สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นางสาวณัฐนันท์ สารตันติพงศ์

นางสาวศุภภัค จิตมั่นคงธรรม

วพ.
ณ33/ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83983
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b 11983309
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Study on Protease from *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 in Solid State Fermentation.

Miss Nattanan Saratontiphong

Miss Supapak Chitmonkongthum

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ

นักศึกษา ณัฐนันท์ สารตันติพงศ์ รหัสประจำตัว 47050123

ศุภภัค จิตมั่นคงธรรม รหัสประจำตัว 47050165

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	
กรรมการ	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ
นักศึกษา	นางสาวณัฐนันท์ สารตันติพงศ์ รหัสประจำตัว 47050123
	นางสาวศุภภัค จิตมั่นคงธรรม รหัสประจำตัว 47050165
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งต่างๆโดยใช้สับสเตรท คือ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น โดยดูจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง Skim milk พบว่า รำข้าวสาลี (WB) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะให้ขนาดของวงใสสูงที่สุด 2.7 เซนติเมตร เมื่อหาชนิดของสับสเตรท และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า รำข้าวสาลี (WB) ที่บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือ 24.656 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้งโดยวิธี Azocasein sulfanilamide จึงนำเอา Crude enzyme ของสับสเตรท และชั่วโมงดังกล่าว มาหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า Citrate-phosphate buffer pH 6.5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือ 33.494 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง นำ Citrate-phosphate buffer pH 6.5 มาใช้เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส และความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือ 40.856 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The Study on Protease from *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 in Solid State Fermentation
Name	Miss Nattanan Saratontiphong
	Miss Supapak Chitmankongthum
Program	Biotechnology
Department	Applied Biology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Khanungkan Klanbut

Abstract

In this study, protease enzyme from *Rhizopus Oligosporus* TISTR 3001 cultivated in differential solid state fermentations; wheat bran, defatted soybean, and 1:1 (w/w) mixture. The Preliminary study showed that wheat bran incubated at 30°C for 72 hours resulted in the widest clear zone in skim milk agar (2.7 cm), indicating highest protease production. After that, the most appropriate time for wheat bran incubation was found to be 72 hours which revealed the maximal enzyme activity of 24.656 U/gds using azocasein sulfanilamide. Therefore, crude enzyme and 72 hours incubating time were used to find optimum pH for highest activity of enzyme. The maximum protease activity was 33.494 U/gds from pH 6.5 citrate-phosphate buffer In order to find the most optimum tempereture for protease activity and stability at different temperature, pH 6.5 citrate-phosphate buffer was utilized. The optimum temperature to produce protease (40.846 U/gds) was 50°C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้เพราะความช่วยเหลือจากบุคลากรหลายท่าน ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงโดยเฉพาะอาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ แก้ไข และให้กำลังใจตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านโดยเฉพาะ พี่วิทยา พี่ประสิทธิ์ พี่เอกภพ ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย และให้ความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบพระคุณบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กากถั่วเหลืองที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน (Defatted Soybean) และบริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์รำข้าวสาลี (Wheat Bran) เพื่อนำมาใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอบคุณ คุณอัครเดช ปรัชญากิตติ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัย ขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนโดยเฉพาะ เมทิกา ลีบุญญานนท์ กนกอร เกริกเกียรติกำจร อรณิชา พัฒนะกุลพงศ์ ปวิตรา เรืองจักรเพ็ชร ทศพล อภิรัตน์โชติกุล วิลาสินี สมมโนน้อม ชัยยา พูนทรัพย์สถิต และปริญญ์ จิตอธิศีล ที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือด้านต่างๆ รวมทั้งผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษา อุปกรณ์การศึกษา และขอบคุณน้องสาว ที่เป็นกำลังใจอย่างดียิ่ง

ณัฐนันท์ สารตันติพงศ์
ศุภภัค จิตมั่นคงธรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 เชื้อราไรโซปัส (*Rhizopus sp .*)	5
2.1.1 หลักเกณฑ์การจัดหมวดหมู่เชื้อรา (Systematic position)	5
2.1.2 แหล่งที่พบ *Rhizopus sp.*(Occurrence)	5
2.1.3 การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory culture)	5
2.1.4 *Rhizopus oligosporus*	6
2.2 เทมเป้ (Tempe)	7
2.3 ประวัติ และความสำคัญของเอนไซม์	9
2.3.1 คุณสมบัติ และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	9
2.4 หลักเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์	10
2.5 เอนไซม์โปรติเอส	10
2.5.1 ลักษณะที่สำคัญของโปรติเอส	11
2.5.2 ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส	12
2.5.3 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของโปรติเอส	14
2.5.4 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.5 อิทธิพลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	17
2.5.6 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรม และเสถียรภาพของเอนไซม์	18
2.6 ระบบการหมักในสภาพอาหารแห้ง	18
2.6.1 ลักษณะของการหมักในสภาพอาหารแห้ง	19
2.6.2 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง	19
2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ	20
2.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก	20
2.7.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากอุตสาหกรรม	27
2.8 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักที่ใช้รา	30
2.9 ปัจจัยที่ควรพิจารณาในการเลือกวัตถุดิบสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
3.1 วัสดุอุปกรณ์	33
3.2 เครื่องมือ	33
3.3 สารเคมี	34
3.4 จุลินทรีย์ และการเตรียมหัวเชื้อ	34
3.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *R. oligosporus*	35
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท	35
3.7 การเตรียมสับสเตรท	35
3.8 การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง	36
3.9 การสกัดเอนไซม์	36
3.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	36
3.11 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *R. oligosporus*	37
3.11.1 การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์	37
3.11.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์	37
3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น	39
4.2 การหาชนิดของสับสเตรทและระยะเวลาเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	41
4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท	45
4.4 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา R. oligosporus TISTR 3001	45
4.4.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์	45
4.4.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	50
5.1 สรุปผลการทดลอง	50
5.2 ข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	55
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์	56
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเตรท	59
ภาคผนวก ง รายงานการวิเคราะห์สารอาหารในกากถั่วเหลืองเมล็ดนอก	62
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	63
ภาคผนวก ฉ รูปภาพ	71
ภาคผนวก ช สูตรคำนวณ	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 วิธีต่างๆที่ใช้ในการควบคุมค่าดีกรีการย่อยสลายโปรตีน 16

2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง 30

4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยใช้สับสเตรทต่างๆเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง 43

ง1 รายงานการวิเคราะห์สารอาหารในกากถั่วเหลืองเมล็ดนอก 62

จ1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท 63

จ2 ขนาดของวงใส ที่หยดสารสกัดเอนไซม์ (Crude enzyme) จากการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ บนอาหาร Skim milk agar 63

จ3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ 64

จ4 ผลการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำการเพาะเลี้ยงใน รำข้าวสาลี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 65

จ5 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำการเพาะเลี้ยงใน รำข้าวสาลี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 66

จ6 การแปลผลจากการวิเคราะห์ค่าสถิติ การโปรแกรม SPSS 16.0 67

จ7 การแปลผลจากการวิเคราะห์ค่าสถิติ การโปรแกรม MINITAB 13.0 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	*Rhizopus* sp. บนขนมปังที่มีความชื้น	6
2.2	ลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	6
2.3	รูปร่าง ลักษณะของ *Rhizopus oligosporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)	7
2.4	ลักษณะของเทมเป้	8
2.5	เบอร์เกอร์เทมเป้	8
2.6	ลักษณะของเอนไซม์	10
2.7	ปฏิกริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ	11
2.8	ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนอิสระ และนินไฮดริน	14
2.9	ปฏิกิริยาที่ไนโตรฟีนิลเป็นสารให้สี และวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อพีเอชมากกว่าหรือน้อยกว่า 7	15
2.10	ปฏิกิริยาที่ใช้เอสเทอร์เป็นสับสเตรท และผลผลิตที่ได้คือหมู่คาร์บอกซิล	15
2.11	ลักษณะรำข้าวสาลี	27
2.12	ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองภายหลังจากการบดก่อนที่จะนำไปสกัดไขมัน	29
2.13	ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองภายหลังจากการสกัดไขมัน	29
4.1	การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	40
4.2	การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง	40
4.3	การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง	41
4.4	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 72, 96 และ120 ชั่วโมง	42
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus*	46
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus* ที่ 25, 30, 40, 50, 55 และ60 องศาเซลเซียส	48
ฉ1	ลักษณะเซลล์ของ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน	71
ฉ2	รำข้าวสาลี (Wheat bran) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ฉ3	กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร	72
ฉ4	กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร	72
ฉ5	การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	73
ฉ6	การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง	73
ฉ7	การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง	74
ฉ8	ลักษณะเจริญของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เจริญบนรำข้าวสาลี	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เอ็กซ์โซเพปทิเดส (Exopeptidase) และเอนโดเพปทิเดส (Endopeptidase) โดยเอ็กซ์โซเพปทิเดส คือ เอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเตรท จากตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีทำให้สามารถแบ่งเอ็กซ์โซเพปทิเดสได้เป็น อะมิโนเพปทิเดส (Aminopeptidase) และคาร์บอกซีเพปทิเดส (Carboxypeptidase) ส่วนเอนโดเพปทิเดส คือ เอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของสายโพลีเพปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโนและคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดเพปทิเดสสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา คือ ซีรีนโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอส (Sereine protease หรือ Alkaline protease) แอสปาร์ติกโปรติเอสหรือแอซิดโปรติเอส (Aspartic protease หรือ Acid protease) ซีสเทอีนโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส (Cystein protease หรือ Thiol protease) และ เมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease)

เอนไซม์โปรติเอส จัดได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสได้ครอบคลุมถึงร้อยละ 60 ของตลาดการค้าเอนไซม์ทั้งหมด ทั้งนี้ เอนไซม์โปรติเอสยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก อาหาร ยา เครื่องหนัง ผ้าไหม (Pandey และคณะ, 1999) และการฟื้นฟูเงินโดยใช้แผ่นฟิล์ม x-ray (Hajji และคณะ, 2007) ทำให้เนื้อนุ่ม การทำให้ชีสสุกย่อยสลายผลิตภัณฑ์ของโปรตีน และการทำขนมปัง (Germano และคณะ, 2003) ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทุกแห่ง โดยพบในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ดี เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวเคมี และมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระหว่างจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรามีข้อดีมากมายในการผลิตเอนไซม์จากรายงานจีนัสของราที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสได้คือ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. (Sandhya และคณะ, 2005) และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ทำได้ง่ายและเมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วเอนไซม์จะกลับสู่สภาพเดิม นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรายังประหยัดกว่าการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย (Germano และคณะ, 2003) กระบวนการหมักในสภาวะอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF) นั้นมีข้อได้เปรียบมากกว่ากระบวนการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว (Submerge fermentation, SmF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่หลายประการ สำหรับการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรานั้น กระบวนการหมักสภาวะอาหารแข็งนั้นค่อนข้างง่ายและสามารถใช้ของเสียหรือผลผลิตจากอุตสาหกรรมการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรทได้ เช่น กากถั่วเหลือง รำข้าว หรือรำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งปริมาณน้ำที่มีน้อยนี้ทำให้การผลิตสารอยู่ในรูปที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Down stream) ใช้เวลาน้อย ลดกระบวนการเพิ่มความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้ ทำให้ลดการสิ้นเปลืองได้ นอกจากนี้กระบวนการหมักสภาวะอาหารแข็งยังทำให้มีข้อได้เปรียบหลายอย่างในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา กล่าวคือ กระบวนการหมักสภาวะอาหารแข็งนั้นเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราพวกที่เป็นเส้นสาย ซึ่งเหมือนกับการเจริญของเชื้อราในธรรมชาติ เช่น เปลือกไม้ ใบไม้ และราก หรือวัสดุต่างๆ ในธรรมชาติ กระบวนการหมักสภาวะอาหารแข็งที่มีความชื้นน้อยนั้นช่วยลดปัญหาในการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในระหว่างการหมัก และสภาพแวดล้อมของกระบวนการหมักสภาวะอาหารแข็งสามารถกระตุ้นจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันภายใต้การหมักแบบกระบวนการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว (Germano และคณะ, 2003)

ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. oligosporus* โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่เหลือจากผลผลิตจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น รำข้าวสาลี กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ทั้งนี้เพื่อให้การนำเอนไซม์มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงต้องมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เช่น ผลของพีเอช ผลของอุณหภูมิต่างๆ ต่อเอนไซม์ และนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001
2. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารแข็งที่เหมาะสม และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ในอาหารแข็งชนิดต่างๆ คือ รำข้าวสาลี (Wheat bran) ที่ได้จากโรงงานผลิตแป้งสาลี และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันพืช เพื่อศึกษาว่าอาหารแข็งและสภาวะการเพาะเลี้ยงใดสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาได้สูงที่สุด โดยการนำมาสกัดเอนไซม์ (Crude enzyme) แล้วนำสารสกัดเอนไซม์ที่แยกได้มาศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรติเอสมากที่สุด คือ พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความสามารถและคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001

2. ทราบถึงชนิดของอาหารแข็งที่เหมาะสม และสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเพื่อประโยชน์ที่ใช้ในงานวิจัยลำดับต่อไป

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

ขั้นที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar)

ขั้นที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ในอาหารแข็งชนิดต่างๆ คือ รำข้าวสาลี (Wheat bran) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วผสมกับรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยหยดลงบนอาหาร Skim milk agar และทำการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Clear zone)

ขั้นที่ 3 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001 ในอาหารแข็งชนิดต่างๆ โดยเติมสารละลายสปอร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในสับสเตรท 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 กรัม ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลี

ชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร

ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร

ชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนำทุกชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ขั้นที่ 4 ศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุดคือ พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

ขั้นที่ 5 วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และจัดทำรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะของเชื้อ *Rhizopus* sp . (Sharma, O.P., 1989)

2.1.1 หลักเกณฑ์การจัดหมวดหมู่เชื้อรา (Systematic position)

- ดิวิชัน (Division) ยูไมโคตา (Eumycota)
  - ซับดิวิชัน (Sub Divition) ไซโกไมโคทินา (Zygomycotina)
    - คลาส (Class) ไซโกไมซีตีส (Zygomycetes)
      - อันดับ (Order) มิวโครานเลส (Mucorales)
        - ตระกูล (Family) มิวโคราซิเอ (Mucoraceae)
          - จีนัส (Genus) ไรโซปัส (Rhisopus)

Invi และคณะ (1965) จำแนก *Rhizopus* ออกเป็น 14 สายพันธุ์ แต่ Hesseltine และ Ellis (1973) ได้อธิบายว่า *Rhizopus* จำแนกได้อย่างน้อย 120 สายพันธุ์ และมีลักษณะที่หลากหลาย

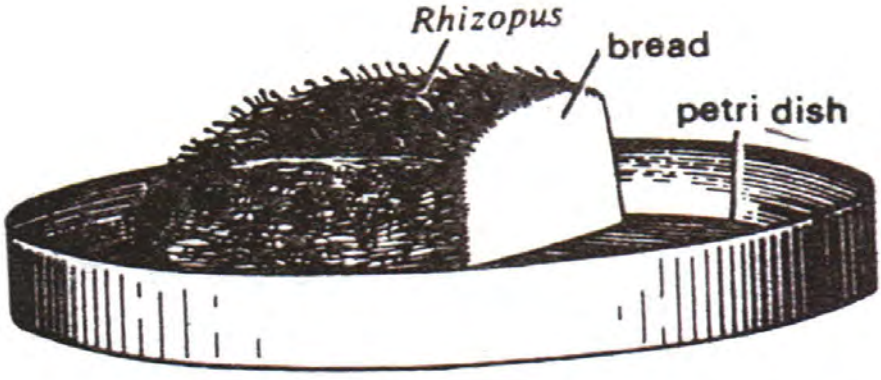
2.1.2 แหล่งที่พบ *Rhizopus* sp. (Occurrence)

Rhizopus sp. จะพบได้ในดินทั่วโลก นอกจากนี้ยังพบในผลไม้ที่เน่าเปื่อย มูลสัตว์ และพืชทั้งหลาย *Rhizopus* sp. บางสายพันธุ์จะก่อให้เกิดโรค หรือโรคที่เกิดจากเชื้อราซึ่งจะพบในสัตว์เลี้ยง และบางรายงานกล่าวว่าจะพบในบาดแผลของมนุษย์ แต่ *Rhizopus* sp. เกือบทั้งหมดจะพบอยู่บนสิ่งที่เน่า หรือตาย

2.1.3 การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory culture)

เนื่องด้วยสายพันธุ์ *Rhizopus* sp. เกือบทั้งหมดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บนสิ่งที่เน่าหรือตาย (Saprophyte) เชื้อราสามารถเจริญเติบโตบนวัตถุที่เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต (Dead organic meterials) เช่น ขนมปัง และเนยเหลวที่เก็บไว้ในที่มืด และในบรรยากาศที่ชื้น โดยแสดงให้เห็นจากการนำขนมปังที่มีความชื้น 1 ก้อน วางลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และหลังจากนั้นสองสามวันจะพบกลุ่มเส้นใยราสีขาวจาก *Rhizopus* sp. (ดังรูปที่ 2.1)

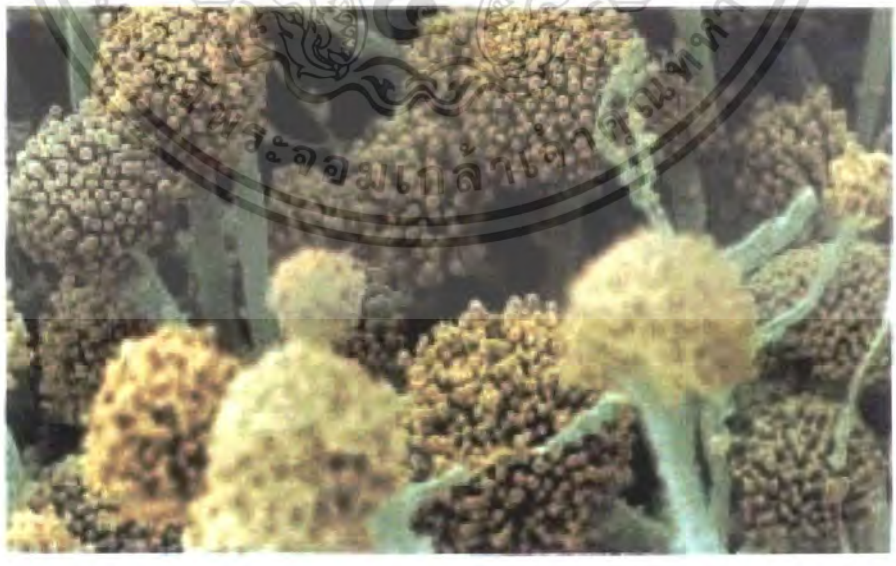
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 *Rhizopus* sp. บนขนมปังที่มีความชื้น
ที่มา: Sharma, (1989)

2.1.4 *Rhizopus oligosporus*

R. oligosporus เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 50-85 พีเอชประมาณ 6 และในสภาพที่มีอากาศนอกจากนี้ *R. oligosporus* ยังมีข้อดีหลายประการด้วยกัน อาทิเช่น เมื่อค่าพีเอชของวัตถุดิบต่ำประมาณ 4.0 เชื้อราจะสร้างเส้นใยปกคลุมวัตถุดิบภายใน 18-20 ชั่วโมง ทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ เจริญแข่งขันได้ยาก และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์พืช เช่น เซลลูเลส ไซแลนเนส และอะราบิเนส เป็นต้น ฉะนั้นการใช้ *R. oligosporus* ในอาหารสัตว์จึงไม่อันตรายแต่จะมีผลดีกับสัตว์เลี้ยงเนื่องจาก *R. oligosporus* ผลิตเอนไซม์ และสารไกลโคเปปไทด์ที่มีประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์ (ดังรูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)
ที่มา: http://www.agro.cmu.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xin-Mei Feng (2006) เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลักษณะ และรูปร่าง ระหว่าง *R. oligosporus* และ *R. microsporus* โดยทำการศึกษาลักษณะที่แตกต่างเพื่อให้มั่นใจถึงสายพันธุ์ที่ นำมาใช้ ในการผลิตเทมเป้ เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการศึกษาพื้นฐานของ รูปร่างสปอร์-แรงจิโอสปอร์ขนาด และรูปแบบการเสริมแต่ง โดยศึกษา 3 กลุ่มคือ 1) กลุ่มของ *R. microsporus* มี *R. rhizopodiformis*, *R. chinensis*, *R. azygosporus* และ *R. oligosporus* 2) กลุ่มของ *R. caespitosus*, *R. schipperae* และ *R. homothallicus* 3) กลุ่มของ *R. microsporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ดังรูปที่ 2.3) โดยพบว่า *R. oligosporus* มีขนาดสปอร์ที่มีผิวไม่เรียบใหญ่ที่สุดในกลุ่มของ *R. microsporus* ซึ่งมีสปอร์ที่มีผิวไม่เรียบในสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 10 โดยใช้เครื่องหมาย หรือสัญลักษณ์ทำให้ *R. oligosporus* แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม *R. microsporus*

รูปที่ 2.3 รูปร่าง ลักษณะของ *Rhizopus oligosporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

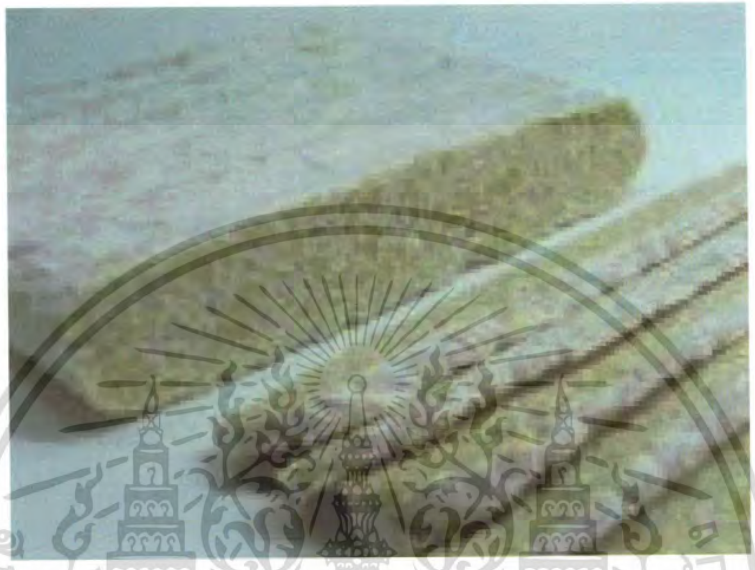
ที่มา: Xin-Mei Feng (2006)

2.2 เทมเป้ (Tempe)

อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักของชาวตะวันออกได้กลายเป็นที่นิยมในแถบตะวันตก เทมเป้เป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักจากประเทศอินโดนีเซีย ก็รวมอยู่ในนี้ด้วย ซึ่งทำมาจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้เอาเปลือกออก นำมาทำการปรุงโดยนำถั่วเหลืองบรรจุลงในภาชนะที่แบน และทำการหมักด้วยสปอร์ของ *R. oligosporus* จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถั่วจะถูกปกคลุมโดยไมซีเลียมของ *R. oligosporus* ที่สปอร์มีสีขาว (ดังรูปที่ 2.4) จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นบางๆ แล้วโรยด้วยเกลือ และนำไปทอดลงในน้ำมัน อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักนี้ขึ้นอยู่กับการผลิต เอ้นไซม์ไลเปส และเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อรา วิตามินมีส่วนสำคัญซึ่ง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามคัดลอกหรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่เพียงแต่ทำให้มีการย่อยถั่วได้มากขึ้น แต่ยังทำให้น่ารับประทานมากขึ้นอีกด้วย ในประเทศอินโดนีเซียจึงใช้เทมเป้เข้ามาแทนที่เนื้อสัตว์ ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา เบอร์เกอร์เทมเป้ (ดังรูปที่ 2.5) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ได้ทำมาจากเนื้อสัตว์เป็นที่นิยมมากได้เข้ามาแทนที่เบอร์เกอร์เนื้อวัวที่เป็นที่รู้จักกัน โดยราคาเบอร์เกอร์เทมเป้ทั่วไปทั้งหมดที่มีการจำหน่ายจะสูงกว่า 2 ล้านเหรียญสหรัฐ



รูปที่ 2.4 ลักษณะของเทมเป้

ที่มา: http://www.soya.be/pictures/tempeh.jpg

รูปที่ 2.5 เบอร์เกอร์เทมเป้

ที่มา: http://pics.livejournal.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักผลิตภัณฑ์เทมเป้มี 2 แบบ คือ การหมักแบบแรกจะเกิดจาก แบคทีเรียจะทำให้ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนเป็นกรด ซึ่งสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* ได้อีกด้วย แบบที่ 2 คือการหมักจากเชื้อราซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดจากไมซีเลียมจาก *R. oligosporus* จะเจริญเติบโตบนถั่ว

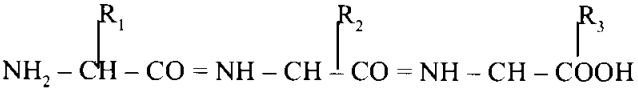
การเจริญเติบโตของ *R. oligosporus* จะง่ายและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจากการแตกของผนังเซลล์ เอนไซม์ภายนอกเซลล์ของเชื้อราจะกระจายตัว และปลดปล่อยสารละลายเอนไซม์ไปยังอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็ง ซึ่งมีความสำคัญต่อขั้นตอนของการหมักในสภาวะอาหารแข็ง ในระหว่างการหมักเทมเป้ เอนไซม์ที่ถูกขับออกมาจากภายในไปยังถั่วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี Sudar madji ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบเส้นใยของเชื้อรา *Rhizopus* จะไม่แทรกซึมชั้นของถั่วเหลืองเกินกว่า 2 ชั้น เขาได้เสนอแนะว่า เอนไซม์จะถูกขับออกมาจากเชื้อรา และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในกระบวนการหมักเทมเป้ Jurus และ Sundberg ได้แสดงการใช้เทคนิคที่ทำให้เส้นใยของเชื้อราแทรกซึมได้ลึกกว่าชั้นของใบเลี้ยงพืช พวกเขายังได้รายงานอีกว่า การแทรกซึมของเส้นใยนั้น เส้นใยจะตั้งตรง และแทรกซึมไปยังถั่วเหลืองซึ่งจะเข้าไปถึงบริเวณภายในเซลล์ (Varzakas, 1998)

2.3 ประวัติ และความสำคัญของเอนไซม์ (อารี, 2550)

เอนไซม์ทุกชนิดเป็นโปรตีนมีลักษณะกลม (Globular protein) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบในโปรตีนชนิดอื่นๆ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมี โครงรูป (Conformation) ที่จำเพาะ ซึ่งจะถูกกำหนดโดยลำดับการเรียงตัวที่แน่นอนของกรดอะมิโน การที่เอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นโครงรูปของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่น และสามารถสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Denature) ได้โดยความร้อน กรดแก่ ด่างแก่ ตัวละลายอินทรีย์ และสารอื่นๆ เอนไซม์จึงเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต อาจพบในไซโทพลาสซึม เซลล์ผนังเซลล์ เมมเบรน และอวัยวะอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ในเซลล์ยูคาริโอต (Eukaryote cell) มีโปรตีนมากกว่า 50,000 ชนิด ส่วนมากเป็นเอนไซม์ และในเซลล์ของ *Escherichia coli* พบว่ามีเอนไซม์ทั้งเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) รวมกว่า 3,000 ชนิด

2.3.1 คุณสมบัติ และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

โครงสร้างของเอนไซม์

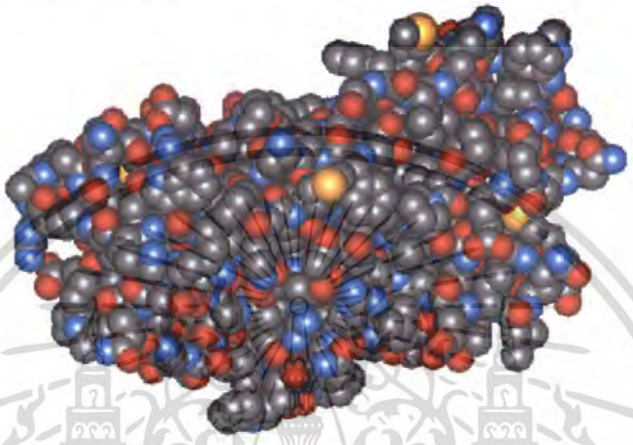


ปลายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์มีลักษณะเป็นก้อนกลม (Globular protein) เกิดจากการที่สายพอลิเปปไทด์ (Polypeptide) มีการพับ หรือม้วนตัวเข้าหากันด้วยแรงยึดชนิดต่างๆ ทำให้มีรูปร่างเป็นม้วนกลมๆ (ดังรูปที่ 2.6) ซึ่งแรงยึดสายพอลิเปปไทด์ มีดังนี้

1. พันธะไฮโดรเจน
2. แรงแวนเดอร์วาลล์
3. พันธะไดซัลไฟด์



รูปที่ 2.6 ลักษณะของเอนไซม์โปรติเอส
ที่มา: http//www.foerstner.orgkonradbcoimgProtease-Kallotte.png

2.4 หลักเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ (อารี, 2550)

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ มีดังนี้คือ

1. ผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงภายในระยะเวลาการผลิตที่เหมาะสม
2. ความเป็นจุลินทรีย์ที่มีความคงตัวด้านพันธุกรรม
3. สามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีราคาถูก หาได้ง่าย และมีปริมาณมาก เช่น แป้ง กากน้ำตาล ธัญพืช และของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม
4. สร้างผลพลอยได้ (By product) จากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณต่ำ
5. วิธีการในการทำให้เอนไซม์ บริสุทธิ์ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก
6. จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์จะต้องไม่สร้างสารพิษ (Toxin) และสารปฏิชีวนะ

2.5 เอนไซม์โปรติเอส (อารี, 2550)

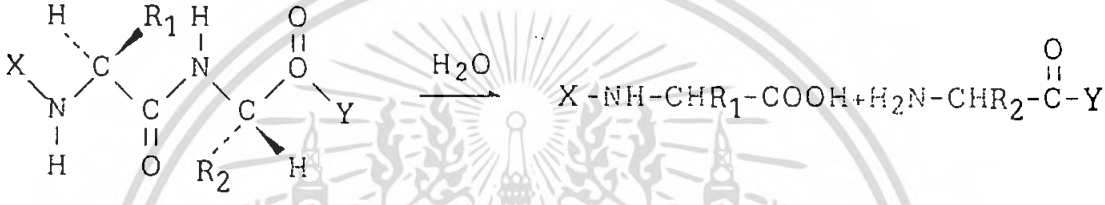
เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบการย่อยอาหารของร่างกาย เช่น เพปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน เปปทิเดส นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยในการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการจับเชื้อโรคโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก เช่น คาเทปซิน ในส่วนของความจำเพาะต่อสับสเตรท โปรตีนจะมีปลายสาย (Side chain) 2 ปลาย คือ R_1 และ R_2 ซึ่งเป็นอนุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิด ที่ทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ 1 พันธะ ดังนั้นถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเป็นต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าดัดพันธะเปปไทด์เข้าทางปลายอะมิโน (N-terminal) และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเข้าทางปลายคาร์บอกซิล

2.5.1 ลักษณะที่สำคัญของโปรติเอส

โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ เช่น เปปทิเดส โปรดิเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และ เอนไซม์โปรติโอไลติก เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (ดังรูปที่ 2.7) แบ่งออกเป็น ประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ
ที่มา: ปราณี (2543)

2.5.1.1 <u>เอนโดเปปทิเดส (Endopeptidase)</u>

คือโปรดิเอสย่อยสลายพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในเส้นสายของโปรตีน

2.5.1.2 <u>เอ็กโซเปปทิเดส (Exopeptidase)</u>

คือ โปรดิเอสที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์จากปลายสายของโปรดีน จะตัดปลายด้านไหนก็ขึ้นอยู่กับความจำเพาะของเอนไซม์ต่อ R_1 (N-terminal splitting) หรือ R_2 (C-terminal splitting) ดังนั้นจึงแบ่งเอนไซม์ตามทิศทางของการตัดเส้นสายของโปรดีนได้ 4 ประเภท คือ

1. คาร์บอกซีเพปทิเดส (Carboxy peptidases)

เรียกว่า peptidyl amino acid hydrolase; E.C. 3.4.2.X มีลักษณะสำคัญ ดังนี้ คือมีความจำเพาะต่อสับสเตรททางด้าน R_2 โดยจะดัดพันธะเปปไทด์จากปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล

2. อะมิโนเปปทิเดส (Aminopeptidases)

เรียกชื่อว่า α-amino-acyl-peptidehydrolase; E.C. 3.4.2.X มีลักษณะที่สำคัญ คือมีความจำเพาะต่อสับสเตรตทางด้าน R_1 ซึ่งจะตัดพันธะเปปไทด์จากปลายด้านกลุ่มอะมิโนไปเรื่อยๆ ตามความจำเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไดเปปทิเดส (Dipeptidases)

เรียกว่า dipeptide hydrolase; E.C. 3.4.3.X มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่ทางด้านปลายสายด้านกลุ่มอะมิโนมากกว่าปลายสายด้านคาร์บอกซิลสามารถตัดพันธะได้ทั้งในสับสเตรตที่เป็นไดเปปไทด์ (Dipeptide, A-A) และไตรเปปไทด์ (Tripeptide, A-A-A)

4. ไตรเปปทิเดส (Tripeptidases)

เหมือนไดเปปทิเดสแต่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์เฉพาะในไตรเปปไทด์เท่านั้น

2.5.2 ประเภทของเอนไซม์โปรติเอส

แบ่งเป็นประเภทของเอนไซม์โปรติเอสตามกลไกการทำงานออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

2.5.2.1 <u>เซรีนโปรติเอสเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบด่าง (Alkali protease)</u>

1. ไคโมทริปซิน มี α π γchymotrypsins; E.C. 3.4.4.5
2. ไคโมทริปซิน (Chymotrypsins B; E.C. 3.4.4.6) และ C
3. ทริปซิน (Trypsin; E.C. 3.4.4.4)
4. อีลาสเทส (Elastase, pancreat E; E.C. 3.4.4.7)
5. ทรอมบิน (Thrombin; E.C. 3.4.4.13)
6. ซับทิลิซิน (Subtilopeptidase A; E.C. 3.4.4.16)
7. แอลฟา – ไลติกโปรติเอส (α – lytic protease) จาก *Sorangium sp.*

ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์เซรีนโปรติเอส

1. เอนไซม์กลุ่มนี้มีสมบัติเหมือนกัน คือ จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-)
2. มีหมู่อิมิดาโซล (Imidazole group) อยู่ที่บริเวณเร่ง
3. เป็นเอนไซม์พวกเอนโดเปปทิเดส
4. เป็นพวกเอนไซม์ที่ชอบด่าง มีพีเอชที่เหมาะสม คือ พีเอช ระหว่าง 7-11
5. โดยทั่วไปมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่ปลายด้านหมู่อะมิโน

เอนไซม์ไคโมทริปซิน ทริปซิน และอีลาสเทส มีแหล่งกำเนิดจากแหล่งเดียวกัน คือ ตับอ่อน ส่วนซับทิลิซิน และแอลฟา – ไลติกโปรติเอส พบในจุลินทรีย์จะมีสมบัติคล้ายแอลฟา – ไคโมทริปซิน

2.5.2.2 <u>ซัลไฟดริลโปรติเอส (Sulphydryl protease)</u>

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน และจะถูกยับยั้งโดยสารกลุ่มซัลไฟดริล (Sulfhydryl reagents) เอนไซม์นี้พบในพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์บางชนิด เช่น ปาเพน (Papain; E.C. 3.4.4.10) จากมะละกอ ฟีซิน (E.C. 3.4.4.12) จากมะเดื่อ โบรมิเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(E.C. 3.4.4.24) จากสับปะรด และ Streptococus protease (Streptococus protease A; E.C. 3.4.4.18) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดแตกต่างกันตรงลำดับของกรดอะมิโน

ลักษณะที่สำคัญของซัลไฟดริลโปรติเอส

1. เป็นโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในพีเอชเป็นกลาง (Neutral proteases) มีพีเอชที่เหมาะสมคือ พีเอชระหว่าง 6-7.5

2. ถูกยับยั้งด้วยสารกลุ่มซัลไฟดริล (มี –SH ในบริเวณเร่ง) เป็นเอนโดเปปทิเดส

2.5.2.3 <u>เมนทอล-คอนเทนนิงโปรติเอส</u>

เป็นโปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือร่วมในการย่อยสลาย (อยู่ในลักษณะโคแฟคเตอร์) ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้คือ

1. คาร์บอกซีเปปทิเดส เอ (Carboxy peptidase A, Peptidyl-L-amino acid hydrolase; E.C. 3.4.2.1) และคาร์บอกซีเปปทิเดส บี (Carboxy peptidase B, Peptidyl-L-lysine hydrolase; E.C. 3.4.2.2) เป็นเอ็กซ์โซเปปทิเดส ตัดสายโปรตีนด้านปลายที่มีหมู่คาร์บอกซิล ต้องการ Zn^{+2}

2. ไกลซิลไกลซีนไดเพปทิเดส (Glycyl-glycine dipeptidase, Glycyl-glycine hydrolase; E.C. 3.4.3.1) ต้องการ Zn^{+2}

3. คาโนซิเนส (Carnosinase, Amino-acyl-Lhistidine hydrolase; E.C. 3.4.3.3) เป็นพวกไดเปปซิเดส ต้องการ Zn^{+2}

4. ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (Leucine aminopeptidase, L-Leucyl-peptide hydrolase ; E.C. 3.4.1.1) ต้องการ Zn^{+2} ย่อยสลายปลายด้านที่มีกรดอะมิโนได้ผลผลิตเป็นแอล-ลิวซีน (L-leucine)

5. โพรลิเดส (Prolidase, Amino-acyl-L-proline hydrolase; E.C. 3.4.3.7) จะไฮโดรไลต์ไดเปปไทด์ที่มีโพรลีน (Proline) หรือไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) ต้องการ Mn^{+2} ผลผลิตที่ได้เป็นอนุมูลของปลายด้านกลุ่มอะมิโน

ลักษณะที่สำคัญของเมนทอล-คอนเทนนิงโปรติเอส

1. เป็นเอ็กโซเปปทิเดสเกือบทั้งหมด

2. เป็นโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกลาง มีพีเอชที่เหมาะสมในช่วงพีเอช 6.5-7.5

3. ถ้ามีไอออนของโลหะร่วมปฏิกิริยา จะถูกยับยั้งโดยสารที่สามารถจับกับไอออนของโลหะได้ (Metal-chelating agent) เช่น 1,10 phenanthroline, EDTA

4. แอซิดโปรติเอส เป็นโปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำการย่อยสลายอยู่ในช่วงพีเอชเป็นกรด (พีเอช < 7) โดยทั่วไปเอนไซม์กลุ่มนี้มีช่วงพีเอชเหมาะสมระหว่าง 2-4 และอนุมูลกรดอะมิโนบริเวณเร่งไม่ค่อยจะมีบทบาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

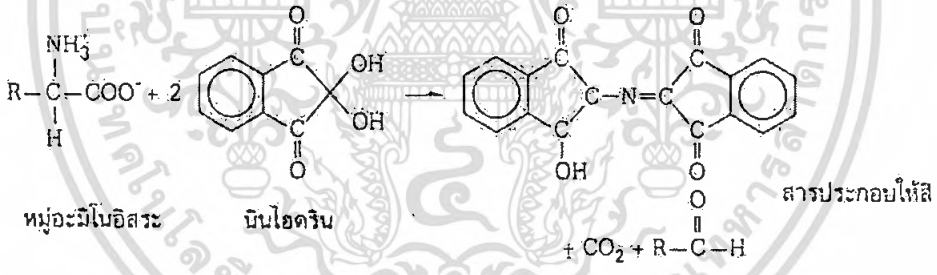
2.5.3 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของโปรติเอส (ปราณี, 2543)

แบ่งวิธีการวิเคราะห์ตามชนิดของสับสเตรตดังนี้

2.5.3.1 <u>โปรตีนเป็นสับสเตรท</u> มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ

1. ประเมินจากผลผลิตของการทำปฏิกิริยา เช่น ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ เช่น กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) กรดเปอร์คลอริก (Perchloric acid) เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้แก่ เคซีนม เฮโมโกลบินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรดหรือยูเรีย วัดปริมาณสารเปปไทด์ที่ละลายใน TCA คือส่วนของสารอะโรมาติกที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วประเมินค่าด้วยไทโรซีน (Tyrosine) ในสารละลายปฏิกิริยา ปริมาณของไทโรซีนจะผันตามแอกทิวิตีของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์

2. ประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโตรไลซ์ คือ ปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระ (Free amino group) ที่เป็นผลผลิต จะแปรผันตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนอิสระทำปฏิกิริยากับ Ninhydrin reagent ให้สีที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (OD_{570}) เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของลูซีน (Leucine) ดังรูปที่ 2.8



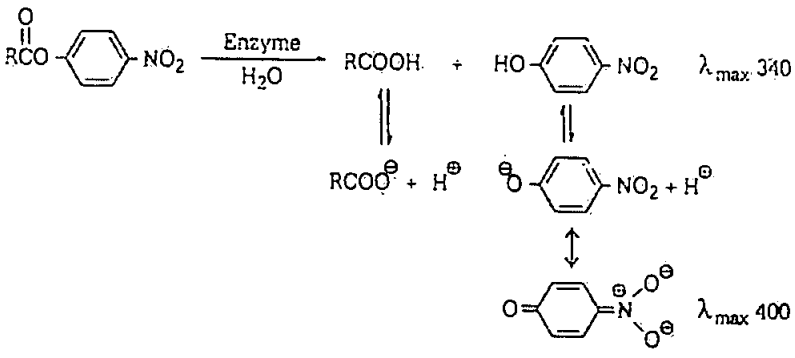
รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนอิสระ และนินไฮดริน
ที่มา: ปราณี (2543)

2.5.3.2 <u>สับสเตรทสังเคราะห์</u>

ได้แก่ สับสเตรทที่มีพันธะเอสเทอร์ เอไมด์ เปปไทด์ในตำแหน่งพันธะเปปไทด์เดิม ใช้เพื่อพิจารณาความจำเพาะและกลไกทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

1. ใช้สับสเตรทเป็น nitrophenyl ester ซึ่งเป็นสารให้สี (Chromogenic substrate) สามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยวัด OD_{400} ถ้า pH > 7.0 และวัด OD_{240} ถ้า pH < 7 ดังรูปที่ 2.9

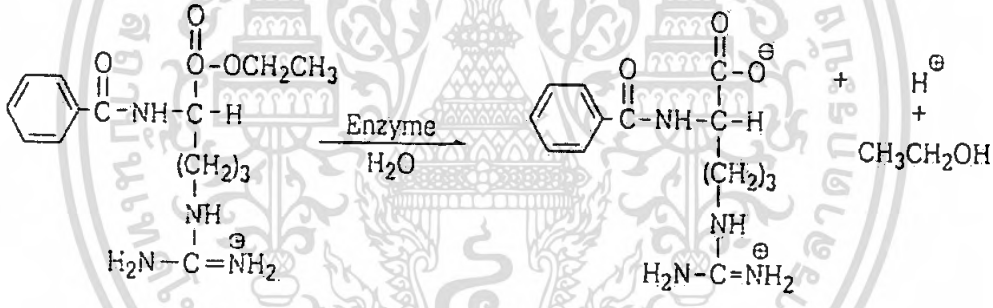
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาที่ไนโตรฟีนิลเป็นสารให้สี และวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อพีเอชมากกว่า หรือน้อยกว่า 7

ที่มา: ปราณี (2543)

2. ใช้สับสเตรทพวก ester เช่น α – N – benzoyl – L – arginine ethyl ester หรือ amide ทำให้ผลผลิตเป็นหมู่คาร์บอกซิลที่สามารถติดตามปฏิกิริยาได้ที่ OD_{253} ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาที่ใช้เอสเทอร์เป็นสับสเตรท และผลผลิตที่ได้คือหมู่คาร์บอกซิล

ที่มา: ปราณี (2543)

ในข้อนี้ติดตามปฏิกิริยาได้ 2 ทางคือ

1. วัด OD_{253} ของผลผลิตคือ หมู่คาร์บอกซิเลต ถ้า pH ของปฏิกิริยาสูงกว่า pK ของหมู่คาร์บอกซิลที่เกิดจะมีผลให้เกิดการปล่อย H^+ (Proton) จึงสามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยการวัดปริมาณ H^+ โดยอุปกรณ์ควบคุม pH (pH stat)

2. ติดตามโดยการเติม Alkaline hydroxylamine-$FeCl_3$ เพื่อวัดปริมาณเอสเทอร์ที่เหลือ ทั้งนี้เอสเทอร์จะทำปฏิกิริยากับพวก hydroxylamine (H_2N-OH) ในสารละลายด่างได้ hydroxamate (R-CO-NH-OH) ให้สีแดงกับ Fe^{3+} ($FeCl_2$) ในสารละลายกรด (H^+) วัด OD_{540}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.3 <u>การควบคุมค่าดีกรีการย่อยสลายโปรตีน (Degree of Protein Hydrolysis)</u>

การควบคุมการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สามารถทำได้หลายวิธี ตามตารางที่ 2.1 และคำนวณตามสูตร

$$\% DH = 100\ h/h_{tot}$$

หมายเหตุ

DH = Degree of Protein Hydrolysis

h = จำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายต่อกรัมของโปรตีน

H_{tot} = จำนวนพันธะเปปไทด์ทั้งหมดต่อกรัมของโปรตีน ทั้งนี้ค่า h, H_{tot} อาจเป็นค่าอื่นๆ ได้ตามวิธีในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 วิธีต่างๆ ที่ใช้ในการควบคุมค่าดีกรีการย่อยสลายโปรตีน

วิธีการวัดค่า DH	หลักการ
pH stat	รักษาระดับ pH คงที่ตลอดการย่อยสลายด้วยการไตเตรท และปริมาณสารที่ไตเตรทจะสัมพันธ์กับค่า DH
OPA	ทำปฏิกิริยากับ primary amino group ด้วย OPA (O-phthaldialdehyde) เกิดเป็นสารมีสีที่วัดได้
TNBS	ทำปฏิกิริยากับ primary amino group ด้วย TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid) เกิดเป็นสารมีสีที่วัดได้
Osmometry	วัดการลดลงของจุดเยือกแข็งซึ่งสัมพันธ์กับค่า DH
Ninhydrin	ทำปฏิกิริยากับ amino group ด้วย ninhydrin เกิดเป็นสารมีสีที่วัดได้
Formole titration	ไทเทรต amino group ด้วยฟอร์มัลดีไฮด์
Soluble nitrogen	วัดปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายโปรตีน
°Brix	วัดค่าของแข็งที่ละลายได้
TCA index	วัดปริมาณสารเปปไทด์ที่ละลายได้ใน TCA (ส่วนเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลใหญ่กว่าจะไม่ละลาย/ตกตะกอน)
Peptide chain length	ใช้ HPLC ด้วยหลักการพื้นฐานด้าน gel permeation chromatography
Change in pH	ติดตาม pH ระหว่างการย่อยสลาย
Viscosity	ติดตามการเปลี่ยนค่าความหนืดระหว่างการย่อยสลายโปรตีน
Tritration to basic pH	วัดกรดไทเทรต (titrate acid) ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลายที่ pH > 5.5 จนถึงที่ pH 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.4 ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส จัดได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสได้ครอบคลุมถึงร้อยละ 60 ของตลาดการค้าเอนไซม์ทั้งหมดทั้งนี้ เอนไซม์โปรติเอสยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างหลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น อุตสาหกรรมผงซักฟอก อาหาร ยา เครื่องหนัง ผ้าไหม (Pandey และคณะ, 1999) และการฟื้นฟูเงินโดยใช้แผ่นฟิล์ม x-ray (Hajji และคณะ, 2007) ทำให้เนื้อนุ่ม การทำให้ชีสสุก ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ของโปรตีน และการทำขนมปัง (Germano และคณะ, 2003)

Sandhya และคณะ (2005) เอนไซม์โปรติเอสพบได้ทุกหนทุกแห่ง โดยพบใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ดี เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวเคมี และมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระหว่างจุลินทรีย์ เชื้อรามีข้อดีมากมายในการผลิตเอนไซม์จากรายงาน จีนัสของราที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสได้คือ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus*

Germano และคณะ (2003) ข้อดีของการผลิตเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรามีมากมาย โดยทั่วไปเมื่อพิจารณาถึงการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์ ทำได้ง่าย และเมื่อผ่านกระบวนการหมักแล้วเอนไซม์จะกลับสู่สภาพเดิม นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรายังประหยัดกว่าการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย

2.5.5 อิทธิพลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

Hajji และคณะ (2007) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ในสารตั้งต้นเคซีนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสโดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก สายพันธุ์ ES1 บริสุทธิ์ ที่ค่าพีเอชต่างๆ ซึ่งพบว่าที่พีเอชระหว่าง 6.0-11.0 เอนไซม์โปรติเอสจาก *A. clavatus* สายพันธุ์ ES1 สามารถทำงานได้ดีโดยค่าพีเอชที่เหมาะสมที่เอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดีที่สุด คือ พีเอช 8.5 และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ค่าพีเอช 9.0 และ 10.0 เท่ากับ ร้อยละ 93 และ 58 ตามลำดับ ผลสรุปนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับโปรติเอสของเชื้อราอยู่ระหว่าง 8.0-9.5 คือ *A. fumigatus* (Reichard U. และคณะ, 1990; Monod และคณะ, 1991; Larcher G. และคณะ, 1992) *A. parasiticus* (Tunga R. และคณะ, 2003) และ *A. clavatus* CCT2759 (Tremacoldi C.R. และคณะ, 2007)

Tunga และคณะ (2003) พีเอช 8.0 คือ พีเอชที่เหมาะสมเมื่อทำการวัดค่าพีเอชของกิจกรรมเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างช้าๆ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ซึ่งที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือประมาณร้อยละ 80 จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุด ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 12 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือร้อยละ 45 จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83983

2.5.6 อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรม และเสถียรภาพของเอนไซม์

Hajji และคณะ (2007) อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *A. clavatus* ES1 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์จาก สายพันธุ์ ES1 จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 40 และ 70 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสร้อยละ 65 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสร้อยละ 70 ซึ่งอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสจาก *A. clavatus* ES1 ที่สามารถทำงานได้ดีที่สุดจะคล้ายกับซีรีนโปรติเอสจาก *Ophiostoma piceae* 387N (Abraham L.D. และ Breuil C., 1996) แต่สูงกว่า *A. clavatus* CCT2759 (Tremacoldi C.R. และคณะ, 2007) *A. fumigatus* TKU003 (Wang และคณะ, 2005) และ *A. fumigatus* CBS113.26 (Larcher และคณะ, 1992) ซึ่งมีอุณหภูมิเหมาะสมอยู่ระหว่าง 37 ถึง 42 องศาเซลเซียส

Hajji และคณะ (2007) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 65 หลังจากทำการบ่ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่ผ่านการบ่ม 30 นาทีจะมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 50 และ 10 ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่มีความเสถียรต่อเอนไซม์โปรติเอส สายพันธุ์ ES1 จะคล้ายคลึงกับเอนไซม์โปรติเอสจาก *A. parasiticas* (Tunga และคณะ, 2003) แต่จะสูงกว่า *A. clavatus* CCT2759 (Tremacoldi และคณะ, 2007) ซึ่งแสดงการมีครึ่งชีวิตอยู่ที่ 18 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Germano และคณะ (2003) กิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์จะลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส กิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์จะสูงประมาณ ร้อยละ 90 เอนไซม์จะรักษากิจกรรมได้ร้อยละ 60 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ภายใน 3 วัน เอนไซม์จะรักษากิจกรรมไว้ได้ร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส และภายใน 30 วันเอนไซม์จะรักษากิจกรรมไว้ได้ร้อยละ 98 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 4 องศาเซลเซียส

2.6 ระบบการหมักในสภาพอาหารแห้ง (Solid State Fermentation Systems) (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 2532)

ระบบการหมักในสภาพอาหารแห้ง หมายถึงระบบการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (Free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตาม น้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในสภาพความชื้น (Moisture) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัตถุดิบเท่านั้น ดังนั้นระบบการหมักในสภาพอาหารแห้งนี้จึงไม่รวมถึงการหมักของแข็ง (Solid) ในอาหารเหลวหรือการหมักในรูปของเหลวข้น (Slurries : ของเหลวซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูง) ในระบบการหมักในสภาพอาหารแห้งเช่นนี้ ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (a_w, Available water) จึงค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงเหมาะสมต่อการหมักโดยเชื้อราเป็นส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 ลักษณะของการหมักในสภาพอาหารแห้ง (Characteristic of Solid State Fermentation)

จากที่กล่าวมาถึงระบบการหมักในสภาพอาหารแห้ง ซึ่งมีความสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ในอดีต ดังนั้นจึงสมควรทราบถึงลักษณะทั่วไปของการหมักดังกล่าว ดังนี้คือ

1. วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักในสภาพอาหารแห้ง มักเป็นพวกธัญพืช (Cereal grain) ถั่ว (Legumes) และผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและ/หรือโปรตีนสูง

2. วัตถุดิบที่ใช้ต้องควบคุมขนาดให้เหมาะสม ทั้งนี้เพื่อให้เกิดช่องว่างในระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบเพียงพอให้อากาศถ่ายเทหมุนเวียนได้เป็นอย่างดี

3. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญได้แก่ น้ำ นอกจากนี้จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เช่นแหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ เป็นต้น

4. การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียในระหว่างการหมักในสภาพอาหารแห้งลดน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นในระบบค่อนข้างต่ำและไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

5. ในระหว่างการหมักในสภาพที่อาหารแห้ง มักเกิดปัญหาความร้อนสะสม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินระดับที่จะเป็นอันตรายต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ นอกจากนี้แล้วยังอาจต้องควบคุมออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซระเหยต่าง ๆ เป็นต้น

นอกจากลักษณะของการหมักในสภาพอาหารแห้งดังที่กล่าวถึงแล้ว ยังจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ ดังนี้

1. หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ซึ่งจำเป็นต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของสปอร์ของเชื้อ อย่างไรก็ตามสปอร์ที่ใช้จำเป็นจะต้องมีอัตราในการงอก (Germinate) ที่รวดเร็วและมีลักษณะเดียวกัน (Uniform) ในระดับสูงกว่าร้อยละ 95 ขึ้นไป

2. ระดับความชื้นของอาหารแห้ง จำเป็นต้องปรับให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ และต้องควบคุมให้อยู่ในระดับที่กำหนดตลอดระยะเวลาการหมัก นอกจากนี้แล้วถ้าความชื้นของอาหารแห้งสูงเกินไปก็จะเกิดปัญหาการถ่ายเทอากาศภายในวัตถุดิบไม่ดีพอ ผลของการหมักก็จะลดต่ำลงไปด้วย

3. การเคลื่อนที่ของจุลินทรีย์และสารอาหารที่จำกัด ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าไม่รวดเร็วเท่ากับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว

2.6.2 ข้อดี และข้อเสียของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532; ดุษณี, 2546)

2.6.2.1 <u>ข้อดีของการหมักในอาหารแห้ง</u>

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมได้ง่าย
2. ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรม ไม่ค่อยยุ่งยากและไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

4. หัวเชื้อที่ใช้อยู่ในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Seed tank) ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้

5. สภาพการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เช่นเชื้อรา มีลักษณะคล้ายกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้เชื้อต้องการระยะเวลาในการปรับตัว (Lag phase) สั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี

6. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถสกัดออกได้โดยตรง และใช้วิธีที่ง่าย และสะดวก

2.6.2.2 ข้อเสียของการหมักในอาหารแข็ง

1. มีความจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา นอกจากนั้นได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และสเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์) ซึ่งทั้งนี้จุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ

2. การติดตามผลการหมักเช่น พีเอช ความชื้น เป็นต้น สามารถทำได้ยาก

3. การหาค่ามวลของเส้นใย (Mycelial mass) สามารถทำได้ยาก

4. การเขย่าหรือการกวนอาหารแข็งตลอดเวลาการหมักต้องอาศัยพลังงานสูง

5. การเติมน้ำลงไปในอาหารแข็งในช่วงแรกของการหมัก อาจมีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้

6. ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่ใช้อาจต้องใช้ปริมาณมาก ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

7. วัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกรรมวิธีอื่นก่อนการใช้ เช่น นำมาทำให้แตก

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.7.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับอุตสาหกรรมการหมัก (สมใจ, 2537)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบดังนี้คือ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจนในบางกรณี นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตสารบางอย่างก็อาจจำเป็นต้องมีการเติมสารชนิดอื่นๆ เพิ่มลงไปอีกด้วย เช่น สารเริ่มต้น (Precursor) สารชักนำ (Inducer) สารยับยั้ง (Inhibitor) บัฟเฟอร์ หรือสารกำจัดฟอง (Antifoam)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.1 น้ำ

น้ำเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด น้ำช่วยละลายสารอาหารชนิดต่างๆ ทำให้จุลินทรีย์สามารถดูดซึมสารอาหารต่างๆ เข้าไปใช้ภายในเซลล์ได้ การนำน้ำมาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปจะต้องพิจารณาสมบัติต่างๆ ดังนี้คือ พีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Dissolved solid) และการปนเปื้อนจากสิ่งโสโครก เช่น น้ำเสีย เป็นต้น

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการหมักบางชนิด จะต้องพิจารณาถึงชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำด้วย การผลิตเบียร์ในสมัยก่อน แหล่งน้ำเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกทำเลที่ตั้งของโรงงานด้วย เพราะการผลิตเบียร์ต่างชนิดกันจะต้องการน้ำที่มีแร่ธาตุต่างกัน ตัวอย่างเช่น การผลิตเบียร์ขม Burton และ Pilsen ในประเทศอังกฤษ ต้องการน้ำกระด้างที่มีแคลเซียมซัลเฟตสูง ในขณะที่การผลิตเบียร์ดำ Stouts ต้องการน้ำที่มีคาร์บอเนตสูง เป็นต้น แต่ในปัจจุบันเราสามารถกำจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากน้ำได้โดยการใช้กระบวนการดีไอออไนเซชั่น (Deionization) หรือโดยการใช้เทคนิคอื่นๆ และสามารถเติมแร่ธาตุ หรือปรับพีเอช ให้เหมาะสมตามต้องการได้

โดยทั่วไปการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะนิยมใช้น้ำประปา แต่ในกรณีที่ไม่มีน้ำประปาหรือมีไม่เพียงพอก็อาจใช้น้ำจากแหล่งอื่นแทนได้ และเนื่องจากคุณภาพน้ำอาจไม่คงที่ มีการเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพน้ำให้สม่ำเสมอโดยวิธีการทางเคมี หรือชีววิทยา การใช้น้ำที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมออาจทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการปรับคุณภาพของน้ำให้เหมาะสมก่อนดังนี้คือ

1. ปรับส่วนประกอบทางเคมี เช่น กำจัดเหล็ก คลอรีนอิสระ กรดคาร์บอนิก และลดความกระด้างของน้ำ
2. กำจัดสารแขวนลอยต่างๆ โดยวิธีการตกตะกอน กรอง หรือโดยวิธีอื่นๆ
3. กำจัดจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อน สารเคมี หรือโดยการกรอง
4. กำจัดคอลลอยด์ โดยวิธีรีเวอร์สออสโมซิส

2.7.1.2 แหล่งพลังงาน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดได้พลังงานในการดำรงชีวิตแตกต่างกันไปจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้พลังงานจากแสง ในขณะที่จุลินทรีย์พวกเคโมออร์กาโนโทรพ (Chemoorganotroph) จะได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวกเคโมออร์กาโนโทรพ ซึ่งโดยทั่วไปได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอนเช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน และจุลินทรีย์บางชนิดยังอาจใช้มีเทน หรือเมทานอล เป็นแหล่งพลังงานได้ด้วย

2.7.1.3 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมาก และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรืออาจใช้เมล็ดข้าวโพดหรือเมล็ดธัญพืชที่บดเป็น ชิ้นเล็กๆ หรืออาจไฮโดรไลซ์แป้งด้วยกรดเกลือเจือจางหรือเอนไซม์ได้เป็นกลูโคสซึ่งอยู่ในรูปของแข็งเป็นผง หรืออาจอยู่ในรูปไซรัป อย่างไรก็ตามกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด อาจมีผลผลิตที่เป็นพิษเจือปนอยู่ จึงไม่เหมาะสำหรับกระบวนการผลิตสารบางอย่างได้ นอกจากนี้ก็ยังมีสารอื่นๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมักอีก คือ

เมล็ดข้าวบาร์เลย์ นิยมใช้เป็นสับสเตรทหลักในการผลิตเบียร์ โดยใช้ในรูปของมอลท์ซึ่งได้จากการนำเมล็ดข้าวบาร์เลย์ไปเพาะให้งอก แล้วนำไปคั่วในระหว่างเมล็ดข้าวบาร์เลย์กำลังงอกจะสร้างเอนไซม์อะไมเลสออกมา ทำให้แป้งบางส่วนถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาล ดังนั้นมอลท์ที่ได้นอกจากจะมีแป้งเป็นส่วนประกอบแล้ว ยังมีน้ำตาลชนิดต่างๆ อีกด้วย

ซูโครส เป็นน้ำตาลที่ได้จากบีท หรืออ้อย ในอุตสาหกรรมการหมักนิยมใช้ในรูปกากน้ำตาล (Molasses) ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือหลังจากการตกผลึกในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย มีลักษณะเป็นของเหลวข้น สีน้ำตาลเข้ม มีความหนืดสูง ปริมาณซูโครสในกากน้ำตาลจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ แหล่งผลิต กรรมวิธีการผลิต และสภาพการเก็บรักษาด้วย แต่โดยทั่วไปมีซูโครสประมาณร้อยละ 30-50 นอกจากนี้ในกากน้ำตาลยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุชนิดต่างๆ และวิตามิน โดยเฉพาะไบโอติน

แลคโตส เป็นไดแซคคาไรด์ที่นิยมใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักในสมัยก่อน เพื่อแก้ปัญหาการเจริญเร็วเกินไปของจุลินทรีย์ โดยอาจใช้ในรูปแลคโตส บริสุทธิ์ หรือหางนมผงก็ได้ แต่ในปัจจุบันไม่นิยมใช้แลคโตสเป็นสับสเตรท เนื่องจากสามารถแก้ปัญหาการเจริญเร็วเกินไปของจุลินทรีย์ได้โดยใช้ระบบการหมักแบบต่อเนื่องหรือ Fed-batch อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็ยังมีการใช้เวย์ (Whey) ซึ่งมีแลคโตสเป็นส่วนประกอบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว หรือ single cell protein (SCP)

น้ำแช่ข้าวโพด (Corn-steep liquor) เป็นของเหลวที่ได้หลังจากการสกัดแยกแป้งออกจากข้าวโพด เดิมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่น้ำแช่ข้าวโพดมีกรดแลคติก น้ำตาลรีดิวซ์ และโพลีแซค - คาไรด์ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จึงสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย

ฟาร์มามีเดีย (Pharmamedia) มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง ได้จากเอมบริโอ (Embryo) ของเมล็ดฝ้ายบดละเอียด ตามปกตินิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบในปริมาณค่อนข้างสูง แม้ว่าจะน้อยกว่าสารประกอบไนโตรเจนก็ตามแต่ก็มีปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากถั่วเหลือง (Soybean meal) นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย เนื่องจากมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยในปริมาณสูง

น้ำมันพืช เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันลินซีด และน้ำมันถั่วเหลือง ฯลฯ การใช้น้ำมันพืชในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะเป็นแหล่งของกรดโอลิอิก กรดลิโนเลอิก และกรดลิโนลินิก หรืออาจใช้เพื่อให้ทำหน้าที่เป็นสารกำจัดฟองก็ได้

นอกจากนี้ก็ยังมีการใช้อาหารโปรตีนสูง เช่น เนื้อวัว Bovine albumin และ NZ-case เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตวัคซีนอีกด้วย

สารอื่นๆ ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และอัลเคน ก็อาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมักบางอย่างได้ แม้ว่าสารเหล่านี้จะแพงกว่าคาร์โบไฮเดรตทั่วไป แต่สามารถผลิตได้ในรูปที่บริสุทธิ์ และเมื่อใช้เป็นสับสเตรทใน กระบวนการหมักแล้ว จะทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน

1. ผลผลิตที่ต้องการ การเลือกใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก อาจจะพิจารณาจากผลผลิตหลักที่ต้องการ โดยเฉพาะในกรณีที่ผลผลิตนั้นเกิดจากการสลายตัวโดยตรงของแหล่งคาร์บอน

2. ราคา กระบวนการหมักบางอย่าง เช่น การผลิตเอธานอล และ SCP ต้นทุนการผลิตประมาณร้อยละ 60-77 เป็นค่าวัตถุดิบที่ใช้เป็นสับสเตรท และราคาของผลผลิตที่ได้จะขึ้นกับราคาของแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก เนื่องจากผลิตภัณฑ์พวกนี้มีราคาค่อนข้างถูก

3. ความบริสุทธิ์ กระบวนการผลิตสารบางอย่าง เช่น กรดซิตริก วัตถุดิบที่ใช้ต้องไม่มีไอออนของโลหะหนักเจือปน ดังนั้นจึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำตาลบริสุทธิ์

4. กฎหมาย การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนอาจขึ้นกับกฎหมายด้วย เช่น ประเทศในกลุ่มตลาดร่วมยุโรป มีการส่งเสริมการใช้น้ำตาล หรือกากน้ำตาลจากหัวบีท โดยการควบคุมราคาต่ำสุดของน้ำตาลบีท และควบคุมปริมาณการนำเข้าน้ำตาลหรือกากน้ำตาลอ้อยอย่างเข้มงวด รวมทั้งควบคุมราคาไม่ให้แข่งขันกับน้ำตาลบีทได้ ในประเทศเยอรมัน มีกฎหมายห้ามใช้วัตถุดิบชนิดอื่นนอกจากมอลท์ น้ำตาล และฮอพ (Hop) ในการผลิตเบียร์ เป็นต้น

5. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะการทำให้ปราศจากเชื้อ อาจมีผลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมได้ การใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนควรทำการฆ่าเชื้อน้ำตาลแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ เพราะน้ำตาลอาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้สารประกอบไนโตรเจนซึ่งทำให้อาหารมีสีเข้มขึ้น และอาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้บางส่วน การใช้แป้งเป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนมักมีปัญหาเมื่อใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ เพราะแป้งจะเกิดเป็นเจลทำให้มีความหนืดสูง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงใช้ความเข้มข้นของแป้งได้ไม่เกินร้อยละ 2

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการสร้างผลผลิต

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า อัตราการเมแทบอไลซ์อาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนมักมีอิทธิพลต่อการสร้างมวลเซลล์ หรือผลผลิต ทั้งสารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นสูงๆ พบว่าจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว แต่สร้างผลผลิตที่เป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิได้ต่ำ เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ซึ่งการแก้ปัญหานี้ในสมัยหนึ่งเคยใช้แหล่งคาร์บอนที่เมแทบอไลซ์ได้อย่างช้าๆ เช่น ใช้แลคโตสแทน แต่ในภายหลังได้มีการเปลี่ยนมาใช้ระบบต่อเนื่อง หรือกึ่งต่อเนื่อง โดยค่อยๆ เติมกลูโคส หรือซูโครสลงไปในอาหารทีละน้อย

2.7.1.4 <u>แหล่งไนโตรเจน</u>

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท เป็นต้น เกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไป เพราะจะเกิดซัลเฟต (SO_4^{-2}) ขึ้น ในทางตรงกันข้าม แก๊สแอมโมเนียและไนเตรทเมื่อถูกเมแทบอไลซ์แล้ว ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับแอมโมเนียมไนเตรท เนื่องจากแอมโมเนียสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (Nitrate reductase) ดังนั้นตามปกติในระยะแรกแอมโมเนียจะถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่งแอมโมเนียมหมดจุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอนไซม์ ไนเตรทรีดักเทส และใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงขึ้น ยกเว้นใน *Gibberella fujikuroi* ที่ไนเตรทจะยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายแอมโมเนียมที่พีเอช 2.8-3.0 ดังนั้นไนเตรทจึงถูกใช้ไปก่อน จนกระทั่งพีเอชสูงมากพอ จึงจะมีการเมแทบอไลซ์แอมโมเนียมได้

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย ก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน และจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะพวกมิวแตนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีนจะใช้ไฮโดรไลเสตจากกากถั่วเหลือง (Soybean hydrolysate) เป็นแหล่งเมทไธโอนีน และทรีโอนีนเป็นต้น อย่างไรก็ตามในบางกรณี เช่น การผลิตวัคซีนบางชนิดสำหรับมนุษย์ มีความจำเป็นต้องใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มีส่วนประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบหากรดอะมิโนต่างๆ (Chemically defined amino acid media) ซึ่งไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่เลย

วัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มามีเดีย Distillers' soluble เคซีนที่ได้จากการย่อยด้วยน้ำ และยีสต์สกัด เป็นต้น

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นกับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดยพิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย เช่น เชื้อราโดยทั่วไปสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมได้ดี ดังนั้นจึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางชนิด ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่จุลินทรีย์เมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วอาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย โดยเฉพาะในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์เมแทบอไลซ์ได้อย่างช้าๆ เช่น การผลิตโพลีอีน (Polyene) นิยมใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ย่อยสลายและดูดซึมไปใช้ได้อย่างช้าๆ นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารอื่นๆ อย่างสมดุลและมีฟอสฟอรัสปริมาณต่ำอีกด้วย

2.7.1.5 <u>แร่ธาตุ</u>

แร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งตามปกติต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม และคลอไรด์ นอกจากนี้ก็ยังมีธาตุอาหารรอง (Trace element) ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีก เช่น โคบอลต์ คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และสังกะสี แต่โดยทั่วไปมักจะพบธาตุอาหารรองเจือปนอยู่ในน้ำ หรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มามีเดีย ในปริมาณที่เพียงพออยู่แล้ว ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง แร่ธาตุต่างๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ตามปกตินิยมใช้ในรูปสารอนินทรีย์ เช่น KH_2PO_4, $MgSO_4$, KCl, $CaCO_3$, $FeSO_4.4H_2O$, $ZnSO_4.8H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$ และ $Na_2MoO_4.2H_2O$ เป็นต้น

สำหรับ P ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่จุลินทรีย์มีความต้องการปริมาณค่อนข้างสูงนั้น โดยทั่วไปนิยมใช้ในรูป $(NH_4)_2HPO_4$ ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งฟอสฟอรัสแล้ว ยังเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ด้วย (สมใจ, 2545)

2.7.1.6 <u>วิตามิน</u>

วิตามิน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่มันต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ จึงต้องมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้จากแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ

ในกรณีที่แหล่งคาร์บอน หรือแหล่งไนโตรเจนที่เลือกใช้นั้น ขาดวิตามินบางชนิดที่จุลินทรีย์ต้องการ ก็อาจแก้ปัญหาได้โดยการใช้แหล่งคาร์บอน หรือแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดผสมกันเพื่อให้ได้วิตามินครบถ้วน อย่างไรก็ตามในกรณีที่จุลินทรีย์ต้องการวิตามินเพียงชนิดเดียว การใช้วิตามินบริสุทธิ์อาจถูกกว่าการใช้วิตามินจากวัตถุดิบที่มีราคาถูกแต่ต้องใช้ในปริมาณมาก

2.7.1.7 ออกซิเจน

ออกซิเจน เป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ (Aerobe) ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอไลท์ การให้ออกซิเจนแก่จุลินทรีย์นิยมให้โดยการอัดอากาศเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจให้ในรูปแก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์ก็ได้

ความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์จะขึ้นกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็วความเข้มข้นสูง จะทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็ว และมีความต้องการออกซิเจนปริมาณสูง จนอาจเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมักได้ ส่วนประกอบบางอย่างของอาหาร เช่น แป้ง หรือโพลีแซคคาไรด์อื่นๆ จะทำให้เกิดความหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการให้อากาศ และการกวนผสม และสารกำจัดฟองบางชนิดจะทำให้อัตราการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ลดลงได้

2.7.1.8 สารชักนำ

เอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการถูกเหนี่ยวนำ (Inducible enzyme) ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างขึ้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารชักนำ (Inducer) เท่านั้น ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้จึงต้องมีการเติมสารชักนำลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

2.7.1.9 บัฟเฟอร์

การผลิตสารบางอย่างจำเป็นต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงจะได้ผลผลิตปริมาณสูง การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดนิยมใช้ผงแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เป็นบัฟเฟอร์ ถ้าพีเอชลดลงคาร์บอเนตจะสลายตัวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชคงที่ประมาณ 7 หรืออาจควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการใช้กรดหรือด่าง เช่น ซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เติมลงไปในภายหลัง อย่างไรก็ตามส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ฟอสเฟต ก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชได้ นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนในอัตราส่วนที่สมดุลกันก็จะช่วยควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ด้วย เนื่องจากสารพวกโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนก็มีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากอุตสาหกรรม

2.7.2.1 รำข้าวสาลี (Wheat bran) (http://www.breadmachinedigest.com)

ผลพลอยได้จากการสีข้าวสาลี มีโปรตีนประมาณร้อยละ 14-16 ยอดโภชนะย่อยได้ประมาณร้อยละ 70 มีปริมาณเยื่อใยค่อนข้างสูง ประมาณร้อยละ 7-12 รำข้าวสาลี โดยทั่วไปมีลักษณะฟ่าม (Bulky) และมีคุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อนๆ สามารถใช้แทนรำข้าวได้ ดังรูปที่ 2.11

ประโยชน์ของรำข้าวสาลี

1. ให้ไฟเบอร์ หรือเส้นใยอาหารในปริมาณสูงชนิดไม่ละลายน้ำ ซึ่งไม่ถูกย่อยโดยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และลำไส้แต่จะพองตัวได้

2. ลดอาการท้องผูก โรคริดสีดวงทวาร เนื่องจากจะทำให้อุจจาระมีปริมาณเพิ่มขึ้นและอ่อนนุ่มขึ้น ช่วยให้เคลื่อนที่ได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น

3. ช่วยมีการขับของเสีย และสารก่อมะเร็งรวมทั้งแบคทีเรีย น้ำดี และยีสต์ จึงเชื่อว่าจะลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ แนะนำให้ใช้กับโปรแกรมการลดน้ำหนัก

4. ช่วยควบคุมระดับน้ำตาล และไขมันในเส้นเลือด

รูปที่ 2.11 ลักษณะรำข้าวสาลี

ที่มา: http://www.breadmachinedigest.com

2.7.2.2 กากถั่วเหลืองปราศจากน้ำมัน (Defatted soybean)

กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุด มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายตัว แต่มีซิสเตอีน และเมไทโอนีน ในระดับต่ำโดยเฉพาะ เมไทโอนีนมีน้อยมากจึงถูกจัดเป็น First limiting amino acid เม็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณร้อยละ 38 ไขมันร้อยละ 16 –21 แต่เมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ยร้อยละ 44 อาจถึงร้อยละ 50 ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดน้ำมัน และขนาดของเมล็ด ในทางการค้าได้แบ่งออกเป็น 2 เกรด คือกากถั่วเหลืองร้อยละ 44 และร้อยละ 48 กากถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 44 เป็นกากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ด้วย ส่วนกากถั่วเหลืองร้อยละ 48 คือกากถั่วเหลืองที่กะเทาะเอาเปลือกออกไม่มีส่วนของเปลือกปนมาเลย

ถั่วเหลืองดิบมีสารพิษอยู่มาก มีทั้งสารที่เป็นตัวกระตุ้น และแก่งแย่ง รวมทั้งสารที่ทำให้เกิดการแพ้บวม (Allergenic) สาร Goitrogenic และสารต้านการจับตัวเป็นก้อน และที่สำคัญคือตัวยับยั้งทริปซิน (Trypsin inhibitor) ดังนั้นในกรณีของถั่วเหลือง จึงพบว่า ถั่วเหลืองที่โดนความร้อนจะมีคุณค่าของโภชนะสูงกว่าถั่วดิบ แต่หากความร้อนที่ให้สูงเกินไปจะทำให้คุณค่าของโภชนะเสียได้โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์ได้ของ ไลซีน และอาร์จินีน ลดลง

ผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลือง และผลพลอยได้จากเมล็ดถั่วเหลืองที่นำมาเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งมีดังนี้

1. กากถั่วเหลืองบด (Ground soybean) คือ ถั่วเหลืองบดทั้งเมล็ดโดยไม่สกัดเอาน้ำมันออก

2. ถั่วเหลืองบดทั้งต้น (Ground soybean hay) คือต้นถั่วเหลืองบดทั้งใบ ลำต้น และเมล็ด ซึ่งไม่มีพืชชนิดอื่น หรือวัชพืชปะปนเลย และมีปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานสินค้าที่กำหนดไว้ในแต่ละประเภท

3. เปลือกถั่วเหลือง (Soybean hulls) ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเปลือกชั้นนอกสุดของเมล็ดถั่วเหลือง

4. กากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการสกัดน้ำมันด้วยการบีบ หรืออัด (Soybean meal, Mechanical extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันโดยวิธีบีบอัดทางกายภาพ วิธีนี้จะต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีในการผลิต ผลพลอยได้ชนิดนี้จะต้องไม่มีสารพิษหรือสารอื่นใดเจือปนอยู่เกินกว่าร้อยละ 0.5 และมีปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานสินค้าที่กำหนดไว้ในแต่ละประเทศ

5. กากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการสกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์ (Soybean meal, Solvent extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันโดยวิธีสกัดโดยสารละลายอินทรีย์ วิธีการนี้จะต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีการผลิตเช่นกัน ผลพลอยได้ชนิดนี้จะต้องไม่มีสารพิษหรือสารอื่นใดเจือปน และมีปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้

6. กากถั่วเหลืองที่กะเทาะเอาเปลือกนอกออก และสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ (Soybean meal, Dehulled, Solvent extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันจากเมล็ดถั่วเหลืองที่เอาเปลือกนอกออกแล้ว โดยใช้สารละลายอินทรีย์สกัดเช่นกัน วิธีนี้ต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีการผลิต และต้องไม่มีสิ่งเจือปนตลอดจนปริมาณเยื่อใยไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้

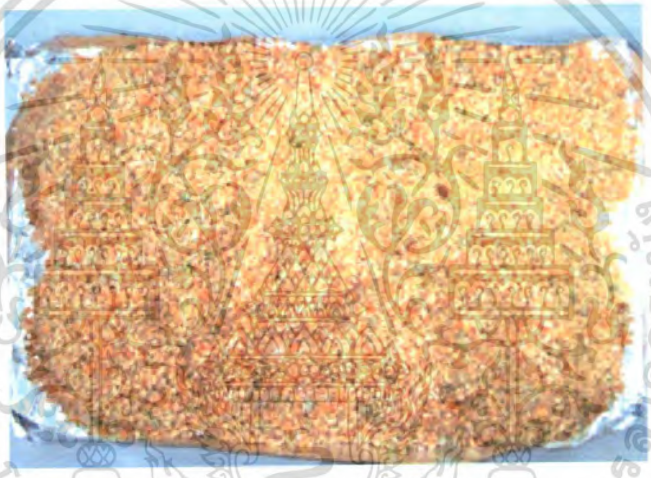
7. ซอยบีนมิลล์ฟีด (Soybean mill feed) เป็นผลพลอยได้จากเปลือกนอกของเมล็ดถั่วเหลือง และส่วนหางของเมล็ดถั่วเหลืองจากเครื่องบดถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรม การทำแป้งถั่วเหลือง ปริมาณโปรตีน และเยื่อใยจะต้องตรงตามมาตรฐานที่แต่ละประเทศกำหนดไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ซอยบีนมิลล์รัน (Soybean mill run) คือเปลือกนอก และเนื้อ ถั่วเหลืองที่ติดมาด้วยกับเปลือก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำกากถั่วเหลืองชนิดที่กะเทาะเอาเปลือกออกแล้วสกัดด้วยสารละลาย

9. ถั่วเหลืองนึ่งหรืออบ (Heat processed soybean) คือการเอาถั่วเหลืองทั้งเมล็ดมานึ่งอบ คั่ว ทั้งเมล็ดแล้วอาจนำมาบดอัดเป็นเม็ดทำเป็นเกล็ด หรือเป็นผงก็ได้ และมักขายในราคาตามปริมาณโปรตีนของผลผลิต

สำหรับขั้นตอนการสกัดไขมันจากเมล็ดถั่วเหลืองเริ่มด้วยการนำเมล็ดถั่วเหลืองมาบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาด 1 ต่อ 8 ของเมล็ด จากนั้นร่อนเอาผง และเปลือกออก ลักษณะของถั่วเหลืองผ่านการบดแล้วก่อนที่จะนำไปสกัดไขมัน ดังรูปที่ 2.12 และลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองภายหลังจากการสกัดไขมัน ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.12 ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองภายหลังจากการบดก่อนที่จะนำไปสกัดไขมัน
ที่มา: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_FS0002-47.pdf

รูปที่ 2.13 ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองภายหลังจากการสกัดไขมัน
ที่มา: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_FS0002-47.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ	ร้อยละ
ความชื้น	10.0
โปรตีน	44.0
ไขมัน	1.0
เยื่อใย	6.0
เถ้า	7.0
แคลเซียม	0.25
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.20

ข้อสังเกตการใช้กากถั่วเหลือง

1. ถ้าเป็นกากถั่วเหลืองชนิดอัดน้ำมัน (Expeller process) จะเก็บได้ประมาณ 1 เดือน ครึ่ง ถ้าเป็นชนิดสกัดน้ำมัน (Solvent extracted) จะเก็บได้นานเกิน 2 เดือน แต่แมลงจะรบกวนมาก

2. ถ้ากากถั่วเหลืองไม่สุกจริงจะมีสาร Trypsin inhibitor ตกค้างอยู่ สัตว์ที่ได้รับจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ หรือหยุดการเจริญเติบโต

3. ถั่วเหลืองดิบจะมีเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งจะย่อยโปรตีนในถั่วให้สลายไปเรื่อยๆ หากถั่วนั้นเก็บไว้นานเปอร์เซ็นต์โปรตีนจะลดลง และคุณภาพโปรตีนจะลดลงด้วย

4. การใช้กากถั่วเหลืองผสมในอาหารสัตว์ควรเสริมกรดอะมิโน เมทไทโอนีน ซิสเตอีน (ทรีโอนีน วาลีน และ ไทโรซีน) ลงไปด้วยจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น

5. มีคุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อนๆ

6. มี แคลเซียมต่ำ ฟอสฟอรัสสูง

7. ในไทยมักพบว่ามีการปลอมปน SMB ด้วย รำ ซังข้าวโพด ดิน หิน กากนุ่น กากฝ้าย จากการสังเกตพบว่า ถ้าปนด้วยรำ หรือซังข้าวโพดบด ปริมาณโปรตีนจะต่ำกว่าปกติ ปริมาณเถ้าจะเป็นปกติ ถ้าปนด้วยดิน หิน ปริมาณโปรตีนจะลดน้อย แต่ปริมาณเถ้าจะเพิ่มขึ้นมากจนผิดสังเกต ถ้าปนด้วยกากเมล็ดพืชอื่นๆ สังเกตดูได้จากลักษณะของกากเยื่อใยจากกล้องสเตอริโอจะมีลักษณะแตกต่างออกไป

2.8 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักที่ใช้รา (สมใจ, 2537)

ราที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักส่วนใหญ่สามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้ ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้ซัสเพนชันของสปอร์เป็น seed ในระหว่างการเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เทคนิคพื้นฐานในการผลิตสปอร์ดังนี้ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1 การผลิตสปอร์บนอาหารที่เติมวุ้น (Solidified medium) ราส่วนใหญ่จะสร้างสปอร์บนอาหารวุ้นที่เหมาะสม แต่ก็ต้องใช้พื้นที่ผิวมากในการผลิตสปอร์ปริมาณมากๆ ในปี ค.ศ. 1950 Parker ได้อธิบายวิธีการผลิตสปอร์ของ *Penicillium chrysogen* โดยใช้เทคนิค roll-bottle ซึ่งทำได้โดยใช้อาหารที่เติมวุ้นร้อยละ 3 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อในขวดรูปทรงกระบอกขนาด 1 ลิตร หลังจากนั้นทำให้เย็นลง 45 องศาเซลเซียส และนำขวดไปหมุนโดยใช้เครื่อง roller mill จนกระทั่งวุ้นแข็ง ตัวเคลือบอยู่ด้านในขวด ทำให้มีพื้นที่ผิวมากขึ้น หลังจากนั้นจึงใส่ซัสเพนชันของสปอร์จาก sub-master culture ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-7 วัน

2.8.2 การผลิตสปอร์บนอาหารแข็ง (Solid medium) ราหลายชนิดสามารถสร้างสปอร์ปริมาณมากบนผิวหน้าของเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ รำข้าวสาลี หรือเมล็ดข้าวโพดบดได้ปริมาณสปอร์ของราจะเกิดขึ้นมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำที่เติมลงไปในในเมล็ดธัญพืชก่อนการสเตอริไลส์ และความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศซึ่งตามปกติจะใช้สูงสุดเท่าที่จะทำได้ ในปี ค.ศ. 1968 Singh และคณะ ได้ผลิตสปอร์ของ *Aspergilllus ochraceus* โดยใช้ข้าวบาร์เลย์ต้ม 200 กรัม หรือรำข้าวสาลีซึ่งทำให้ชื้นแล้ว 100 กรัม บรรจุใน Fernbach flask ขนาด 2.8 ลิตร เพาะเลี้ยงในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98 เป็นเวลา 6 วัน ปรากฏว่า ได้สปอร์ 5 x 10^{11} โคนิเดีย ซึ่งมากเป็น 5 เท่าของสปอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sabourauud agar ใน Roux bottle และเป็น 50 เท่าของสปอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar ของ Difco ในเวลาเท่ากัน

นอกจากนี้สปอร์ของราพวก *Aspergillus* และ *Penicillium* หลายชนิดยังสามารถผลิตได้โดยใช้ขนมปังทั้งก้อนเป็นสับสเตรทอีกด้วย

2.8.3 การผลิตสปอร์ในอาหารเหลว (Submerge culture) ราบางชนิดสามารถสร้างสปอร์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมได้ ตัวอย่างเช่น *P. patulum* ซึ่งใช้ในการผลิต grisepfulvin ในปี ค.ศ. 1957 Rhodes และคณะพบว่า *P. patulum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว จะสร้างสปอร์ได้ดี ถ้ามีการให้อากาศที่ดีและใช้ไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม (ร้อยละ 0.05-0.1) โดยปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณการให้อากาศ ถ้าให้อากาศปริมาณน้อยก็ต้องใช้ไนโตรเจนปริมาณน้อยด้วย

2.9 ปัจจัยที่ควรพิจารณาในการเลือกวัตถุดิบสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2537)

ในกระบวนการหมักขนาดเล็กอย่างเช่นการหมักในระดับห้องปฏิบัติการอาจจะใช้ สารบริสุทธิ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้แต่กระบวนการหมักขนาดใหญ่ๆในระดับอุตสาหกรรม การใช้สารบริสุทธิ์อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีราคาแพง โดยทั่วไปการเลือกวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในอุตสาหกรรมการหมักจะพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ราคาถูก คุณภาพคงที่ และมีใช้ตลอดทั้งปี
2. ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ต่อกรัมของสับสเตรทที่ใช้ไปได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ความเข้มข้นสูงที่สุด
4. ทำให้มีอัตราการสร้างผลผลิตสูงที่สุด
5. ทำให้เกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด
6. ทำให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตน้อยที่สุด โดยเฉพาะในการให้อากาศ และการกวนผสม การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ การกำจัดของเสีย และปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในการพัฒนากระบวนการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการอาจไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในถังหมักขนาดใหญ่ ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนแก๊สได้น้อยลง อาหารที่มีความหนืดสูงต้องใช้พลังงานสูงในการกวนผสม และสารอาหารบางอย่างอาจมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลง pH การเกิดฟอง เป็นต้น

ในอุตสาหกรรมการหมักสับสเตรทที่นิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนซึ่งจะทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาแล้วได้แก่ กากน้ำตาล เมล็ดธัญพืช แป้ง กลูโคส ซูโครส แลคโตส เกลือแอมโมเนีย ยูเรีย ไนเตรท น้ำแช่ข้าวโพด กากถั่วเหลือง และของเหลือทิ้งจากการหมัก (Fermentation residue) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร

3.1.2 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

3.1.3 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needles)

3.1.4 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.5 ขวดรูปชมพู่ (Flasks) ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร

3.1.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)

3.1.7 บีกเกอร์แก้ว ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.9 ตะแกรงกรองหมายเลข 20 (Mesh Number 20)

3.1.10 Cock borer Number 3

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น HIRAYAMA HA-300 M IV

3.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น HERMLE Z 383 K

3.2.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น CONTERM Thermolec 2000 oven

3.2.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ EUTECT instruments รุ่น pH 510

3.2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ UNICO รุ่น 28000A UV/VIS

3.2.6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ยี่ห้อ IKA รุ่น MS1

3.2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ PolyScience

3.2.8 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS

3.2.9 เครื่องชั่งละเอียด ยี่ห้อ SARTORIUS analytic

3.2.10 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ MEMMERT

3.2.11 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest

3.2.12 เครื่องย่อยสาร (Digestor) ยี่ห้อ VELP sciencetifica รุ่น DK 20

3.2.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดขนาดเล็ก (Microcentrifuge) ยี่ห้อ NATIONAL LABNET รุ่น Spectrafuge 16 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 รำข้าวสาลี (Wheat bran) จากบริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน)

3.3.2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) จากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด (ภาคผนวก ง)

3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar)

3.3.4 ทวีน 80 (Tween-80)

3.3.5 Lactophenol cotton blue

3.3.6 Skim milk

3.3.7 Sodium chloride (NaCl)

3.3.8 Trichloroacetic acid (TCA)

3.3.9 Sulfanilamide azocasein MW 23.6 kDa

3.3.10 Sodium hydroxide (NaOH)

3.3.11 Citrate buffer

3.3.12 Citrate-phosphate buffer

3.3.13 Phosphate buffer

3.3.14 Tris-HCl

3.3.15 Glycine-NaOH

3.3.16 Potassium nitrate (KNO_3)

3.3.17 Magnesiumsulphate heptahydrate($MgSO_4.7H_2O$)

3.3.18 Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4)

3.3.19 Zinesulphate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$)

3.3.20 Ferrussulphate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)

3.3.21 Manganesesulphate heptahydrate ($MnSO_4.7H_2O$)

3.3.22 Boric acid (H_3BO_3)

3.3.23 Potassium sulphate (K_2SO_4)

3.3.24 Coppersulphate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)

3.3.25 Sulphuric (Conc. H_2SO_4)

3.4 จุลินทรีย์ และการเตรียมหัวเชื้อ (Germano และคณะ, 2003)

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก) นำเชื้ออายุ 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีปริมาณสปอร์เต็มผิวหน้าอาหาร PDA มาเตรียมหัวเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ลงในหลอดทดลอง และทำการขูดสปอร์ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทำการนับปริมาณสปอร์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ให้ได้สปอร์ซัสเพนชัน (Spore suspension) มีปริมาณสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ช)

3.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3001

เตรียมอาหารแข็ง Skim milk ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Saran และคณะ (2007) (ภาคผนวก ก) โดยทำการละลายวุ้นลงในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จากนั้นนำสารละลายวุ้นที่ได้และ Skim milk นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ทำการผสมรวมกันและเทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ Cock borer Number 3 เจาะลงบนอาหารแข็ง Skim milk และหยดสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว และรำข้าวสาลีผสมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง นำมาหยดลงบนอาหาร Skim milk ปริมาตร 30 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการวัดขนาดของวงใส (Clear zone) เพื่อทดสอบขั้นต้นว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้จริง

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท (AOAC, 2000)

การหาปริมาณโปรตีนของสับสเตรท ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) โดยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ค)

3.7 การเตรียมสับสเตรท (Germano และคณะ, 2003)

สับสเตรทที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 4 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลี

ชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร

ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดอนุภาค มากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

โดยขั้นตอนการเตรียมก่อนนำสับสเตรทมาใช้คือ นำสับสเตรทไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และร่อนผ่านตะแกรงหมายเลข 20

3.8 การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) (Germano และคณะ, 2003)

เตรียมสับสเตรทแห้งแต่ละชุดการทดลองอย่างละ 10 กรัมเติมลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรทให้เท่ากับร้อยละ 55 (ภาคผนวก ช) ด้วยซิเตทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-phosphate buffer) พีเอช 5.0 ที่มีส่วนประกอบของธาตุอาหารรอง (Micronutrient) ได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ร้อยละ 0.2 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.05 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ร้อยละ 0.1 ซิงค์ซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.0439 เฟอรัสซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.1116 และแมงกานีสซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต ($MnSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.0203 จากนั้นนำสับสเตรทที่ได้ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และเติมสารละลายสปอร์ของเชื้อ *R. oligosporus* TISTR 3001 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นนำสับสเตรทแต่ละชุดการทดลองมาสกัดเอนไซม์เพื่อหาชุดการทดลองที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.9 การสกัดเอนไซม์ (Germano และคณะ, 2003)

การสกัดเอนไซม์ทำได้โดย เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยที่ได้ไปกรองผ่านผ้าขาวบางและกรองด้วยสำลีอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และนำส่วนใส (Crude enzyme) ที่ได้ไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

3.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธีซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน (Sulfanilamide azocasein) เป็นสับสเตรท (Germano และคณะ, 2003 อ้างถึง Leighton และคณะ, 1973) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (Crude enzyme) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาตร 1.2 มิลลิลิตรมาทำให้เป็นกลางโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

1 หน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์ (Unit) กำหนดโดยปริมาณของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปในเวลา 1 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ทดสอบ (Germano และคณะ, 2003) และแสดงผลในหน่วยยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง (ภาคผนวก ช)

3.11 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *R. oligosporus* TISTR 3001

3.11.1 การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (pH Optimization)

เมื่อทำการศึกษาชนิดของอาหารแข็ง และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (Crude enzyme) ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด มาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ กัน (ภาคผนวก ข) ดังนี้

ซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) พีเอช 3.0, 4.0 และ 5.0

ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-phosphate buffer) พีเอช 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0

ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 7.0 และ 8.0

ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl) พีเอช 8.0 และ 9.0

ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Glycine-NaOH) พีเอช 9.0

วิธีการเตรียมบัฟเฟอร์ดังภาคผนวก ก และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี ซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน (Sulfanilamide azocasein) ดังข้อ 3.10 ต่อไป

3.11.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (Temperature Optimization)

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (Crude enzyme) มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด จากการทดลองข้อ 3.11.1 และทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน (Sulfanilamide azocasein) ตามวิธีดังข้อ 3.10 แต่ทำปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 for Windows และโปรแกรม MIMITAB 13.0 ในการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

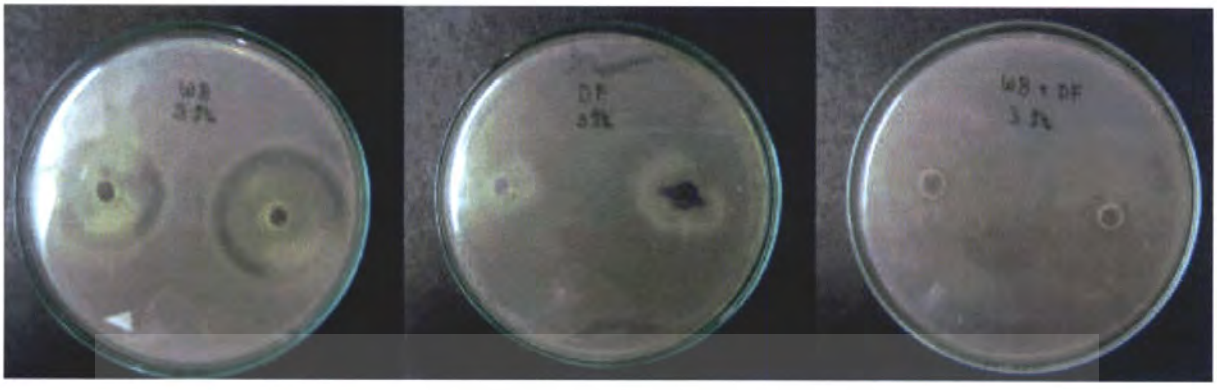
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ จากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ Citrate phosphate buffer พีเอช 7 และในสภาพที่มีอากาศ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเส้นใยปกคลุมวัตถุดิบภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ เจริญแข่งขันได้ยาก Sharma, O.P. (1989) ยังกล่าวอีกว่า *R. oligosporus* จะเจริญได้เมื่อมีความชื้นประมาณร้อยละ 50-85 และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์พืช เช่น เซลลูเลส ไซแลนเนส และอะราบิเนส เป็นต้น พบว่า *R. oligosporus* มีขนาดสปอร์ที่มีผิวไม่เรียบใหญ่ที่สุดในกลุ่มของ *R. microsporus* ซึ่งมีสปอร์ที่มีผิวไม่เรียบในสัดส่วนมากกว่าร้อยละ 10 โดยใช้เครื่องหมายหรือสัญลักษณ์ทำให้ *R. oligosporus* แตกต่าง จากสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม *R. microsporus* นอกจากนี้ยังเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ ฉ1 ภาคผนวก ฉ) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งทางด้านกายภาพ (Physical) และทางเคมี (Chemical)

4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในเบื้องต้นโดยการนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (Crude enzyme) จากสับสเตรททั้ง 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) หยดลงบนอาหารแข็ง Skim milk บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาบ่มแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ จ2 (ภาคผนวก จ) ปรากฏว่าขนาดของวงใสบน รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) มีค่าเท่ากับ 2.700, 1.425 และ 1.725 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.1 ขนาดของวงใสบน รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) มีค่าเท่ากับ 1.775, 1.575 และ1.700 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.2 และขนาดของวงใสบน รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) มีค่าเท่ากับ 1.313, 1.550 และ1.375 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



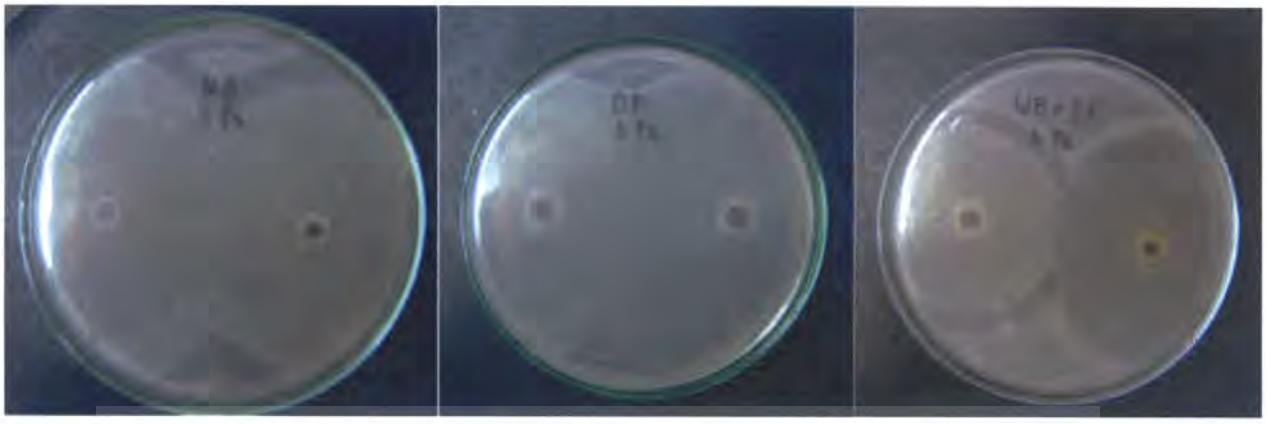
ก. ข. ค.

รูปที่ 4.1 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ ก. รำข้าวสาลี (WB) ข. กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และ ค. รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง บนอาหาร Skim milk agar

ก. ข. ค.

รูปที่ 4.2 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ ก. รำข้าวสาลี (WB) ข. กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และ ค. รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง บนอาหาร Skim milk agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ข. ค.

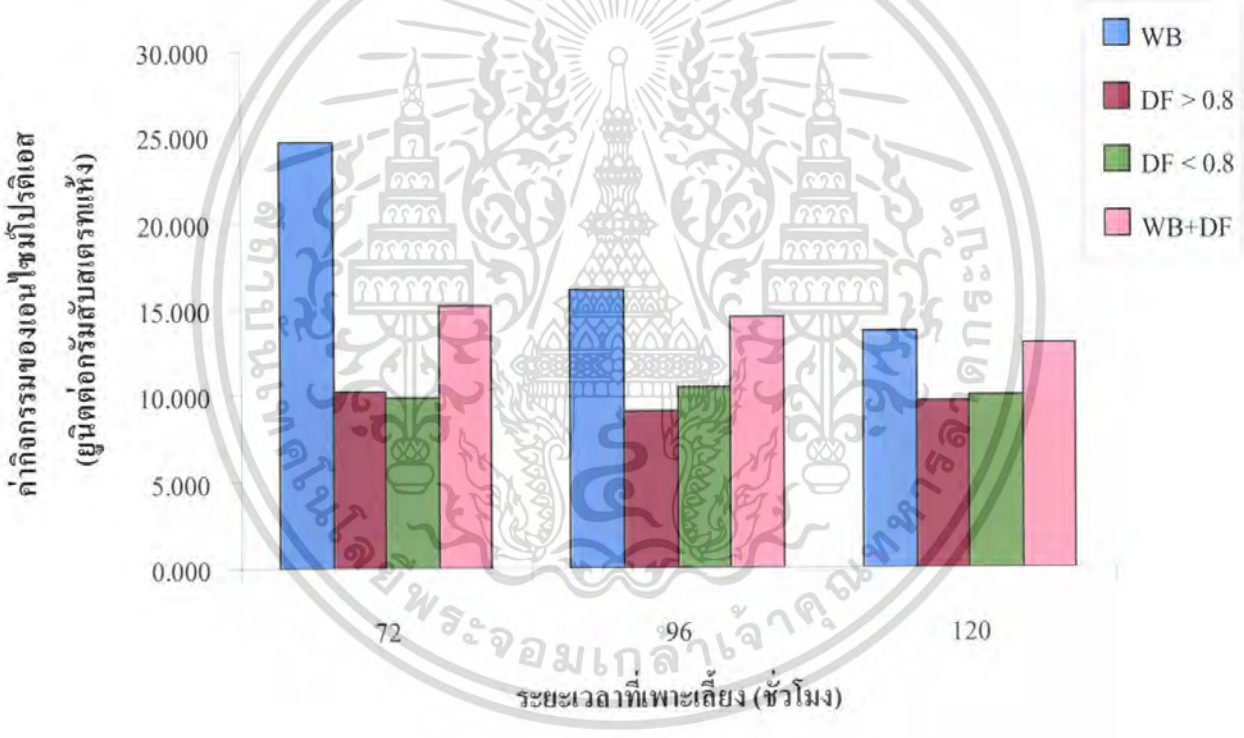
รูปที่ 4.3 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆได้แก่ ก. รำข้าวสาลี (WB) ข. กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และ ค. รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง บนอาหาร Skim milk agar

4.2 การหาชนิดของสับสเตรทและระยะเวลาเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

สับสเตรทที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรามีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อราและการสร้างเมตาบอไลต์ (Metabolite) ต่างๆ เนื่องจากสับสเตรทเป็นทั้งแหล่งที่ให้ทั้งสารอาหารและพลังงานแก่เชื้อรา (Pandey และคณะ, 2001) ได้ทำการทดลองโดยใช้สับสเตรท 4 ชุดการทดลองได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลี (Wheat bran) (รูปที่ ฉ2 ภาคผนวก ฉ) ชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร (รูปที่ ฉ3 ภาคผนวก ฉ) ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร (รูปที่ ฉ4 ภาคผนวก ฉ) และชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และนำทุกชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ดังรูปที่ ฉ5, ฉ6 และ ฉ7 (ภาคผนวก ฉ) ตามลำดับ จากรูปที่ 4.4 ตารางที่ จ3 (ภาคผนวก จ) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus* ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 24.656 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้งโดยวิธี Sulfanilamide azocasein รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์มากกว่า 0.8 มิลลิเมตร และชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 15.233, 10.311 และ 9.906 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลี ชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์น้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 16.189, 14.483, 10.539 และ 9.100 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ และที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 รำข้าวสาลี ชุดการทดลองที่ 4 รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ชุดการทดลองที่ 3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์น้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และชุดการทดลองที่ 2 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 13.650, 12.994, 10.089 และ 9.672 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* TISTR 3001 เพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร(DF > 0.8) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร(DF < 0.8) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ที่ระยะเวลา 72, 96 และ120 ชั่วโมงตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำค่ากิจกรรมที่ได้คำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 16.0 for Windows และโปรแกรม MINITAB 13.0 พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* ด้วยรำข้าวสาลี เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 24.656 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้งโดยวิธี Azocasein sulfanilamide โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* ด้วยกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุดโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ดังตารางที่ 4.1 และตารางที่ จ3 (ภาคผนวก จ)

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้โดยใช้สับสเตรทต่างๆ เป็นเวลา 72, 96 และ120 ชั่วโมง

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง(ชั่วโมง)	สับสเตรท*	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์** (Unit/gds)
72	WB	24.656[a]
	DF > 0.8	10.311[c]
	DF < 0.8	9.906[c]
	WB+DF	15.233[b]
96	WB	16.189[b]
	DF > 0.8	9.100[c]
	DF < 0.8	10.539[c]
	WB+DF	14.483[b]
120	WB	13.711[b]
	DF > 0.8	9.672[c]
	DF < 0.8	10.089[c]
	WB+DF	12.994[bc]

หมายเหตุ * การผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร (DF > 0.8) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF < 0.8) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และ รำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ที่ระยะเวลา 72, 96 และ120 ชั่วโมงตามลำดับ

** ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่ารำข้าวสาลีที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ ฉ8 ภาคผนวก ฉ) เป็นสับสเตรทที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด เนื่องจาก รำข้าวสาลีเป็นแหล่งที่ผลิตคาร์บอนที่ดี นอกจากนี้ยังเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเนื่องจากมีช่องอากาศทำให้ราสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีรายงานที่ได้สนับสนุนผลการทดลองนี้ คือ Pandey และคณะ (2003) พบว่ารำข้าวสาลีเป็นทางเลือกแรกที่นำมาใช้สำหรับการศึกษา และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ยังมีรายงานที่กล่าวในทางตรงกันข้ามโดย Ikasari and Mitchell (1994) ซึ่งพบว่า รำข้าว (Rice bran) สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด

Sandhya และคณะ (2004) ได้รายงานว่า รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทที่ให้ผลผลิตดีที่สุดในอาหารแข็งโดยจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตจากสับสเตรทชนิดอื่นๆ และเมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของเวลาในการบ่มพบว่า เมื่อทำการบ่มอาหารแข็งเป็นเวลา 1 วันจนถึง 6 วัน นั้นเมื่อ 72 ชั่วโมงแรก จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และเมื่อทำการบ่มต่อในอาหารแข็งอีก 72 ชั่วโมงจะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็วโดยให้ผลการทดลองที่คล้ายกับผลการทดลองที่รายงานโดย Agarwal และคณะ (2004) พบว่า *Penicillium* sp.ในอาหารแข็งจะให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดภายหลัง 24 ชั่วโมงโดยแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดลองอาจเนื่องมาจากการใช้ เชื้อราคนละสายพันธุ์

Ikasari and Michell (1994) ได้รายงานว่าเมื่อทำการศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *R. oligosporus* บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ จะพบผลผลิตเอนไซม์มากที่สุดในอาหารรำข้าว (Rice bran) เมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแตกต่างจากการทดลองที่ได้ทำการทดลองที่พบว่ารำข้าวสาลีให้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด

Velera และคณะ (2005) ได้รายงานว่ารำข้าวสาลีเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการให้ผลผลิตมากที่สุดเมื่อเทียบกับ กากชานอ้อย บาร์เล ถั่วเหลืองบด ถั่วเขียว รำข้าว และผลไม้เหลือทิ้ง โดยนำรำข้าวสาลีที่มีขนาด 0.3 ถึง 0.5 มิลลิเมตร มีความชื้นร้อยละ 60 และมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 มาทำการศึกษา

จากผลการทดลองกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาต่างๆ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณน้อยซึ่งไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจึงทำการเลือกรำข้าวสาลีที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมงเป็นสับสเตรทที่ดีในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะอาหารแข็งมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรทโดยใช้วิธี Kjeldahl แสดงดังตารางที่ จ1 (ภาคผนวก จ) พบว่า รำข้าวสาลีมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 14.95 และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 39.45

4.4 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *R. oligosporus* TISTR 3001

4.4.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

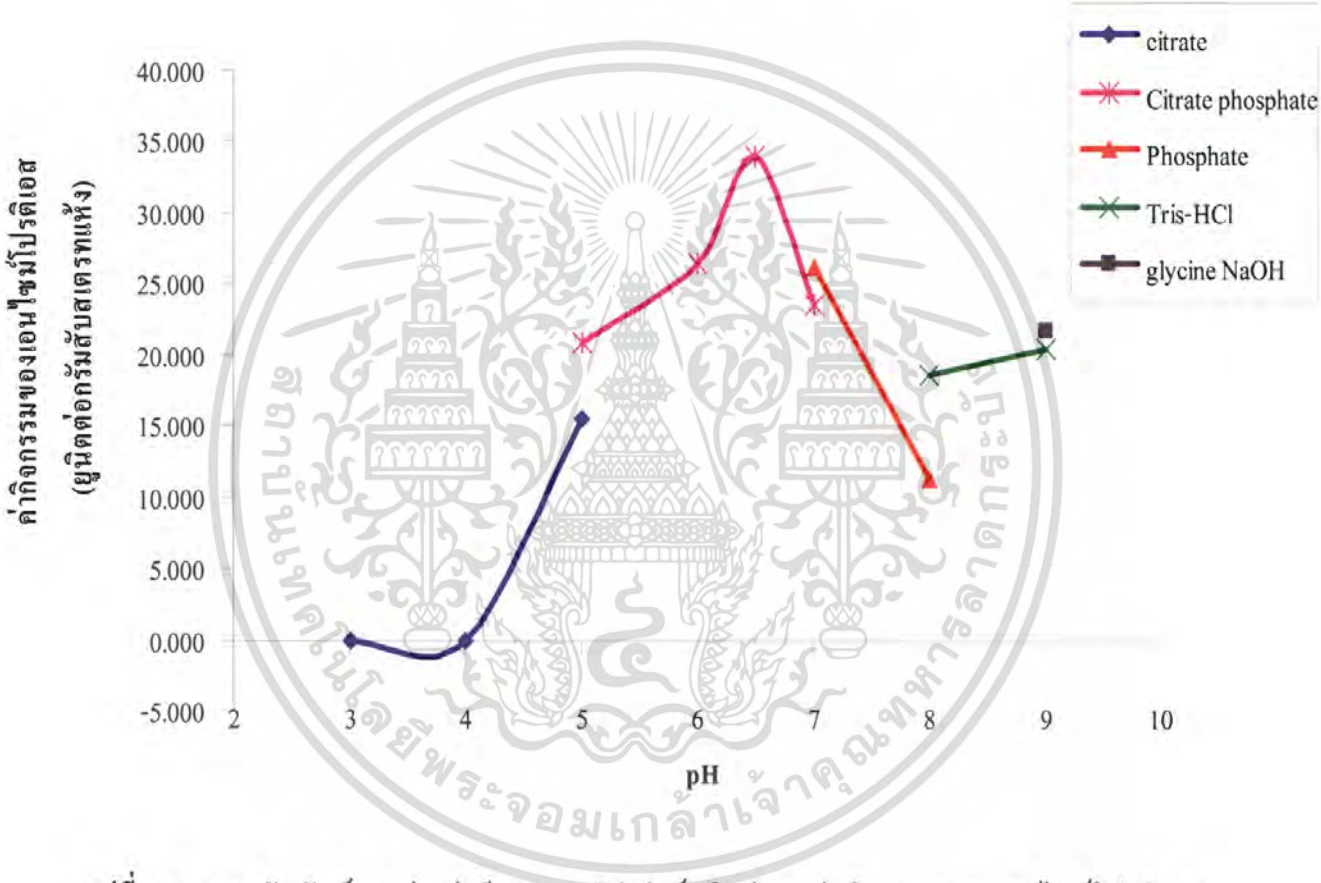
จากการทดลองที่ 4.2 พบว่ารำข้าวสาลี (WB) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เป็นสับสเตรทและเวลาที่เหมาะสมที่สุด จึงนำมาใช้ในการศึกษาผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จากรูป 4.5 ตารางที่ จ4 (ภาคผนวก จ) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *R. oligosporus* สามารถทำงานได้ดีที่ Citrate- phosphate buffer ที่พีเอช 6.5 มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 33.494 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง เมื่อใช้ buffer ชนิดอื่นคือ Citrate buffer ที่พีเอช 3.0 และ 4.0 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และ Citrate buffer ที่พีเอช 5.0 พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 15.511 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง เมื่อใช้ Citrate-phosphate buffer ที่พีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 20.794, 26.450 และ 23.494 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ เมื่อใช้ Phosphate buffer ที่พีเอช 7.0 และ 8.0 พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 26.183 และ 11.156 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับเมื่อใช้ Tris-HCl buffer ที่พีเอช 8.0 และ 9.0 พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 18.544 และ 20.378 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ และ Glycine NaOH buffer ที่พีเอช 9.0 พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 21.661 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ

จึงทำการเลือกใช้ Citrate-phosphate buffer ที่พีเอช 6.5 ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสด้วยวิธีซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีนต่อไป

Ikasari and Michell (1996) ได้รายงานว่าช่วงค่าพีเอชที่สูงที่สุดเมื่อทำการหมักรำข้าวจากเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถเก็บเกี่ยว (Recovery) และให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 และที่ค่าพีเอชเท่ากับ 9.0 เอนไซม์โปรติเอสสามารถเก็บเกี่ยว (Recovery) และให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเพียงร้อยละ 16 เท่านั้น Ikasari and Michell ยังได้รายงานถึงความสามารถในการละลายของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับการทำปฏิกิริยาต่อความมีขั้วร่วมกับเฟสของน้ำ และการลดลงใกล้จุดไอโซอิเล็คทริก (Isoelectric) ของเอนไซม์ จุดไอโซอิเล็คทริกของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Rhizopus* จะเป็นไปได้น้อยกว่า 1 จุด เนื่องจากขึ้นอยู่กับกลุ่มของเปปซินอันซึ่งต้องการอธิบายความสามารถในการละลายลดลงร่วมกับการลดลงของค่าพีเอช Ikasari

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and Michell ยังได้รายงานถึงอิทธิพลของค่าพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus* ที่ค่าพีเอชในช่วง 1.5-11.0 พบว่าที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงที่ค่า พีเอชเท่ากับ 5.0 และจะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ขึ้นไป โดยมีความแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการศึกษาที่พบว่าค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตั้งแต่พีเอชเท่ากับ 4.0 จนสูงที่สุดเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 จากนั้นจะลดต่ำลง ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่ได้ทำการศึกษา



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. oligosporus* ได้แก่ Citrate buffer pH 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 : Citrate phosphate buffer pH 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0 : Phosphate buffer pH 7.0 และ 8.0 : Tris-HCl buffer pH 8.0 และ 9.0 และ Glycine NaOH buffer pH 9.0

Wang and Hesseltine (1965) พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *R. oligosporus* ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 ถึง 3.0 รองลงมาคือค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 เอนไซม์โปรติเอสจะสูญเสียสภาพ (denatured) อย่างรวดเร็วเมื่อเข้าใกล้ค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 Wang and Hesseltine (1970) ความเข้มข้นของสับสเตรท และบัฟเฟอร์ที่ใช้แต่ละชนิดในการวิเคราะห์ส่วนผสมสามารถอธิบาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างของค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุด แต่ไม่สามารถบอกถึงค่ากิจกรรมที่สูงที่สุดของแต่ละพีเอชได้ (Scopes, R.K., 1987 และ Keay, L., 1992) โดยให้ผลการทดลองจากการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดที่ได้ทำการทดลองแตกต่างกันแต่มีความคล้ายคลึงกันจากผลการทดลองคือเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็ว

Tunga และคณะ (2003) ได้รายงานว่าเมื่อทำการทดลองหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าค่าพีเอชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือพีเอชเท่ากับ 8.0 เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าพีเอชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และเมื่อค่าพีเอชสูงมากขึ้นหรืออยู่ในสภาวะด่างที่ค่าพีเอชเท่ากับ 12.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าพีเอชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดลองที่ให้ค่าพีเอชสูงที่สุดที่ 6.5 เมื่อพีเอชเท่ากับ 5.0 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสยังสูงขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อพีเอชเท่ากับ 7.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็วทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำการทดลองแตกต่างกัน

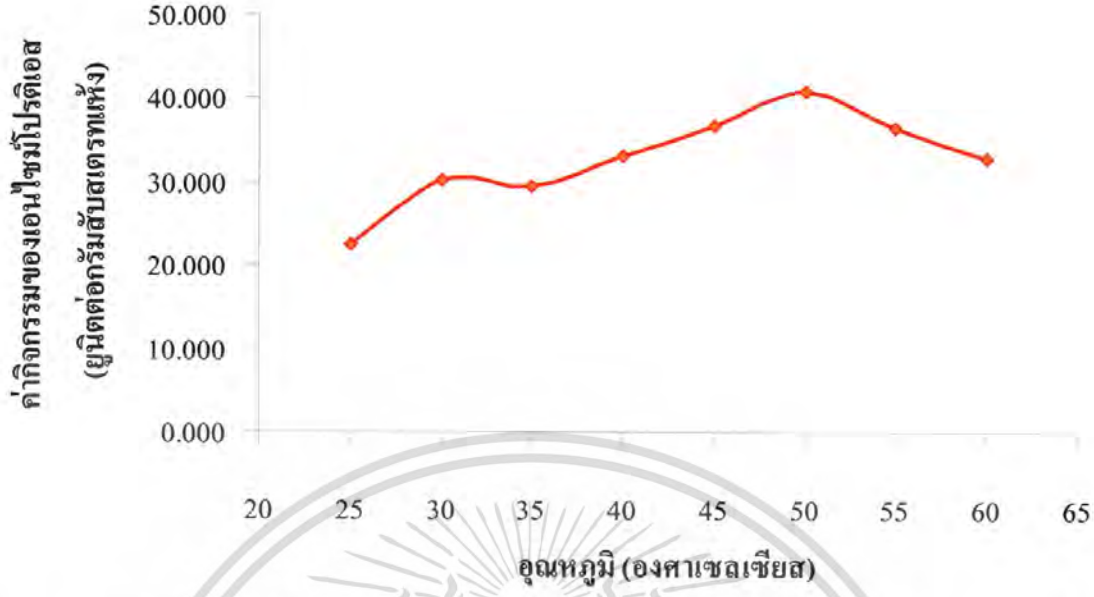
Kumar และคณะ (2005) ได้รายงานว่าเมื่อทำการทดลองหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่ค่าพีเอชระหว่าง 4 ถึง 9 พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดจาก *Rhizopus oryzae* คือพีเอชเท่ากับ 5.5 และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดลองอาจเนื่องมาจากเชื้อราคนละสายพันธุ์

4.4.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียสโดยใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลอง 4.4.1 คือ Citrate-phosphate buffer pH 6.5 แสดงผลดังรูปที่ 4.6 ตารางที่ จ5 (ภาคผนวก จ) พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 40.856 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง และที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 22.572, 30.139, 29.511, 33.111, 36.633, 36.378 และ 32.839 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง ตามลำดับ

จึงทำการเลือกอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus* ที่ 25, 30, 40, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Ikasari and Michell (1996) ได้ทำการทดลองหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิเคราะห์อิทธิพลของอุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่ำสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และจะลดลงที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส โดยมีความใกล้เคียงกันกับการทดลองที่ได้ทำการทดลองซึ่งให้ อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสดีที่สุด และต่ำสุดที่ 25 องศาเซลเซียส

Wang and Hesseltine (1965) ได้รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R oligosporus* จะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงยิ่งขึ้นเมื่อทำการบ่มเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *R. oligosporus* ที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 30 นาทีจะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอย่างสมบูรณ์ การไฮโดรไลซิสพันธะเปปไทด์ และการสูญเสียสภาพธรรมชาติทำให้อุณหภูมิไม่สามารถถูกกระตุ้นให้กลับมามีกิจกรรมของแอซิดโปรติเอสได้อีกเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการทดลองที่ได้ทำการศึกษา

Tunga และคณะ (2003) ได้รายงานว่าเมื่อทำการศึกษาที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 พบว่าอุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียสให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดลองอาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของเชื้อราโดย Tunga และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษา เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* KGJR 3313 และ MTCC 3558 ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar และคณะ (2005) ได้รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสจาก *R. oryzae* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ทำการทดลองที่พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสสามารถทำงานได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้นโดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้ (Crude enzyme) จากสับสเตรททั้ง 3 ชนิด ได้แก่ รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) หยดลงบนอาหารแข็ง Skim milk บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาบ่มแตกต่างกัน พบว่า รำข้าวสาลี (WB) ที่บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะให้ขนาดของวงใสมากที่สุด คือ 2.7 เซนติเมตร

2) ในการหาชนิดของสับสเตรท ระยะเวลาเหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และนำค่ากิจกรรมที่ได้คำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 16.0 for Windows และ โปรแกรม MINITAB 13.0 พบว่า รำข้าวสาลี (WB) ที่บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด คือ 24.656 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้งโดยวิธี Sulfanilamide Azocasein โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* ด้วยกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุดโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

3) จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรทโดยวิธี Kjeldahl พบว่า รำข้าวสาลีมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 14.95 และ กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 39.45

4) ในการทดสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *R. oligosporus* สามารถทำงานได้ดีที่ Citrate- phosphate buffer ที่พีเอช 6.5 มีค่า กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 33.494 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

5) ในการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 40.856 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลจากการวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษา และพัฒนาเพื่อนำเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ในประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะอาหารแข็ง และการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย หากมีการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์โดยการทำให้สารละลายเอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น เช่นวิธีการแช่เยือกแข็ง (Lyophilize), Reverse osmosis, Ultrafiltration เป็นต้น และการทำเอนไซม์โปรติเอสให้บริสุทธิ์มากขึ้น เช่น Gel filtration และ Chromatography ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมต่อไปได้ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น

เอนไซม์ที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่ใช้สับสเตรทจากรำข้าวสาลีซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี อีกทั้งยังเป็นกระบวนการผลิตแบบใช้อาหารแข็งทำให้ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตน้อย สามารถทำได้ง่าย ให้ผลผลิตในปริมาณมาก และเกิดของเสียจากการผลิตน้อยกว่าแบบอาหารเหลว ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านต่างๆ เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถให้เอนไซม์ในปริมาณที่มากกว่าการผลิตแบบอาหารเหลวอีกด้วย แต่เนื่องจากมีราคาค่อนข้างสูง จึงได้ทำการวิจัยโดยใช้สับสเตรทที่ผสมกันระหว่างรำข้าวสาลีและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันถั่วเหลือง โดยพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีพอสมควร ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้แทนกันได้หากต้องการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สมใจ ศิริโภค. 25-7. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2550. เทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

AOAC. 1990. Official Method 926.08, 925.09. Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.

AOAC. 2000. Official Method 984.13 (Copper catalyst kjeldahl Meyhod) for protein in animal feed. Official method of analysis of AOAC international. 17th ed. AOAC international.

Abraham, L.D. and Breuil, C. 1996. Isolation and characterization of a subtilisin-like serine protease secreted by the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *Enzyme Microb TECHNOL* 18 : 133-140.

Agarwal, 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.

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

Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., and Gharsallah, N. 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated Aspergillus clavatus ES1. *Process Biochemistry*. 42 : 791-797.

Ikasari, L., and Mitchell, D.A. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 10 : 320-4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ikasari, L., and Mitchell D.A. 1996. Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* 19 : 171-175

Ingold, C.T. and Hudson, H.j. 1993. The biology of fungi, 6th Ed., London, Chapman and Hall.

Keay, L. 1971. Microbial protease. *Process Biochem.* 6 : 17-21.

Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R. and Singh, R. 2004 . Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae* purification and characterization. *Process Biochemistry.* 40 : 1701-1705

Larcher, G., Bouchara, JP., Annaix, V., Symoens, F., Chabasse, F., and Tronchin, G. 1992. Purification and characterization of a fibrinogenolytic sarine protease from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett* 308 : 65-69.

Monod, M., Togni, G., Rahalison, L., and Frenk, E. 1991. Isolation and characterization of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus. J Med Microbial* 35 : 23-28.

Pandy, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., and Nigam. p. 1999. Solid-state fermentation for the production of industrial enzyme. *Curr. Sci.* : 149-162

Pandy, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Nigam, P., 2001. Solid-state Fermentation in Biotechnology., New Delhi : Asiatech Publishers Inc.

Reichard, U., Buttner, S., Eiffert, H., Staib, F., and Ruchel, R. 1990. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol* 33 : 243-251.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A. 2004. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 40 : 2689-2694.

Scopes, R.K. 1987. Protein Purification. Principles and Practice. 2nd Ed. New York : Springer-Verlag.

Sharma, O.P. 1989. Textbook of fungi, 1st Ed., New Delhi: Mc Graw-Hill.

Tremacoldi, C.R., Monti, R., Selistre-De-Araujo, H., and Carmona, E.C., 2007. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus. World J Microbiol Biotechnol* 23 : 295-299.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Valera, H.R., Gomesa, J., Lakshmi, S., Gururaja, A., Suryanarayan, S., and Kumarc, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme and Microbial Technology*. 37 : 521–526.

Varzakas, T. 1998. Rhizopus oligosporus mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. *Process Biochemistry*. 33 : 741-747.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus* . *Can. J. Microbiol*. 11 : 727-732.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1970. Mutiple forms of *Rhizopus oligosporus* protease. *Arch. Biochem. Biophys*. 140 : 459-463.

Wang, SL., Chen, YH., Wang, CL., Yen, YH., and Chern, MK. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigratus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb Technol* 36 : 660-665.

Xin-Mei Feng. 2006. Microbial dynamics during barley tempeh fermentation. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Department of Microbiology, Uppsala.

http:// pics.livejournal.com

http://www.agro.cmu.ac.th

http://www.breadmachinedigest.com

http://www.foerstner.orgkonradbcoimgProtease-Kallotte.png

http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_Fs002-47.pdf

http://www.soya.be/pictures/tempeh.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Potato Dextrose Agar, PDA)

มันฝรั่ง	200 กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	20 กรัม
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปรับ pH ระหว่าง 5.0 – 5.5

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim Milk Agar (ดัดแปลงจาก Saran และคณะ 2007)

Skim milk	20	กรัม
วุ้น (Agar)	20	กรัม
Phosphate buffer พีเอช 7.0	600	มิลลิลิตร

ทำการเตรียมโดยนำ Skim milk 20 กรัมละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร และวุ้น (Agar) 20 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร และนำวุ้นเทรวมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. สารเคมี

1.1 สารละลายซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน (Sulfanilamide azocasein) ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายซัลฟานิลาไมด์อะโซเคซีน 0.1 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์แต่ละพีเอช ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร

ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 1

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 58.44 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2. บัฟเฟอร์

2.1 Citrate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข ดังนี้

สารละลาย ก : ทำการละลาย Citric acid ปริมาณ 19.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์)

สารละลาย ข : ทำการละลาย Sodium Citrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) ปริมาณ 29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์)

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 3.0 สารละลาย ก 46.5 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 3.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 4.0 สารละลาย ก 33.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 17.0 มิลลิลิตร

pH 5.0 สารละลาย ก 20.5 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 29.5 มิลลิลิตร

pH 6.0 สารละลาย ก 9.5 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 41.5 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2 Citrate-Phosphate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข ดังนี้

สารละลาย ก : ทำการละลาย Citric acid ปริมาณ 19.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์)

สารละลาย ข : ทำการละลาย Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ปริมาณ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์)

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 5.0 สารละลาย ก 24.3 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 25.7 มิลลิลิตร

pH 6.0 สารละลาย ก 17.9 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 32.1 มิลลิลิตร

pH 7.0 สารละลาย ก 6.5 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 43.6 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.3 Phosphate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข ดังนี้

สารละลาย ก : ทำการละลาย Monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4) ปริมาณ 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์)

สารละลาย ข : ทำการละลาย Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$) ปริมาณ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ ปริมาณ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์)

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH 7.0 สารละลาย ก 39.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 61.0 มิลลิลิตร

pH 8.0 สารละลาย ก 5.3 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 94.7 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

2.4 Tris-HCl Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข ดังนี้

สารละลาย ก : ทำการละลาย Tris (hydroxyl methyl) aminomethane ปริมาณ 24.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์)

สารละลาย ข : 0.2 M HCl

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 8.0 สารละลาย ก 50.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 26.8 มิลลิลิตร

pH 9.0 สารละลาย ก 50.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 5.0 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

2.5 Glycine-NaOH Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข ดังนี้

สารละลาย ก : ทำการละลาย glycine ปริมาณ 15.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์)

สารละลาย ข : 0.2 โมลาร์ NaOH

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 9.0 สารละลาย ก 50.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 8.8 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเตรท

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสับสเตรท (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 กลายเป็นแอมโมเนียมบอเรท

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

น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ = D กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

รายงานการวิเคราะห์สารอาหารในกากถั่วเหลืองเมล็ดนอก

ANALYSIS REPORT

จากกากถั่วเหลืองที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก 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)

ตารางที่ ง1 รายงานการวิเคราะห์สารอาหารในกากถั่วเหลืองเมล็ดนอก

Analysis	Result
1. Moisture %	11.70
2. Oil Content %	1.29
3. Protein %	45.41
4. Urease Activity pH	0.08
5. Ash %	6.86
6. Crude Fiber %	6.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

ตารางที่ จ1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสับสเตรท

สับสเตรท	น้ำหนักตัวอย่าง (s)	ปริมาตรของ HCl (ml)			ความเข้มข้นของ HCl	ร้อยละของปริมาณโปรตีน	
		ml (s)	ml (b)	ml (s-b)			เฉลี่ย
WB	0.5106	4.40	0	4.40	0.2112	14.53	14.95
	0.5486	5.00	0	5.00	0.2112	15.37	
DF	0.5234	12.30	0	12.30	0.2112	39.63	39.45
	0.5325	12.40	0	12.40	0.2112	39.27	

ตารางที่ จ2 ขนาดของวงใส ที่หยดสารสกัดเอนไซม์ (Crude enzyme) จากการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆได้แก่ รำข้าวสาลี (WB) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (DF) และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (WB+DF) ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ บนอาหาร Skim milk agar

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	สับสเตรท	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (เซนติเมตร)				
		1	2	3	4	เฉลี่ย
72	WB	3.0	3.1	2.3	2.4	2.700
	DF	1.4	1.6	1.3	1.4	1.425
	WB+DF	1.8	1.9	1.6	1.6	1.725
96	WB	2.1	2.0	1.6	1.4	1.775
	DF	1.8	1.7	1.4	1.4	1.575
	WB+DF	1.6	2.0	1.6	1.6	1.700
120	WB	1.4	1.3	1.4	1.2	1.313
	DF	1.5	1.4	1.7	1.6	1.550
	WB+DF	1.5	1.5	1.3	1.2	1.375

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งชนิดต่างๆ

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	สับสเตรท	ปริมาณสับสเตรท	ค่าการดูดกลืนแสง 440nm							RE-EC	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์* (Unit/gds)
			ปฏิกิริยาควบคุม (EC)			ปฏิกิริยา (RE)					
			1	2	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย		
72	WB	10	0.316	0.308	0.312	1.081	1.054	1.020	1.052	0.740	24.656[a]
	DF > 0.8	10	0.135	0.137	0.136	0.439	0.451	0.446	0.445	0.309	10.311[c]
	DF < 0.8	10	0.142	0.141	0.142	0.465	0.425	0.426	0.439	0.297	9.906[c]
	WB+DF	10	0.222	0.284	0.253	0.680	0.711	0.739	0.710	0.457	15.233[b]
96	WB	10	0.317	-	0.317	0.795	0.796	0.817	0.803	0.486	16.189[b]
	DF > 0.8	10	0.146	0.132	0.139	0.396	0.426	0.414	0.412	0.273	9.100[c]
	DF < 0.8	10	0.145	0.154	0.150	0.466	0.467	0.464	0.466	0.316	10.539[c]
	WB+DF	10	0.201	0.210	0.206	0.715	0.632	0.573	0.640	0.435	14.483[b]
120	WB	10	0.301	0.319	0.310	0.737	0.702	0.725	0.721	0.411	13.711[b]
	DF > 0.8	10	0.149	0.144	0.147	0.440	0.444	0.426	0.437	0.290	9.672[c]
	DF < 0.8	10	0.147	0.157	0.152	0.435	0.489	0.440	0.455	0.303	10.089[c]
	WB+DF	10	0.218	0.239	0.229	0.620	0.620	0.615	0.618	0.390	12.994[bc]

หมายเหตุ * ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ จ4 ผลการศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำการเพาะเลี้ยงในรำข้าวสาลี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

บัฟเฟอร์	pH	ค่าการดูดกลืนแสง 440nm							RE-EC	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/gds)
		ปฏิกิริยาควบคุม (EC)			ปฏิกิริยา (RE)					
		1	2	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย		
Citrate	3	0.099	0.100	0.0995	0.084	0.086	0.086	0.0853	0.0000	0.000
	4	0.099	0.102	0.1005	0.094	0.095	0.103	0.0973	0.0000	0.000
	5	0.256	0.286	0.2710	0.705	0.739	0.765	0.7363	0.4653	15.511
Citrate phosphate	5	0.177	0.204	0.1905	0.814	0.821	0.808	0.8143	0.6238	20.794
	6	0.184	0.197	0.1905	1.047	0.921	0.984	0.9840	0.7935	26.450
	6.5	0.245	0.274	0.2595	1.247	1.316	1.273	1.2787	1.0192	33.972
	7	0.203	0.202	0.2025	0.930	0.902	0.890	0.9073	0.7048	23.494
Phosphate	7	0.172	0.183	0.1775	0.940	1.013	0.936	0.9630	0.7855	26.183
	8	0.957	1.453	1.2050	1.561	1.514	1.544	1.5397	0.3347	11.156
Tris-HCl	8	0.185	0.205	0.1950	0.739	0.768	0.747	0.7513	0.5563	18.544
	9	0.220	0.198	0.2090	0.878	0.741	0.842	0.8203	0.6113	20.378
Glycine NaOH	9	0.191	0.192	0.1915	0.851	0.839	0.834	0.8413	0.6498	21.661

ตารางที่ จ5 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำการเพาะเลี้ยงในรำข้าวสาลี เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าการดูดกลืนแสง440nm							RE-EC	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/gds)
	ปฏิกิริยาควบคุม (EC)			ปฏิกิริยา (RE)					
	1	2	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย		
25	0.249	0.252	0.2505	0.878	0.969	0.936	0.9277	0.6772	22.572
30	0.262	0.357	0.3095	1.057	1.172	1.412	1.2137	0.9042	30.139
35	0.291	0.327	0.3090	1.116	1.235	1.232	1.1943	0.8853	29.511
40	0.262	0.248	0.2550	1.313	1.315	1.117	1.2483	0.9933	33.111
45	0.296	0.314	0.3050	1.424	1.382	1.406	1.4040	1.0990	36.633
50	0.274	0.26	0.2670	1.485	1.468	1.525	1.4927	1.2257	40.856
55	0.25	0.306	0.2780	1.378	1.315	1.415	1.3693	1.0913	36.378
60	0.246	0.247	0.2465	1.223	1.23	1.242	1.2317	0.9852	32.839

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ6 การแปลผลจากการวิเคราะห์ค่าสถิติ การโปรแกรม SPSS 16.0

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	633.708[a]	11	57.610	68.176	.000
Intercept	6152.572	1	6152.572	7.281E3	.000
Time	74.140	2	37.070	43.869	.000
Substrate	425.550	3	141.850	167.866	.000
Time * Substrate	134.019	6	22.336	26.433	.000
Error	20.280	24	.845		
Total	6806.561	36			
Corrected Total	653.989	35			

a. R Squared = .969 (Adjusted R Squared = .955)

ตารางที่ จ7 การแปลผลจากการวิเคราะห์ค่าสถิติ การโปรแกรม MINITAB 13.0

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมแล้วจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการจัดกลุ่มโดยเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจากน้อยไปมาก และดูจากค่า P-Value ของแต่ละชุดข้อมูลว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) หรือไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

```
Bonferroni Simultaneous Tests
Response Variable activity
All Pairwise Comparisons among Levels of time*substrate

time      = 1
substrate = 1 subtracted from:

Level              Difference       SE of              Adjusted
time*substrate        of Means  Difference   T-Value    P-Value
1     2               -14.34      0.7506    -19.11     0.0000
1     3               -14.75      0.7506    -19.65     0.0000
1     4                -9.42      0.7506    -12.55     0.0000
2     1                -8.46      0.7506    -11.28     0.0000
2     2               -15.55      0.7506    -20.72     0.0000
2     3               -14.12      0.7506    -18.81     0.0000
2     4               -10.17      0.7506    -13.55     0.0000
3     1               -10.94      0.7506    -14.58     0.0000
3     2               -14.98      0.7506    -19.96     0.0000
3     3               -14.57      0.7506    -19.41     0.0000
3     4               -11.66      0.7506    -15.54     0.0000
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

time = 1
substrate = 2 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
1 3	-0.407	0.7506	-0.542	1.0000
1 4	4.923	0.7506	6.560	0.0001
2 1	5.880	0.7506	7.834	0.0000
2 2	-1.207	0.7506	-1.608	1.0000
2 3	0.227	0.7506	0.302	1.0000
2 4	4.173	0.7506	5.560	0.0007
3 1	3.400	0.7506	4.530	0.0091
3 2	-0.637	0.7506	-0.848	1.0000
3 3	-0.223	0.7506	-0.298	1.0000
3 4	2.683	0.7506	3.575	0.1009

time = 1
substrate = 3 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
1 4	5.3300	0.7506	7.101	0.0000
2 1	6.2867	0.7506	8.376	0.0000
2 2	-0.8000	0.7506	-1.066	1.0000
2 3	0.6333	0.7506	0.844	1.0000
2 4	4.5800	0.7506	6.102	0.0002
3 1	3.8067	0.7506	5.072	0.0023
3 2	-0.2300	0.7506	-0.306	1.0000
3 3	0.1833	0.7506	0.244	1.0000
3 4	3.0900	0.7506	4.117	0.0259

time = 1
substrate = 4 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2 1	0.957	0.7506	1.275	1.0000
2 2	-6.130	0.7506	-8.167	0.0000
2 3	-4.697	0.7506	-6.258	0.0001
2 4	-0.750	0.7506	-0.999	1.0000
3 1	-1.523	0.7506	-2.030	1.0000
3 2	-5.560	0.7506	-7.408	0.0000
3 3	-5.147	0.7506	-6.857	0.0000
3 4	-2.240	0.7506	-2.984	0.4250

time = 2
substrate = 1 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2 2	-7.087	0.7506	-9.442	0.0000
2 3	-5.653	0.7506	-7.532	0.0000
2 4	-1.707	0.7506	-2.274	1.0000
3 1	-2.480	0.7506	-3.304	0.1968
3 2	-6.517	0.7506	-8.682	0.0000
3 3	-6.103	0.7506	-8.132	0.0000
3 4	-3.197	0.7506	-4.259	0.0180

time = 2
substrate = 2 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2 3	1.4333	0.7506	1.9097	1.0000
2 4	5.3800	0.7506	7.1680	0.0000
3 1	4.6067	0.7506	6.1376	0.0002
3 2	0.5700	0.7506	0.7594	1.0000
3 3	0.9833	0.7506	1.3101	1.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3	4	3.8900	0.7506	5.1828	0.0017

time = 2
substrate = 3 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
2 4	3.9467	0.7506	5.258	0.0014
3 1	3.1733	0.7506	4.228	0.0195
3 2	-0.8633	0.7506	-1.150	1.0000
3 3	-0.4500	0.7506	-0.600	1.0000
3 4	2.4567	0.7506	3.273	0.2123

time = 2
substrate = 4 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
3 1	-0.773	0.7506	-1.030	1.0000
3 2	-4.810	0.7506	-6.409	0.0001
3 3	-4.397	0.7506	-5.858	0.0003
3 4	-1.490	0.7506	-1.985	1.0000

time = 3
substrate = 1 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
3 2	-4.037	0.7506	-5.378	0.0011
3 3	-3.623	0.7506	-4.827	0.0043
3 4	-0.717	0.7506	-0.955	1.0000

time = 3
substrate = 2 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
3 3	0.4133	0.7506	0.5507	1.0000
3 4	3.3200	0.7506	4.4233	0.0119

time = 3
substrate = 3 subtracted from:

Level time*substrate	Difference of Means	SE of Difference	T-Value	Adjusted P-Value
3 4	2.907	0.7506	3.873	0.0479

Descriptive Statistics: activity by Group

Variable	Group	N	Mean	Median	TrMean	StDev
activity	1	3	24.653	24.730	24.653	1.017
	2	3	10.310	10.330	10.310	0.201
	3	3	9.903	9.480	9.903	0.759
	4	3	15.233	15.270	15.233	0.986
	5	3	16.190	15.970	16.190	0.416
	6	3	9.103	9.170	9.103	0.503
	7	3	10.537	10.550	10.537	0.051
	8	3	14.48	14.22	14.48	2.38
	9	3	13.710	13.830	13.710	0.589
	10	3	9.673	9.780	9.673	0.314
	11	3	10.087	9.600	10.087	0.994
	12	3	12.993	13.050	12.993	0.098

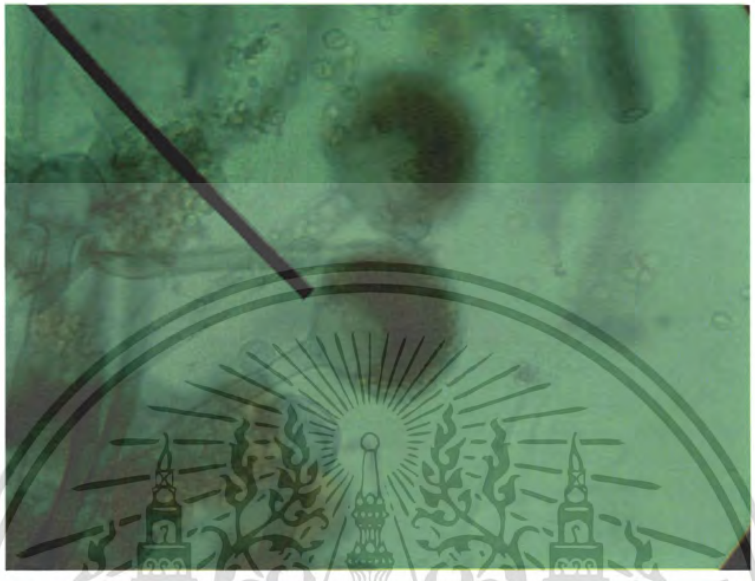
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Variable	Group	SE Mean	Minimum	Maximum	Q1	Q3
activity	1	0.587	23.600	25.630	23.600	25.630
	2	0.116	10.100	10.500	10.100	10.500
	3	0.438	9.450	10.780	9.450	10.780
	4	0.569	14.230	16.200	14.230	16.200
	5	0.240	15.930	16.670	15.930	16.670
	6	0.291	8.570	9.570	8.570	9.570
	7	0.030	10.480	10.580	10.480	10.580
	8	1.37	12.25	16.98	12.25	16.98
	9	0.340	13.070	14.230	13.070	14.230
	10	0.181	9.320	9.920	9.320	9.920
	11	0.574	9.430	11.230	9.430	11.230
	12	0.057	12.880	13.050	12.880	13.050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

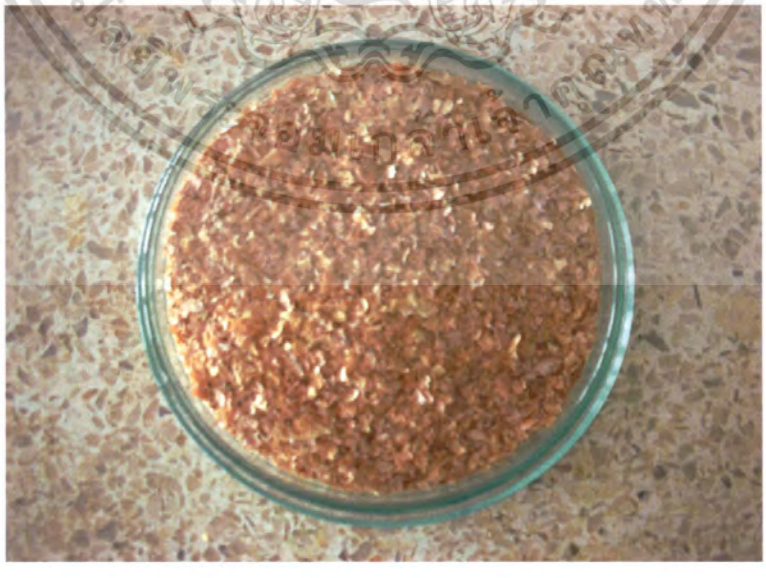
ภาคผนวก ฉ

รูปภาพ



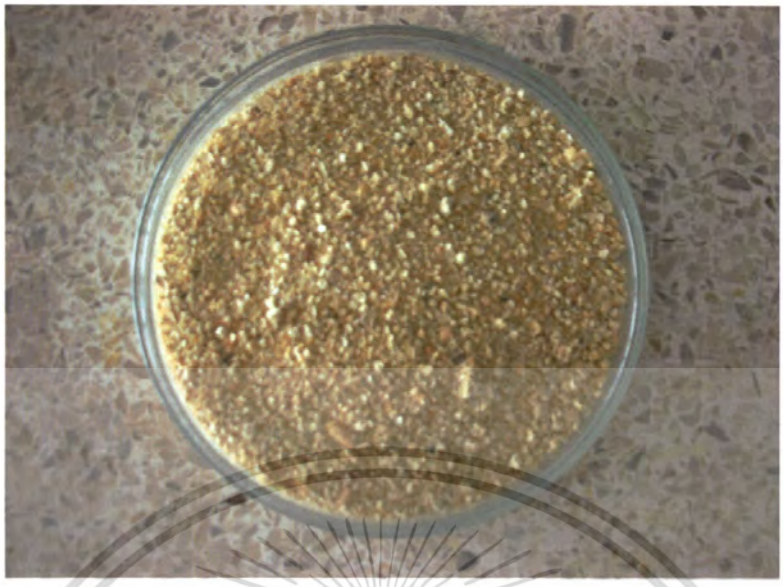
รูปที่ ฉ1 ลักษณะเซลล์ของ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2. ลักษณะของสับสเตรทที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ ฉ2 รำข้าวสาลี (Wheat bran) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ฉ3 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร

รูปที่ ฉ4 กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง

รูปที่ ฉ5 การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

รูปที่ ฉ6 การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ฉ7 การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ รำข้าวสาลี (Wheat bran) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (Defatted soybean) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.8 มิลลิเมตร และรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.8 มิลลิเมตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

รูปที่ ฉ8 ลักษณะเจริญของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 ที่เจริญบนรำข้าวสาลีซึ่งเป็นสับสเตรทที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

สูตรคำนวณ

1. 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 x 1 x 10^4 spores / ml

2. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นเริ่มต้นในสับสเทรต (AOAC., 1990)

2.1 อุปกรณ์

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

2.2 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

3. การคำนวณความชื้น

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

x = ปริมาณน้ำที่เติมลงในระบบการเพาะเลี้ยง

g = มวลของสับสเตรท

$\%Moisture_0$ = ปริมาณความชื้นเริ่มต้นในระบบการเพาะเลี้ยง

$\%Moisture_F$ = ปริมาณความชื้นสุดท้ายในระบบการเพาะเลี้ยง

4. วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธีของ Germano และคณะ (2003)

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (Unit/gds)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 nm x 1000 (µl) x ปริมาณ NaCl}}{\text{ปริมาณ Crude enzyme x ปริมาณของสับสเตรต}}$$

หมายเหตุ จากการทดลอง

- คูณด้วย 1000 ไมโครลิตร (µl) เพื่อปรับปริมาตรให้เป็นมิลลิลิตร
- ปริมาณ NaCl เท่ากับ 50 มิลลิลิตร
- ปริมาณของสับสเตรทที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง เท่ากับ 10 กรัม

หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จะมีหน่วยเป็น ยูนิตต่อกรัมสับสเตรตแห้ง

โดยหนึ่งหน่วยของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรเปลี่ยนแปลงไปในเวลา 1 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้