of complex nutrients, Temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 : 159-166.

Adachi, T., Murooka, Y. and Harada, T. 1975. Regulation of Arylsulfatase Synthesis by Sulfur Compounds in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 121 : 29-35.

Agger, T., Spohr, A.B. and Nielsen, J. 2001. α-amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55 : 81-84.

Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T. and Patil, S. 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 39: 977-981.

A.O.A.C, 1990. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

A.O.A.C, 1995. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington, D.C.: AOAC International.

A.O.A.C, 2000. Official Method of Analysis by the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Chandrashekar, A., and Kirleis, A.W., 1988. Influence of protein on starch

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture Requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35 : 292-296.

Bhattacharya, S.K. and Dubey, A.K. 1997. High-Level Expression of a Heterologous Gene in *Escherichia coli* in Response Carbon-Nitrogen Source and C/N Ratio in a Batch Bioreactor. *Biotechnology Progress*. 13 : 151-155.

Boguslawaki, G., Shultz, J.L. and Yehel, C.O. 1983. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Analytical Biochemistry*. 132 : 41-49.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Çalik, P., Çalik, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H. 1994. Metabolic Flux Analysis for Serine Alkaline Protease Fermentation by *Bacillus licheniformis* in Define Medium : Effects of the Oxygen Transfer Rate. *Biotechnology and Bioengineering*. 64 : 151-167.

Çalik, P., Çalik, G., Takaç, S. and Özdamar, T.H. 2000. Oxygen-Transfer Strategy and Its Regulation Effects in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 69 : 301-311.

Carlile, M.J. and Watkinson, S.C. 1996. The effect of the environment on growth. In Fungi. 3rd ed. San Diego : Academic Press.

Carlsen, M., Spohr, A.B., Nielsen, J. and Villadsen, J. 1996. Morphology and Physiology of an α-Amylase Producing Strain of *Aspergillus oryzae* during Batch Cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*. 49 : 266-276.

Cerbelaud, E.C., Conway, L.J., Galliher, P.M., Langer, R.S. and Cooney, C.L. 1986. Sulfur Regulation of Heparinase and Sulfatases in *Flavobacterium heparium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 51 : 640-646.

Cohen, B.L. 1972. Ammonium Repression of Extracellular Protease in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. 71 : 293-299.

Cohen, B.L. 1973. Regulation of Intracellular and Extracellular Neutral and Alkaline Proteases in *Aspergillus nidulan*. *Journal of General Microbiology*. 29 : 311-320.

Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M., Giuseppin, M.L.F. and Luyben, K.C.A.M. 1998. Influence of fermentation conditions and scale on submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. *Enzyme and Microbial Technology*. 23 : 157-167.

Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M., Giuseppin, M.L.F. and Luyben, K.C.A.M. 1998. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 55 : 715-726.

Deacon, J. 2006. Fungal biology. Australia : Blackwell publishing.

Deshpande, M.V. 1992. Proteinases in fengal morphogenesis. World Journal of Microbiology and Biotechnilogy. 8 : 242-250.

Domingues, F.C., Queiroz, J.A., Cabral, J.M.S. and Fonseca, L.P. 2000. The influence of culture condition on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 : 394-401.

Drucker, H. 1972. Regulation of Exocellular Proteases in *Neurospora crassa* : Induction and Repression of Enzyme Synthesis. *Journal of Bacteriology*. 110 : 1041-1049.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fairbairn, D.J. and Law, B.A. 1987. The effect of nitrogen and carbon sources on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*. 62 : 105-113.

Fogarty, M.W. 1994. Enzyme of genus *Aspergillus*. New York : Plenum Press.

Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T. and Motai, H. 1991. Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34 : 586-590.

Germano, S., Pandey, A., Osaku, C.A., Rocha, S.N. and Soccol, C.R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produce by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 : 246-251.

Hanson, M.A. and Marzluf, G.A. 1973. Regulation of a Sulfur-Controlled Protease in *Neurospora Crassa*. *Journal of Bacteriology*. 116 : 785-789.

Hesseltine, C.W. 1972. Solid-state fermentation. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 14 : 517-532.

Hesseltine, C.W. 1977. Solid state fermentation part 1. *Process Biochemistry*. 12 : 24-27.

Hesseltine, C.W. 1987. Solid state fermentation - an overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 23 : 79-89.

Hölker, U. and Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation – are they any biotechnological adventages?. *Current Opinion in Microbiology*. 8 : 301-306.

Janssen, P.H., Peek, K. and Morgan, H.M. 1994. Effect of culture condition on the production of an extracellular proteinase by *Thermus sp.* Rt41A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41 : 400-406.

Jarai, G. and Buxton, F. 1994. Nitrogen , carbon and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Current Genetic*. 26 : 238-244.

Jorge, J.A. and Terenzi, H.F. 1984. Carbon Source Regulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Glycohydrolase in *Neurospora crass* : Induction and Repression of Enzyme Synthesis. *Journal of General Microbiology*. 130 : 1563-1568.

Jožica, F., Cimerman, A. and Steiner, W. 1989. Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger* : effect of different aeration/agition regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31 : 490-494.

Leighton, T.J., Doi, R.H., Warren, R.A.J. and Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*. 76 : 103-122

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lejeune, R. and Baron, G.V. 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43 : 249-258.

Lindberg, R.A., Eirich, L.D., Price, J.S., Wolfinbarger, L., Jr. and Drucker, H. 1981. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. *Journal of Biology Chemistry*. 256 : 811-814.

Long, S., Mothibeli, M.A., Robb, F.T. and Woods, D.R. 1981. Regulation of Extracellular Alkaline Protease Activity by Histidine in a Collagenolytic *Vibrio alginolyticus* Strain. *Journal of General Microbiology*.127 : 193-199.

Marzluf, G.A. 1981. Regulation of Nitrogen Metabolism and Gene Expression in fungi. *Microbiological Review*. 45 : 437-461.

Marzluf, G.A. 1997. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61 : 17-32.

McLandsborough, L. 2005. Food microbiology laboratory. Boca Raton : CRC Press.

Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M. and Pandey, A. 2000. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scal-up of bioreactors. *Process Biochemistry*. 35 : 1211-1225.

Moon, S-H. and Parulekar, S.J. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 37 : 467- 483.

Mudgett, R.E. 1986. Solid-state fermentations. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 66-83. Edited by A.L. Demain and N.A. Solomon. Washington D.C. : American Society for Microbiology.

Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S. and Ghildyal, N.P. 1999. Studies on catabolite repression in solid 82 state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Letters in Applied Microbiology*. 29 : 380-384.

North, M.J. 1982. Comparative Biochemistry of the Proteinases of Eucaryotic Microorganisms. American Society for Microbiology.

Official Methodes of Analysis of AOAC international. 17th ed. 2000. Garthersburg, Maryland : The Association of Official Analytical Chemists.

Oliveira, L.A., Porto, A.L.F. and Tambourgi E.B. 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from agricultural wastes. *Bioresource Technology*. 97 : 862-867.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Panda, A.K., Khan, R.H., Mishra, S., Appa Rao, K.B.C. and Totey, S.M. 2000. Influences of yeast extract on specific cellular yield of Ovine growth hormone during fed-batch fermentation of *E. coli*. *Bioprocess Engineering*. 22 : 379-383.

Pandey, A., Soccol, C.R. and Mitchell, D. 2000. New developments in solid-state fermentation : I- bioprocess and products. *Process Biochemistry*. 35 : 1153-1169.

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 13 : 81-84.

Papagianni. M. and Moo-Yang, M. 2002. Ptotease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry*. 37: 1271-1278.

Papagianni, M., Nokes, S.E. and Filer, K. 1999. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 35 : 397-402.

Papon, M. and Talon, R. 1988. Factors affecting growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *Brochothrix thermosphacta*. *Journal of Applied Bacteriology*. 64 : 107-115.

Park, E.Y., Koike, Y., Higashiyama, K., Fujikawa, S. and Okabe, M. 1999. Effect of Nitrogen Source on Mycelial Morphology and Arachidonic Acid Production in Cultures of *Mortierella alpine*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88 : 61-67.

Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghatge, S.M. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Protease. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62 : 597-635.

Revol-Junelles, K. F., Revol-Junelles, A.M. and Germain, P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50 : 359-369.

Ruenwai, R. 2001. Regulation of the alkaline protease gene expression in *Aspergillus oryzae* strain 4a. Master of Science. Biotechnology Program, School of Bioresources and Technology. King Mongkut's University of Technology Thonburi.

Sakamoto, I., Terada, I., Iijima, M. and Matsuzawa, H. 1994. Fermentation conditions for Efficient prodcution of thermophilic protease in *Escherichia coli* Harboring a plasmid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42 : 569-574.

Samarntarn, W. 1998. Alkaline protease production by *Aspergillus oryzae* U1521. Thesis Philosophy of Doctor. Biotechnology Program. School of Bioresources and Technology. King Mongkut's University of Technology Thonburi.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 40 : 2689–2694.

Saran, S., Isar, J.and Saxena, R.K. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70 : 697–699.

Scazzocchio, C., Gavrias, V., Cubero, B., Panozzo, C., Mathieu, M. and Felenbok, B. 1995. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* : a review. *Canadian Journal of Botany*. 73 : S160-S166.

Siddiqi, O., Apte, B.N. and Pitale, M.P. 1966. Genetic regulation of arylsulfatase synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 31 : 381-382.

Smith, J.E. and Aidoo, K.E. 1988. Growth of fungi on solid substrates. In Physiology of Industrial Fungi. 249-269. Edited by D.R. Berry. Oxford : Blackwell Scientific Publications.

Smith, J.E. 1985. Biotechnology Principles. Washington D.C. : American Society for Microbiology.

Sotiriadis, A., Keshavarz, T. and Keshavarz-Moore, E. 2001. Factors Affecting the Production of a Single-Chain Antibody Fragment by *Aspergillus awamori* in a Stirred Tank Reactor. *Biotechnology Progress*. 17 : 618-623.

Tomonaga, G. 1966. Preferential Synthesis of Extracellular Protease by *Aspergillus niger* in Sulfur Deficiency. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 12 : 267-276.

Tunga, R., Shrivastava, B. and Banerjee, R. 2003. Purification and characterization of a protease froms solid state cultures of Aspergillus parasiticus. *Process Biochemistry*. 38 : 1553-1558.

Ueno, S., Miyama, M., Ohashi, Y., Izumiya, M. and Kusaka, I. 1987. Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 26 : 273-276.

Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Rómero-Gomez, S.J., Díaz-Godínez, G. and Augur, C. 2003. Adventages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13 : 157-167.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Whooley, M.A., O'Callaghan, J.A. and Mcloughlin, A.J. 1983. Effect of Substrate on the Regulation of Exoprotease Production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Journal of General Microbiology*. 129 : 981-988.

Wight, C.P., Daugulis, A.J., Lau, H.R. and White, B.N. 1989. Stimulation of extracellular protein production in *Bacillus brevis* 47. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31 : 338-341.

Wiseman, A. 1993. Designer enzyme and cell applications in industry and environmental monitoring. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 56 : 3-13.

Yee, L. and Blanch, H.W. 1993. Recombinant Trypsin Production in High Cell Density Fed-Batch Cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 41 : 781-790.

http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm

http://www.doa.go.th/pl_data/SOYBEAN/IMAGE/soy03.jpg

http://www.pantown.com/board.php?id=5495&area=4&name=board8&topic=253&action=view

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

Potato Dextrose Agar

ส่วนประกอบ

Potato infusion	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Potato dextrose agar : PDA

เตรียม potato infusion โดนหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัม ใส่ในภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้ม 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้ คือ potato infusion เติมวุ้นและ dextrose ลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที pH สุดท้าย 5.6 ± 0.2

Potato Dextrose Agar, Acidified

วิธีเตรียม Acidified Potato dextrose agar

เตรียมอาหาร PDA นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ เพื่อให้กรดผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้เกิดฟองจะทำให้ค่าพีเอชของ PDA ลดลงถึง 3.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Skim milk agar (Saran et al., 2007)

สำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

ส่วนประกอบ

สารละลายที่ 1

Agar	20	กรัม
distilled water	100	มล.

สารละลายที่ 2

Skim milk	20	กรัม
distilled water	100	มล.

สารละลายที่ 3

Phosphate-buffer,0.2 M pH 7.0	600	มล.

วิธีการเตรียม Skim milk agar

นำสารละลายทั้ง 3 ชนิด ไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด เข้าด้วยกันด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วจึงเทอาหารลงในจานเพาะเลี้ยงในขณะที่อาหารยังร้อนอยู่ เพื่อป้องกันการแยกชั้นของ skimmilk

Skim milk agar

สำหรับทดสอบกับตัวยับยั้งเอนไซม์

สารละลายที่ 1

Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	70	มล.

นำไปต้มจนวุ้นละลาย

สารละลายที่ 2

Skimmilk	1	กรัม
น้ำกลั่น	30	มล.

ผสมสารละลายที่ 1 และ 2 อย่างรวดเร็ว และเติม sodium azide ลงไป 0.02%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micronutrients (Germano et al., 2003)

ส่วนประกอบ (กรัม/ลิตร)

KNO_3	2.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.439	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.116	กรัม
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.203	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีการเตรียม

เทสารลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ตามที่ต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเทรต (AOAC, 2000)

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเทรต (AOAC, 2000)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl method มีดังนี้คือ

1.1 การเตรียมสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

1.2 การย่อย (Digestion)

1.3 การกลั่น (Distillation)

1.4 การไตเตรต (Titration)

1.5 การคำนวณ (Calculation)

1.1 การเตรียมสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

ใช้หลักการ sampling โดยน้ำหนักสารตัวอย่างที่ใช้อยู่ในช่วง 0.5 – 5 กรัม

1.2 การย่อย (Digestion)

วัตถุประสงค์ของการย่อยคือ เพื่อทำลายพันธะเคมีของตัวอย่าง เช่น เนื้อ เนยแข็ง เป็นต้น ให้กลายเป็นโมเลกุลย่อย เช่น amino acid และเปลี่ยนโมเลกุลย่อยนั้นเป็นแอมโมเนียมแรดิคอล (NH_4 radical)

วิธีการทำคือ ใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) เป็นสารที่ใช้ในการย่อย ปริมาณของกรดที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารตัวอย่าง และองค์ประกอบหรือส่วนผสมอื่นในสารตัวอย่าง เช่น ถ้าสารตัวอย่างปริมาณมากหรือมีสารอื่นที่ย่อยยาก เช่น ไขมัน เป็นองค์ประกอบจะต้องใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อให้การย่อยสมบูรณ์ โดยทั่วไปถ้าน้ำหนักของสารตัวอย่างไม่เกิน 2 กรัม จะใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ถ้าต้องการใช้สารตัวอย่างมากกว่า 2 กรัม จะเพิ่มปริมาณกรด 10 มิลลิลิตรต่อทุกๆ 1 กรัมของสารตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น

ในขั้นตอนการย่อยนี้จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้เกิดการย่อยได้ดีและเร็ว ที่นิยมใช้กัน คือ เกลือของทองแดง (Cu) ปรอท (Hg) ซีลีเนียม (Se) หรือเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะต้องใช้ควบคู่กับ K_2SO_4 หรือ Na_2SO_4 เพื่อช่วยให้จุดเดือดสูงขึ้น หรือเป็นตัวเพิ่มอุณหภูมิให้ถึงจุดของการย่อยสลายประมาณ 400 - 450 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้จากการย่อยสมบูรณ์จะใส หรือเป็นสีเหลืองใส หรือสีฟ้า หลังจากนั้นควรจะย่อยต่อไปด้วยไฟแรง ประมาณ 10 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าโปรตีนถูกย่อยเป็น $(NH_4)_2SO_4$ หมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การกลั่น (Distillation)

การกลั่นจะเป็นการแยกเอา Nitrogen (N) ออกจากของเหลวในหลอดย่อย (digestion tube) มีวิธีคือ ปรับ pH ของของเหลวในหลอดย่อยให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อเปลี่ยน NH_4^+ (ammonium ion) ให้เป็น ammonia (NH_3) จากนั้นกลั่นแยก NH_3 ที่ได้ออกมาแล้วจับด้วยสารละลายที่เหมาะสมในวิธีของระบบ Kjeldahl System นั้นจะใช้กรดบอริค 4% (Boric acid) เป็นตัวจับ NH_3 ไว้โดย ammonia จะรวมกับกรดบอริค กลายเป็นแอมโมเนียม-บอเรท

การใช้เครื่องกลั่นโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest

1. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่น และเปิด power ของเครื่องกลั่น (kjeltec) หน้าปัดจะขึ้น H รอจนเปลี่ยนเป็น P
2. กด prog step 1 เติมน้ำกลั่นในหน่วยวินาที (1 วินาที = 15 ml)
3. กด prog step 2 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 (1 วินาที = 15 ml)
4. กด prog step 3 เป็นขั้นตอนการตั้งเวลาสำหรับรอปฏิกิริยา
5. กด prog step 4 แสดงขั้นตอนการทำงานส่วนใหญ่ตั้งเวลาไม่เกิน 500 วินาที
6. กด prog step 04 ตั้งระดับการผลิตไอน้ำให้เหมาะสม ส่วนมากตั้งไว้ร้อยละ 70
7. กด prog step 5 ตั้งเวลาดูดสารละลายในหลอดทิ้ง
8. กด prog P แล้วกด RUN เครื่องจะทำงาน
9. เมื่อเสร็จการทดลองตั้ง P ใหม่

1.4 การไตเตรต (Titration)

เป็นการหาปริมาณ Nitrogen โดยนำเอาแอมโมเนียที่ถูกจับไว้ในกรดบอริคมาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน (Standard Titrant) ที่เหมาะสม โดยใช้ 0.1 โมลาร์ H_2SO_4 และใช้ mixed indicator (methyl red และ bromocresol green) เป็นตัวบอกจุดยุติ (End point) โดยหยด mixed indicator 2 – 3 หยด ลงในฟลาสก์ที่มีกรดบอริคกับแอมโมเนียม เมื่อถึงจุดยุติจะได้สารละลายสีชมพู นำค่าปริมาตรของ H_2SO_4 ที่ใช้ไป คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณโปรตีนต่อไป

1.5 การคำนวณ (Calculation)

0.1 โมลาร์ H_2SO_4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกับ ไนโตรเจน 0.0014 กรัม

ความเข้มข้นของ H_2SO_4 = A โมลาร์

ปริมาตร H_2SO_4 ในการไตเตรทตัวอย่าง = B มิลลิลิตร

ปริมาตร H_2SO_4 ในการไตเตรท blank = C มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ = D กรัม

ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง D กรัม = 0.0014 x A x (B-C) / 0.1 กรัม

ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง 100 กรัม = 0.0014 x A x (B-C) x 100 / 0.1 x D กรัม

ร้อยละของปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่าง = 0.0014 x A x (B-C) x 100 / 0.1 x D

ร้อยละของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง = ร้อยละของปริมาณไนโตรเจน x Factor* ของ Nitrogen ในโปรตีน

* Factor ของ Nitrogen ในโปรตีน อาจเปลี่ยนได้ในอาหารบางชนิด เช่น

นมและผลิตภัณฑ์นม มีค่า Factor = 6.38

ข้าวสาลี มีค่า Factor = 5.7

รำข้าวสาลี มีค่า Factor = 6.31

ถั่วเหลือง มีค่า Factor = 5.71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. Azocasein substrate : เตรียม 1% (w/v) azocasein

โดยใช้ Azocasein 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ควรเตรียมและใช้ภายในวันเดียวกัน)

2. สารละลายไตรคลอโรแอซิติก (trichloroacetic acid): ความเข้มข้นร้อยละ 10

ละลาย trichloroacetic acid 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

3. บัฟเฟอร์

3.1 Citrate-Phosphate buffer

A : 0.1 M citric acid (ละลาย citric acid 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล. ของ A กับ Y มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มล.

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

3.2 Phosphate buffer

A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสม X มล. ของ A กับ Y มล. ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200.0 มล.

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X (มล.)	Y (มล.)	พีเอช
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

4. Inhibitors

4.1 PMSF stock

ชั่ง PMSF 0.1742 กรัม

เติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

4.2 *DCI stock*

DCI

เติม DMSO 2.30 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

4.3 Pepstatin stock

Pepstatin 2 มิลลิกรัม + DMSO 2 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution A

แล้วเจือจาง 10 เท่าของ stock solution A 100 ไมโครลิตร และ DMSO 900 ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

4.4 1,10 - phenantroline stock

ชั่ง phenantroline 0.1982 กรัม และ DMSO 10 มิลลิลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

4.5 E 64 stock

E 64

เติมน้ำกลั่น 279 ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

4.6 EDTA ความเข้มข้น 0.2 โมล ในน้ำกลั่น

4.7 $KMnO_4$ ความเข้มข้น 0.2 โมล ในน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นเริ่มต้นในสับสเทรต (AOAC., 1990)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น รอให้เย็นแล้วจึงชั่งน้ำหนักภาชนะ ทำซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1 – 3 มิลลิกรัม
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 – 5 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว
3. อบตัวอย่างในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 – 6 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบ ใส่ในโถดูดความชื้น รอให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ในของแข็งดัดแปลงมาจากวิธีของ AOAC (1995) หัวข้อ 32.1.20

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างของแข็งปริมาณ 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 ml
2.กวนด้วยแท่งแก้ว แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 10 นาที
3.ปล่อยให้ตกตะกอนโดยใช้เวลาอย่างน้อย 30 นาที
4.วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในของเหลวที่เป็นส่วนใสด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งการสอบเทียบทำโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชมาตรฐาน เท่ากับ 4.00 7.00 และ 10.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

สูตรคำนวณ

1.วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธีของ Germano และคณะ (2003)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm x (1,000 µl) x ปริมาณ NaCl}}{\text{ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้วิเคราะห์ (250 µl) x ปริมาณของสับสเทรต}}$$

หมายเหตุ - คูณด้วย 1,000 (µl) เพื่อปรับหน่วยให้เป็นมิลลิลิตร

- ปริมาณ NaCl เท่ากับ 50 มิลลิลิตร
- ปริมาณสับสเทรตเท่ากับ 10 กรัม

หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จะมีหน่วยเป็น ยูนิตต่อกรัมสับสเทรต

โดยหนึ่งหน่วยของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร (A_{440}) เปลี่ยนแปลงไปภายในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2. การนับจำนวนสปอร์

ปริมาตร 0.1 mm^3 นับสปอร์ได้ = X spores

ถ้าใน 1000 mm^3 (1 ml) จะมีสปอร์ = X x 1000 x 1/0.1 spores

= $X \times 1 \times 10^4$ spores / ml

3. การคำนวณความชื้นของสับสเทรตในขั้นตอนการปรับความชื้น

$$x + (g * \%Moisture_0) = (x + g) * \%Moisture_F$$

x = ปริมาณน้ำที่เติมลงในระบบการเพาะเลี้ยง

g = มวลของสับสเตรท

$\%Moisture_0$ = ปริมาณความชื้นเริ่มต้นในระบบการเพาะเลี้ยง

$\%Moisture_F$ = ปริมาณความชื้นสุดท้ายในระบบการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ผลการทดลอง

ตารางที่ 23 แสดงขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสบน skim milk agar ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต

เชื้อราที่ทำการทดสอบ	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clearzone) (เซนติเมตร)		เฉลี่ย (เซนติเมตร)
	1	2	
CH 1	3.8	4	3.9
CH 2	4.4	4.6	4.5
CH 3	0	0	0
CH 4	3.4	3.6	3.5
CHA 1	0	0	0
CHA 2	4.6	5	4.8
CHA 3	2.6	2.8	2.7
MAA 1	0	0	0
MAA 2	3.2	3.2	3.2
MAA 3	4	4.4	4.2
MAA 4	0	0	0
MAA 5	0.8	1.2	1
TK 1	0	0	0
TK 2	4.4	4.8	4.6
TK 3	2.4	2.6	2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต CHA 2

ชนิดของสับสเทรต	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ชั่วโมงที่)				
	24	48	72	96	120
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	4.89	4.02	3.47	4.17	4.91
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	5.32	4.31	3.72	4.38	5.47
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	5.48	4.72	4.73	5.10	5.64
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	5.33	4.58	4.70	5.36	5.76
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	5.28	4.47	4.05	4.63	5.43
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	6.05	4.65	4.27	5.04	5.50

ตารางที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) กับระยะเวลาในการบ่มของสับสเทรตชนิดต่างๆ ของเชื้อราไอโซเลต TK 2

ชนิดของสับสเทรต	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ชั่วโมงที่)				
	24	48	72	96	120
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	5.58	4.01	3.70	4.30	5.43
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	6.58	4.22	4.07	5.42	5.68
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	6.30	5.11	4.87	5.64	5.81
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	6.30	5.21	5.00	5.84	5.98
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	6.28	4.88	4.57	4.95	5.93
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	5.33	5.03	4.68	5.80	5.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 26 แสดงค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น ของสับสเทรตชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต CHA 2

ชนิดของสับสเทรต	ค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	0.961
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	0.963
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.959
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.975
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.936
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.949

ตารางที่ 27 แสดงค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น ของสับสเทรตชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต TK 2

ชนิดของสับสเทรต	ค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aw) เริ่มต้น
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	0.969
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	0.972
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.962
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.978
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.949
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.953

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 28 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของสับสเทรด	ชั่วโมงที่ 72			ชั่วโมงที่ 96			ชั่วโมงที่ 120		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	0.396	0.329	0.363	0.262	0.274	0.268	0.214	0.231	0.223
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	0.585	0.597	0.591	0.403	0.397	0.400	0.272	0.293	0.283
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.277	0.287	0.282	0.265	0.251	0.258	0.164	0.154	0.159
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.580	0.536	0.558	0.389	0.390	0.390	0.160	0.178	0.169
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.701	0.692	0.697	0.529	0.683	0.606	0.203	0.197	0.200
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.556	0.528	0.542	0.316	0.343	0.330	0.149	0.169	0.159

ตารางที่ 29 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของสับสเทรต	ชั่วโมงที่ 48			ชั่วโมงที่ 72			ชั่วโมงที่ 96			ชั่วโมงที่ 120		
	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย	1	2	เฉลี่ย
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	0.172	0.181	0.177	0.286	0.295	0.291	0.114	0.123	0.119	0.115	0.114	0.115
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	0.271	0.279	0.275	0.483	0.497	0.490	0.156	0.167	0.162	0.136	0.144	0.140
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.141	0.147	0.144	0.261	0.251	0.256	0.112	0.111	0.112	0.095	0.084	0.090
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.159	0.164	0.162	0.429	0.438	0.434	0.142	0.152	0.147	0.118	0.123	0.121
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	0.224	0.255	0.240	0.573	0.569	0.571	0.163	0.192	0.178	0.130	0.134	0.132
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	0.181	0.186	0.184	0.463	0.480	0.472	0.147	0.153	0.150	0.102	0.113	0.108

ตารางที่ 30 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของสับสเทรต	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ชั่วโมงที่)		
	72	96	120
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	12.10	8.93	7.43
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	19.70	13.33	9.43
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	9.40	8.60	5.30
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	18.60	13.00	5.63
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	23.23	20.20	6.67
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	18.07	11.00	5.30

ตารางที่ 31 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของสับสเทรต	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ชั่วโมงที่)			
	48	72	96	120
รำข้าวสาลีแบบละเอียด	5.90	9.70	3.97	3.83
รำข้าวสาลีแบบหยาบ	9.17	16.33	5.40	4.67
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	4.80	8.53	3.73	3.00
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	5.40	14.47	4.90	4.03
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด	8.00	19.03	5.93	4.40
รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ	6.13	15.73	5.00	3.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 32 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต CHA 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของตัวยับยั้ง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์					
	รำข้าวสาลีแบบละเอียด	รำข้าวสาลีแบบหยาบ	กากถั่วเหลืองแบบละเอียด	กากถั่วเหลืองแบบหยาบ	รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลือง แบบละเอียด	รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลือง แบบหยาบ
Control	0	0	0	0	0	0
O-phe	6.51	6.71	6.25	1.59	-1.02	5
E-64	7.06	3.46	3.94	1.16	-1.17	7.81
PMSF	7.62	3.05	7.18	1.74	0.58	1.25
Pep	11.52	6.1	3.94	1.3	1.31	5.31
DCI	1.3	2.85	5.32	1.3	0.44	4.38
$KMnO_4$	37.36	42.72	38.11	51.59	48.44	38.06
EDTA	-22.55	-25.24	26.98	23.67	22.95	-2.8

ตารางที่ 33 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต TK 2 ที่เพาะเลี้ยงในสับสเทรตชนิดต่างๆ

ชนิดของตัวยับยั้ง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์					
	รำข้าวสาลีแบบละเอียด	รำข้าวสาลีแบบ. หยาบ	กากถั่วเหลืองแบบละเอียด	กากถั่วเหลืองแบบหยาบ	รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลือง แบบละเอียด	รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลือง แบบหยาบ
Control	0	0	0	0	0	0
O-phe	20.38	8.16	8.08	1.9	10.32	10.99
E-64	9.72	5.32	5.64	3.12	7.83	13.12
PMSF	5.96	2.48	8.33	0.81	2.67	1.77
Pep	18.5	7.09	2.95	2.17	4.09	1.6
DCI	21.94	6.38	11.54	5.01	1.96	6.03
$KMnO_4$	26.65	22.34	44.74	37.4	33.99	51.06
EDTA	24.76	9.22	56.79	48.24	23.13	36.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 34 แสดงการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเทรต

Substrate	น้ำหนักตัวอย่าง (s)	ปริมาตรของ HCl (ml)			ความเข้มข้นของ HCl	%Protein	
		ml (s)	ml (b)	ml (s-b)		%Protein	เฉลี่ย
รำข้าวสาลี	0.5106	4.40	0	4.40	0.2112	14.53	14.95
	0.5486	5.00	0	5.00	0.2112	15.37	
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	0.5234	12.30	0	12.30	0.2112	39.63	39.45
	0.5325	12.40	0	12.40	0.2112	39.27	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

รูปภาพ

1. ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อราไอโซเลตต่างๆ

1) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CH 1

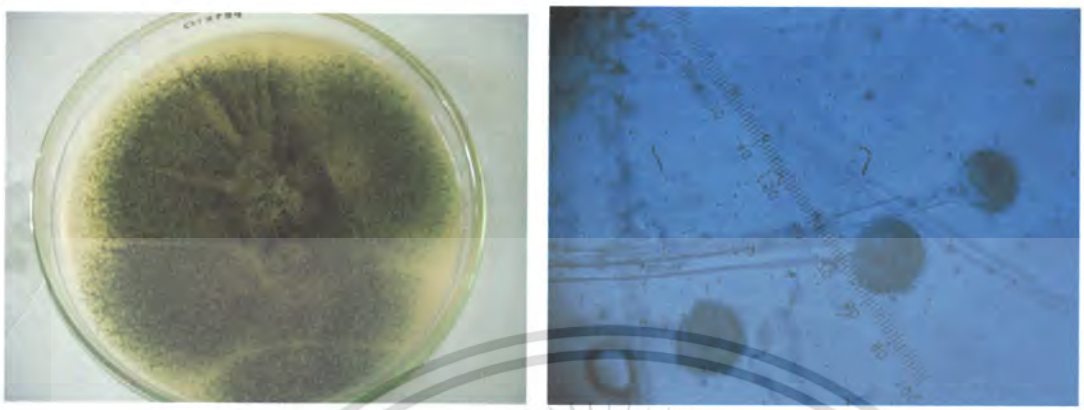
รูปที่ 24 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CH 1

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle)รอบๆ เวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CH 2



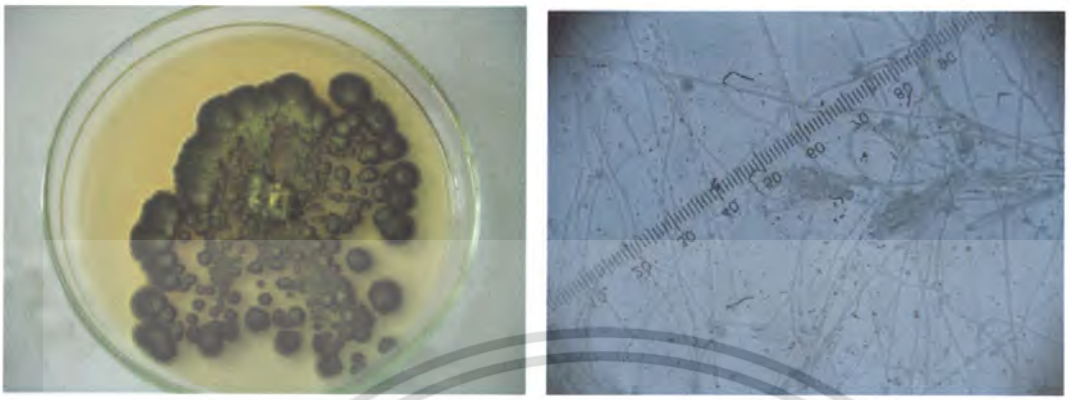
รูปที่ 25 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CH 2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle)รอบๆ เวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CH 3



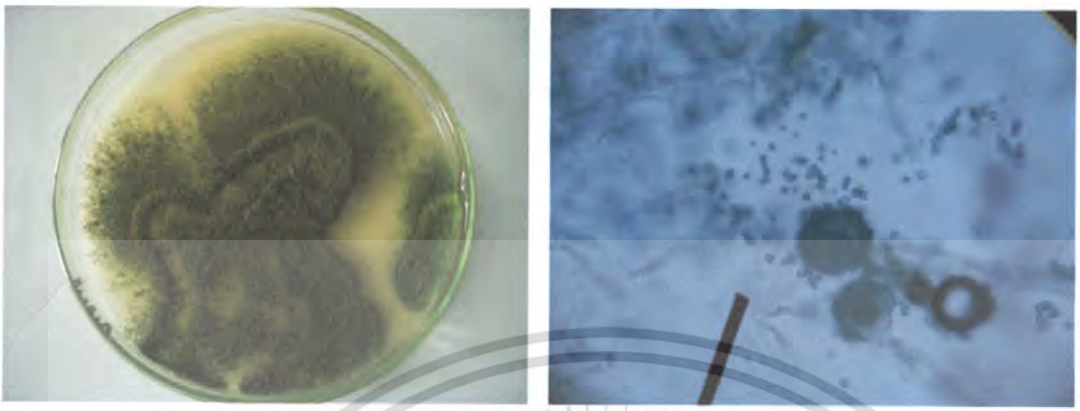
รูปที่ 26 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CH 3

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวเกาะติดแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ที่ปลายก้านโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) แตกแขนงเป็น phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ มีรูปร่างคล้ายไม้กวาด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CH 4



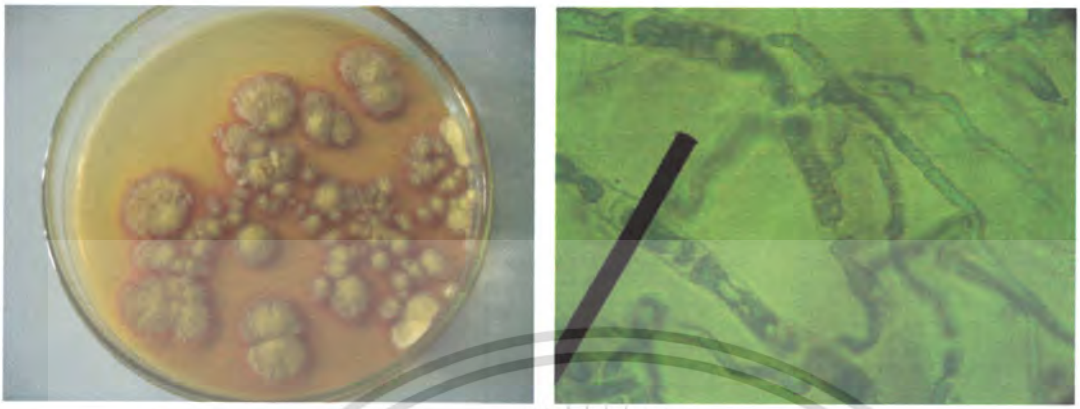
รูปที่ 27 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CH 4

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle)รอบๆ เวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) แอคติโนมัยซีสหมายเลขไอโซเลต CHA 1



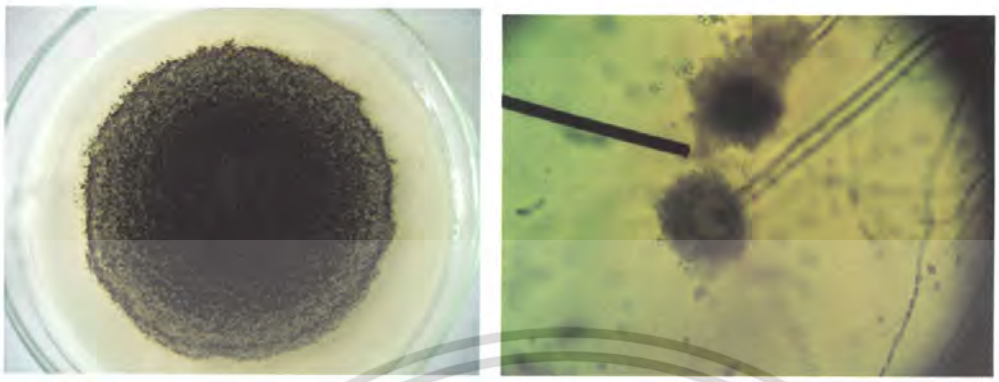
รูปที่ 28 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CHA 1

ลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยซีสบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีส้มเกาะติดแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยซีสเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมีขนาดเล็ก ไม่มีผนังกั้น สปอร์มีขนาดเล็กต้องใช้กำลังขยาย 1000 เท่า จึงจะสามารถมองเห็นได้ สปอร์มีลักษณะเป็นลูกโซ่ต่อกัน (arthro spore)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CHA 2



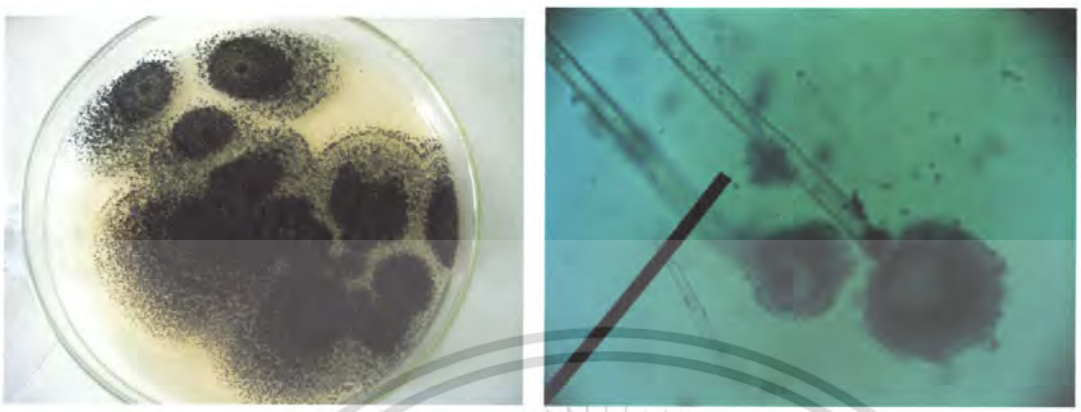
รูปที่ 29 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CHA 2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต CHA 3



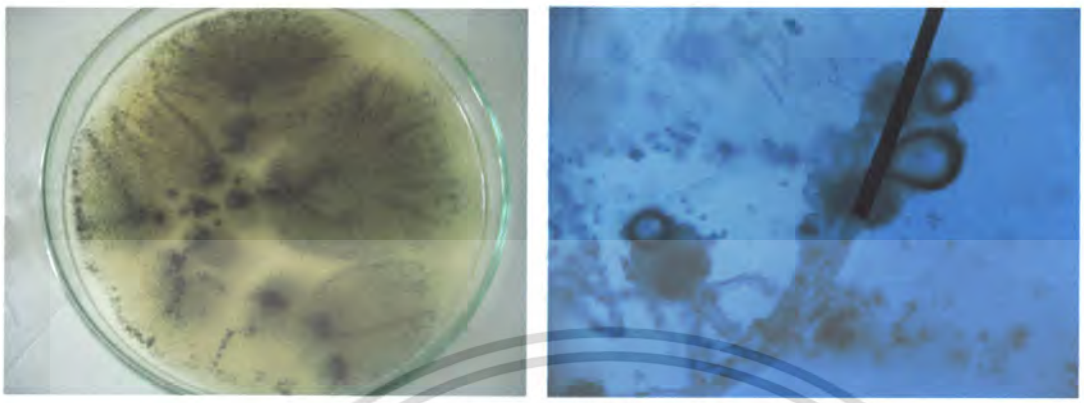
รูปที่ 30 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต CHA 3

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต MAA 1



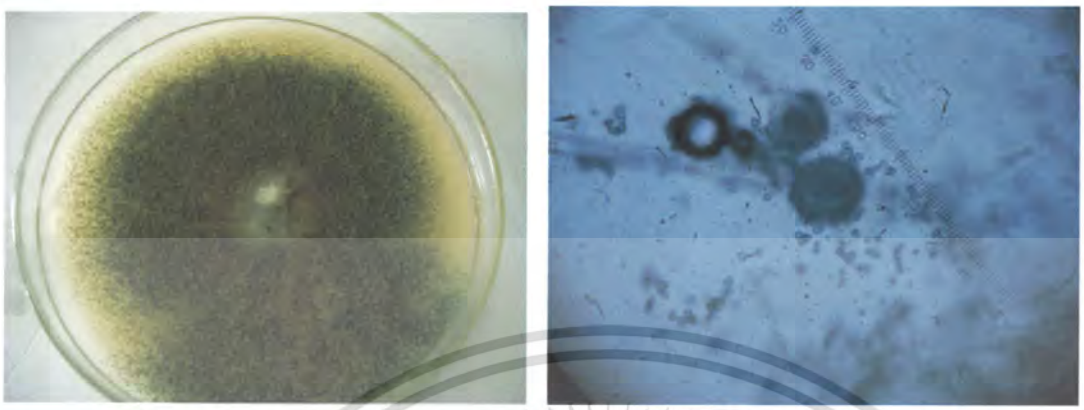
รูปที่ 31 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MAA 1

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต MAA 2



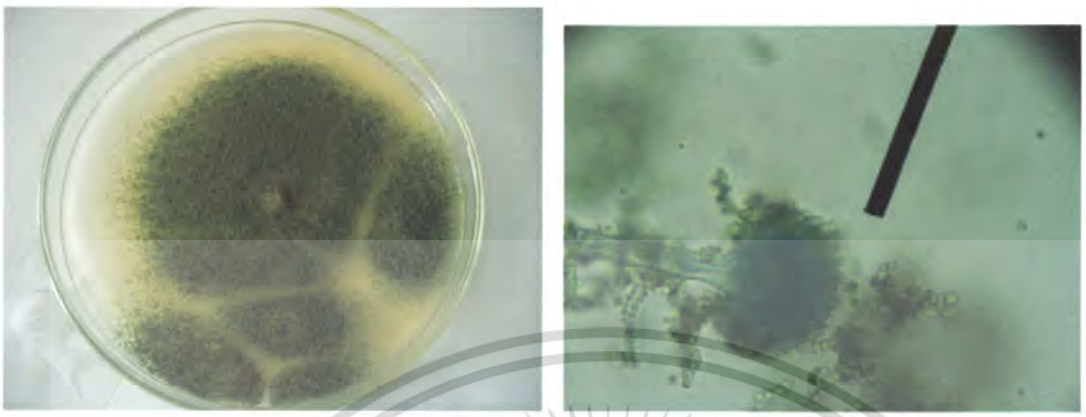
รูปที่ 32 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MAA 2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต MAA 3



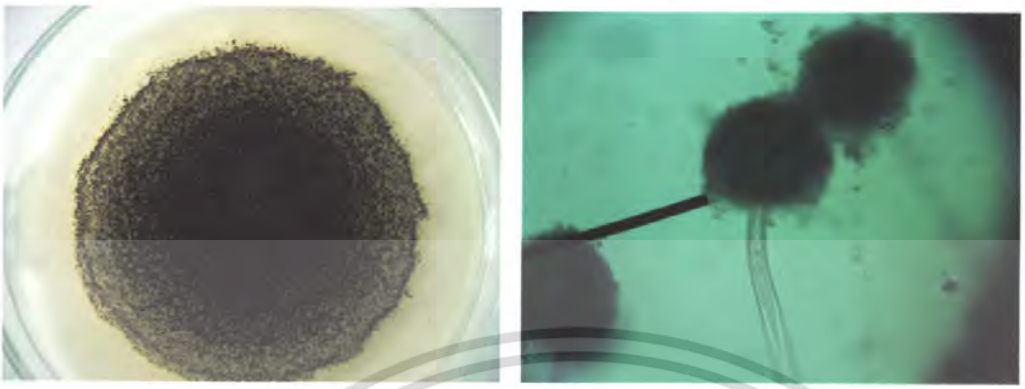
รูปที่ 33 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MAA 3

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีเขียวและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต MAA 4



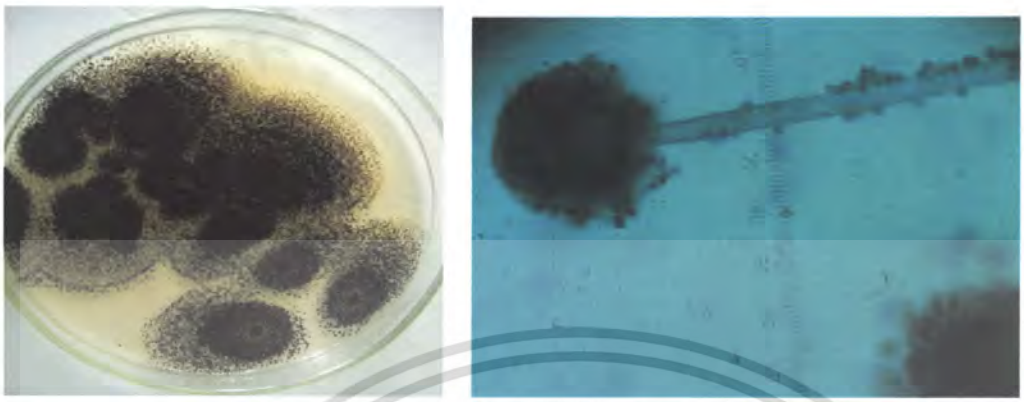
รูปที่ 34 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MAA 4

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแคนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต MAA 5



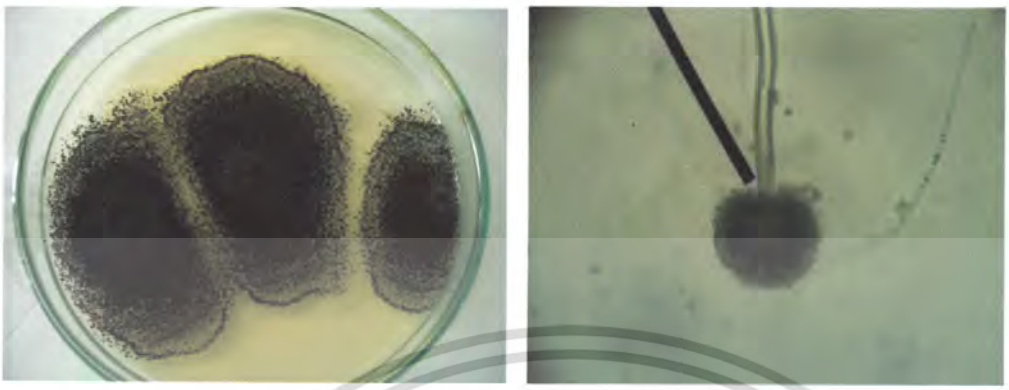
รูปที่ 35 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MAA 5

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต TK 1



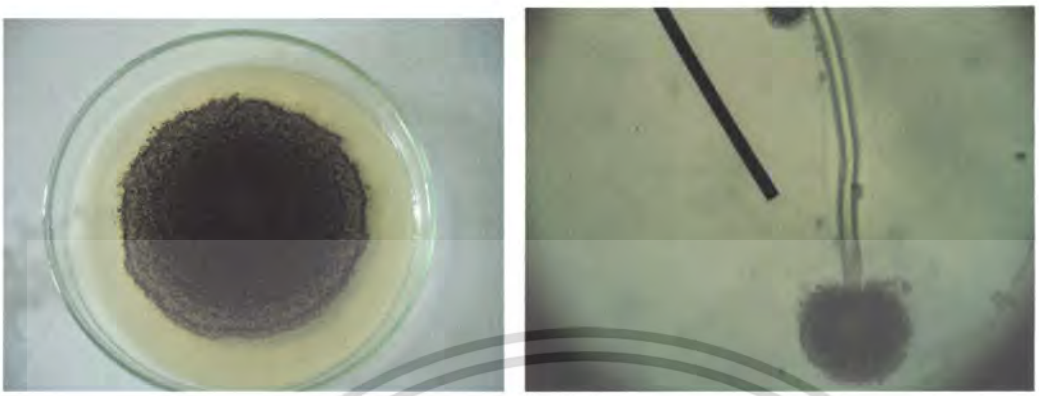
รูปที่ 36 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต TK 1

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต TK 2



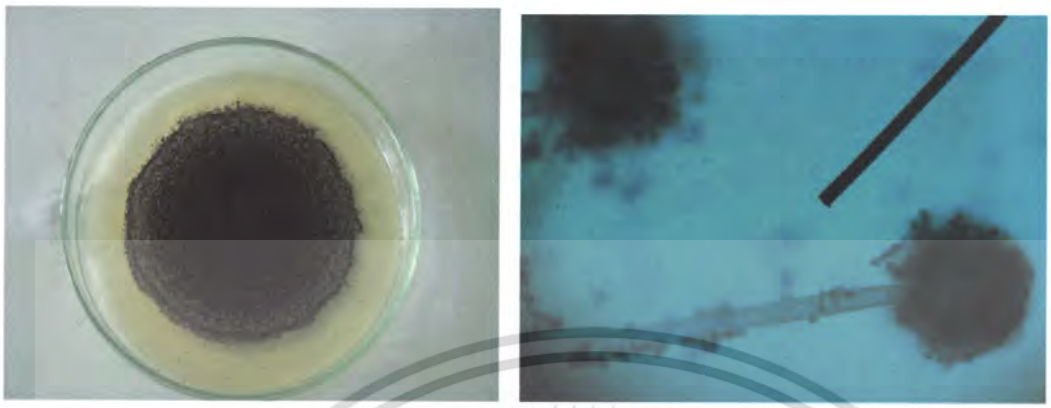
รูปที่ 37 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต TK 2

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15) เชื้อราหมายเลขไอโซเลต TK 3



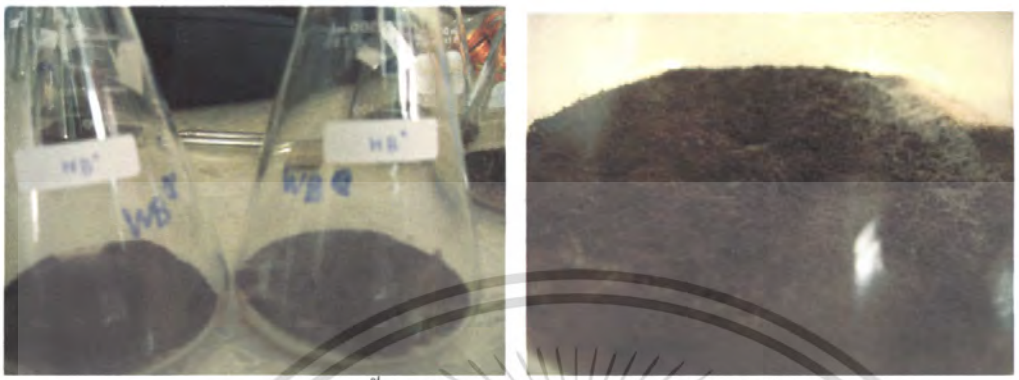
รูปที่ 38 แสดงลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต TK 3

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนจานเพาะเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นใยสีดำและฟู

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใย (hyphae) และกระจุกใยรา (mycelium) มีลักษณะแตกแขนง เส้นใยมีผนังกั้น ไม่มีสี สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศแบบโคนิเดีย (conidia) ก้านของโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ไม่มีผนังกั้น ที่ปลายก้านโคนิดิโอ-ฟอร์โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vescicle) รอบๆเวสซิเคิลจะมี phialide โดยที่ส่วนปลายของ phialide จะมีโคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ในลักษณะแกนสมมาตรแบบรัศมีหรือมีรูปร่างคล้ายพัด โคนิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลม

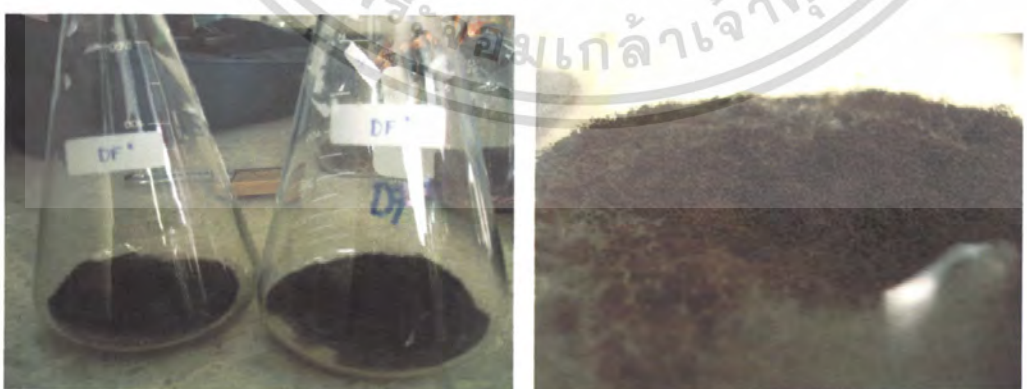
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ภาพแสดงลักษณะการเจริญของเชื้อรา เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



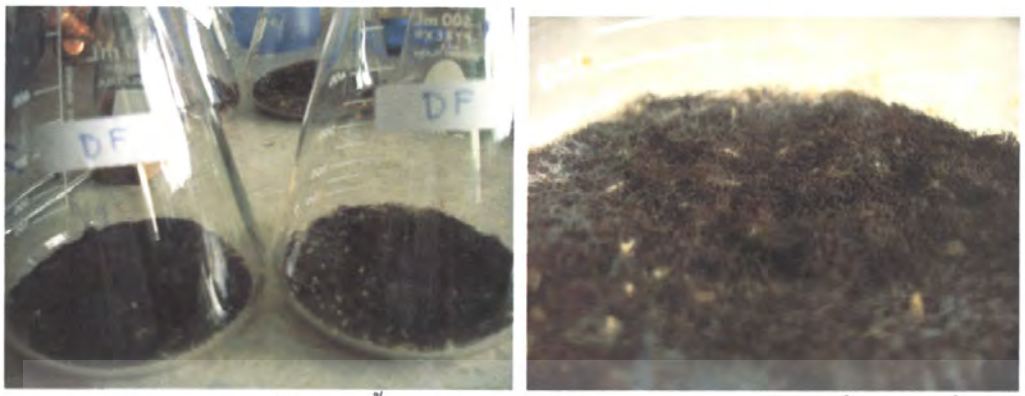
รูปที่ 39 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีแบบละเอียด

รูปที่ 40 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีแบบหยาบ



รูปที่ 41 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

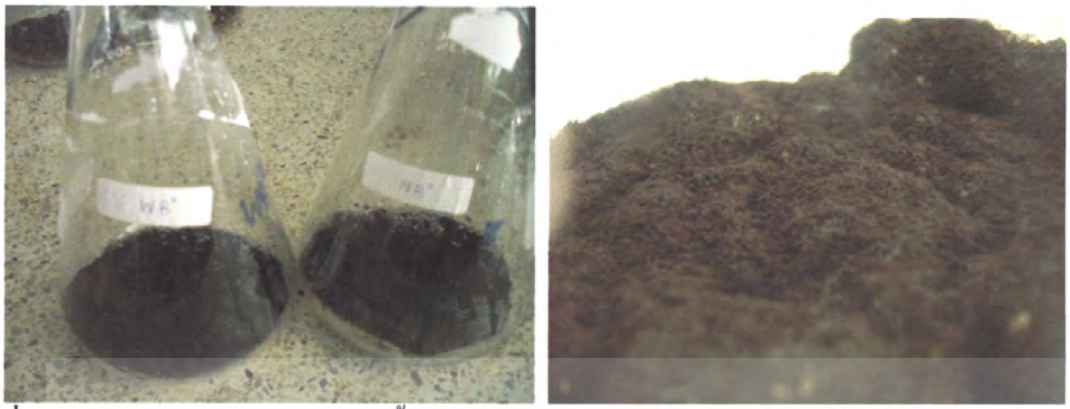


รูปที่ 42 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ

รูปที่ 43 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

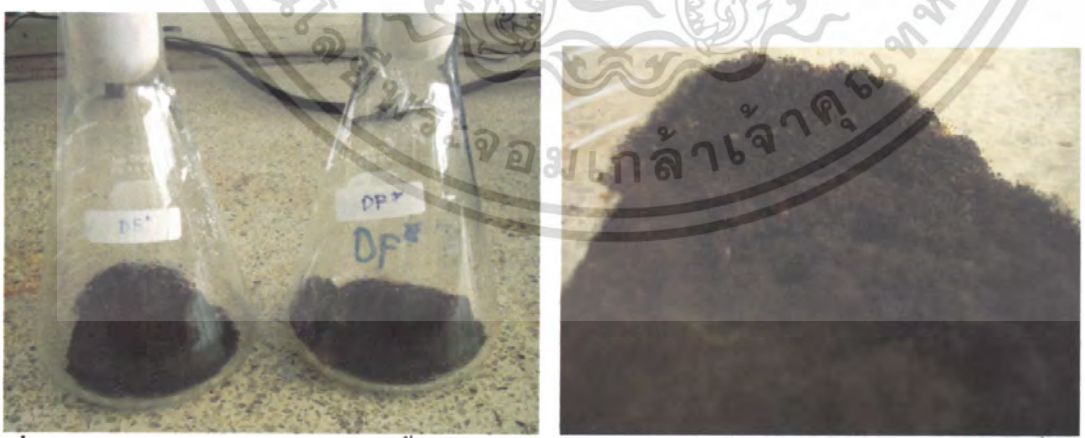
รูปที่ 44 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต CHA 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



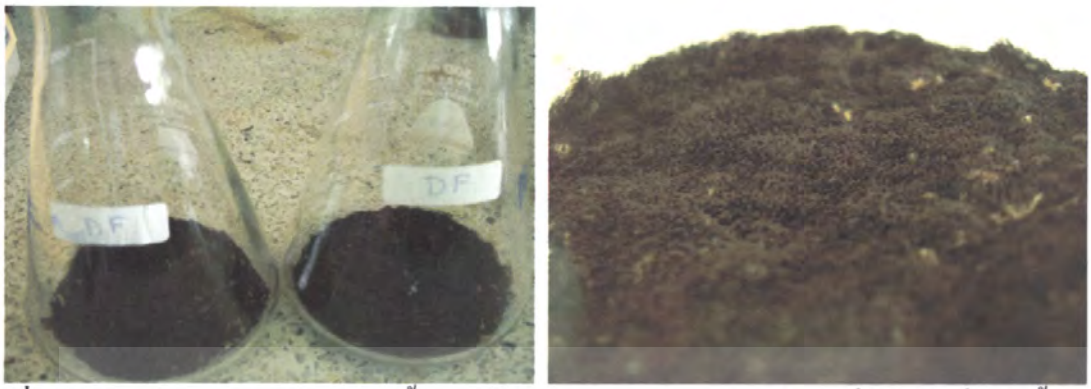
รูปที่ 45 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีแบบละเอียด

รูปที่ 46 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีแบบหยาบ



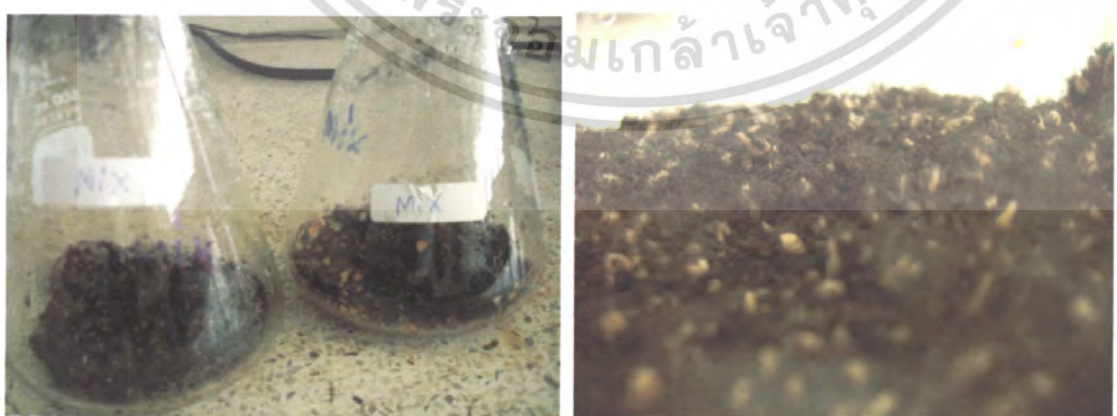
รูปที่ 47 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 48 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ

รูปที่ 49 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบละเอียด ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก



รูปที่ 50 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลต TK 2 บนอาหารแข็งรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแบบหยาบ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด
Thanakorn Vegetable Oil Products Co.,Ltd.

June 26, 2007

ANALYSIS REPORT

ตารางที่ 35 แสดงผลการวิเคราะห์กากถั่วเหลือง จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

Analysis of : กากถั่วเหลืองเมล็ดนอก Sample No. TVOP 140 / 2007

Delivery : For Sample

Analysis Date : June 25, 2007

Test Method : According to A.O.C. S (American Oil Chemists ' Society)

	Analysis		Result
1.	Moisture	%	11.70
2.	Oil Content	%	1.29
3.	Protein	%	45.41
4.	Urease Activity	Δ pH	0.08
5.	Ash	%	6.86
6.	Crude Fiber	%	8.50

We, hereby certify that the above analysed figures are true and correct.

Analysed by :	Checked by :	Approved by :
Vuttinun Kaewmookda	Suvadee Kanchanacheeva	Adul Premprasert
Chief Lab Officer	Senior Lab Officer	Asst.Managing Director

99 Soi Thanakorn, Phraeamutjedi Rd.,
Samutprakarn 10290, Thailand.
Tel:66 (0) 2819-7470-3, (0) 2819-8790-7
Fax:66 (0) 2819-7478, (0) 2819-8798

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายจักราวุธ ไม้ทิพย์

วันเกิด 30 มีนาคม 2529

การศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชูทิศ กรุงเทพมหานคร

ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ที่อยู่ 49/125 ถ.นวมินทร์ แขวงคลองกุ่ม เขตบึงกุ่ม กรุงเทพมหานคร 10230

เบอร์โทรศัพท์ 02-944-2670 และ 08-6524-4906

อีเมล์ bio_homosapiens@hotmail.com

ชื่อ นางสาวเพลินพิศ อนุสิกข์วัฒนา

วันเกิด 9 กุมภาพันธ์ 2529

การศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชรังสฤษฎ์ ฉะเชิงเทรา

ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ที่อยู่ 3/1 ถ.มหาจักรพรรดิ์ ต.หน้าเมือง อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา 24000

เบอร์โทรศัพท์ 0-3851-3077 และ 08-6047-6721

อีเมล์ zimpza@hotmail.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้