การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* โดยใช้ถังหมักแบบหมุน

Production of Cellulase from Copra Waste by *Trichoderma reesei* using Rotary Fermentor

นายกฤตนันท์ ธรรมรัตน์ชัย
นางสาวนารีรัตน์ เหล็กเพชร
นางสาวเสาวนิตย์ ไขสะอาด

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* โดยใช้ถังหมักแบบหมุน

Production of Cellulase from Copra Waste by *Trichoderma reesei* using Rotary Fermentor

นายกฤตนันท์ ธรรมรัตน์ชัย

นางสาวนารีรัตน์ เหล็กเพชร

นางสาวเสาวนิตย์ ไขสะอาด

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF CELLULASE FROM COPRA WASTE BY *TRICHODERMA REESEI* USING ROTARY FERMENTOR

MR. KITTANAN THAMMARATCHAI
MISS NAREERAT LEKPHET
MISS SAWWANIT KAISAARD

THIS THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF ENGINEERING
IN FOOD ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์ปีการศึกษา 2559

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เรื่อง การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* โดยใช้ถังหมักแบบหมุน

Production of Cellulase from Copra Waste by *Trichoderma reesei* using Rotary Fermentor

ผู้จัดทำ

1. นายกฤตนันท์ ธรรมรัตน์ชัย 56010021
2. นางสาวนารีรัตน์ เหล็กเพชร 56010675
3. นางสาวเสาวนิตย์ ไขสะอาด 56011378

.....

(ผศ.ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริญญานิพนธ์เรื่อง การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* โดยใช้ถังหมักแบบหมุน

โดย
1. นายกฤตนันท์ ธรรมรัตน์ชัย 56010021
2. นางสาวนารีรัตน์ เหล็กเพชร 56010675
3. นางสาวเสาวนิตย์ ไขสะอาด 56011378

ปริญญานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอาหาร
ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ

บทคัดย่อ

โครงงานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่กากมะพร้าวที่ผ่านการคั้นกะทิ โดยการนำมาใช้เป็นซับสเตรทในการหมักบนอาหารแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เราออกแบบการทดลองโดยการใช้กากมะพร้าวเป็นซับสเตรทในการหมักบนอาหารแข็งและใช้เชื้อ *Trichoderma reesei* ในผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การทดลองเริ่มจากศึกษาผลของการเติมรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี 4 อัตราส่วน ได้แก่ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี 3:2 ผลิตเอกโซกลูคาเนสและเอนโดกลูคาเนสได้สูงสุด เท่ากับ 0.27 ± 0.04, และ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ ขณะที่อัตราการเจริญของเชื้อรา และปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุด เมื่อเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:3 เท่ากับ 253.67 ± 14.96 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และ 0.46 ± 0.00 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ หลังจากนั้นได้ทำการหมักกากมะพร้าวที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:2 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 35 ลิตร เพื่อศึกษาอัตราการเติมอากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 vvm (ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของกากมะพร้าวต่อนาที) ความเร็วรอบ 6 รอบต่อนาที, ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าเป็น 30 °ซ พบว่าการเติมอากาศระหว่างหมักมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญของเชื้อรา และการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้น โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็น 0.46 ± 0.09, 0.31 ± 0.04 และ 0.54 ± 0.22 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ตามลำดับ และมีการเจริญของเชื้อราสูงสุด มีค่าปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 202.77 ± 87.17 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 3 ของการหมัก

คำสำคัญ: การหมักบนอาหารแข็ง, ถังหมักแบบหมุน, เอนไซม์เซลลูเลส, เชื้อรา *Trichoderma reesei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Tittle	Production of Cellulase from Copra Waste by *Trichoderma reesei* using Rotary Fermentor
Students	Mr. Kittanan Thammaratchai 56010021 Ms. Nareerat Lekphet 56010675 Ms. Sawwanit Kaisaard 56011378
Thesis for	Bachelor's Degree of Food Engineering Department of Food Engineering Faculty of Engineering King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year	2016
Advisor	Asst.Prof.Dr.Teerin Chysirichote

Abstract

This project aims to add value of copra waste obtained from coconut milk process by using it as a substrate for solid-state fermentation (SSF) of cellulase. We designed the process of fermentation of copra waste to produce cellulase by *Trichoderma reesei*. Firstly, we studied the effect of nitrogen source supplementary by adding wheat bran into copra waste with the ratio of 3:1, 3:2 and 3:3 and culturing at 30 °C for 7 days. The SSF was conducted in 250 mL Erlenmeyer flask and monitored the fungal growth by glucosamine measurement and the activity of cellulase consisting of exoglucanase endoglucanase and beta-glucosidase.The highest productions of exoglucanase (0.24 ± 0.02 U/g dry substrate) and endoglucanase (0.40 ± 0.02 U/g dry substrate) were obtained in the SSF of copra waste and wheat bran in the ratio of 3:2. While the highest fungal growth and beta–glucosidase were shown in the ratio of 3:3 as 253.67 ± 14.96 mg/g dry substrate, 0.46 ± 0.00 U/g dry substrate, respectively.Then we studied the SSF in the 35 rotary drum fermentor fermentation by using copra waste to wheat bran at the ratio of 3:2, forced aeration at 0.5, 1,0 and 1.5 vvm (volume of air/ volume substrate/ minute), inlet air Temperature 30 °C, rotating speed 6 rpm. The results show that the forced aeration increased the growth and the cellulase production. The highest were found in the SSF with aeration 1.0 vvm as 0.46 ± 0.09, 0.31 ± 0.04 and 0.54 ± 0.22 U/g dry substrate, respectively. Also, the SSF with 1.0 vvm aeration showed the highest fungal growth (202.77 ± 87.17 mg/g dry substrate) on the third day.

Keywords: Solid state fermentation, Rotary fermentor, cellulase, *Trichoderma reesei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุลวงไปด้วยดีโดยได้รับความกรุณาและความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ธีรินทร์ ฉายศิริโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาในการทำโครงงาน รวมทั้งได้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน จนโครงงานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณคณาจารย์ ประจำภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ทุกท่านสำหรับการให้คำแนะนำและแนวคิดต่างๆ ในการทำโครงงานนี้เพื่อให้โครงงานมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ คุณอำนาจ คูตะคุ (พี่แมน) คุณบุญนำ ผลโพธิ์ (พี่บุญนำ) คุณวราภรณ์ มาไพศาล ทรัพย์ (พี่นุ้ย) และคุณสุธัญญา ถาดนาค (พี่โอ๋) เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและธุรการภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านการดำเนินงานของโครงงาน

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อนๆนักศึกษา ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาต่างๆ รวมทั้งความช่วยเหลือ และคอยให้กำลังใจในการทำงานโครงงานนี้

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากปริญญานิพนธ์เล่มนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

คณะผู้วิจัย

นายกฤตนันท์ ธรรมรัตน์ชัย

นางสาวนารีรัตน์ เหล็กเพชร

นางสาวเสาวนิตย์ ไขสะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	X
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน	1
1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เชื้อรา (Fungi)	4
2.2 เชื้อรา *Trichoderma reesei*	6
2.3 เซลลูโลส	7
2.4 เซลลูเลส	9
2.5 การหมัก (Fermentation)	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
3.1 วัสดุอุปกรณ์	18
3.2 วิธีการดำเนินงาน	21
3.3 การวิเคราะห์	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	28
4.1 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน)	28
4.2 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราการเติมอากาศ	33
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	40
5.1 สรุปผลการทดลอง	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก องค์ประกอบของกากมะพร้าว 45

ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง 46

ข.1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน 46

ข.2 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer 47

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบ 48

ค.1 ความชื้น 48

ค.2 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์ 60

ค.3 การวัดปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์ 64

ภาคผนวก ง ถังหมัก 79

ง.1 ส่วนประกอบของถังหมัก 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่
2.1 สปีชีส์ของเชื้อรา *T. Reesei* 7
2.2 ข้อดีและข้อเสียของการหมักบนอาหารแข็งเมื่อ
เปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลว 11
2.3 แสดงการแปลงกลูแคนเป็นกลูโคสที่ซับสเตรทต่างกัน
(เอนไซม์ 15 FPU/กรัม; ซับเตรทร้อยละ 1.5 มวลต่อปริมาตร
; pH 4.8(สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์); 37 °ซ) 17
4.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ 29
4.2 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ 34
ก.1 องค์ประกอบของกากมะพร้าว 45
ค.1.1 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 1) 48
ค.1.2 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 2) 48
ค.1.3 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 3) 49
ค.1.4 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 49
ค.1.5 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 1) 50
ค.1.6 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 2) 50
ค.1.7 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 3) 51
ค.1.8 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 51
ค.1.9 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 1) 52
ค.1.10 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 2) 52
ค.1.11 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 3) 53
ค.1.12 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี
(แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค.1.13 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 1) 54
ค.1.14 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 2) 54
ค.1.15 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 3) 55
ค.1.16 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 55
ค.1.17 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1) 56
ค.1.18 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2) 56
ค.1.19 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 3) 56
ค.1.20 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด 57
ค.1.21 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1) 57
ค.1.22 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2) 57
ค.1.23 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง 58
ค.1.24 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด 58
ค.1.25 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก 58
ค.1.26 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2) 59
ค.1.27 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 3) 59
ค.1.28 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด 59
ค.2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

ค.2.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร) 61
ค.2.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร) 62
ค.2.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร) 63
ค.3.1 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 64
ค.3.2 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 65
ค.3.3 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 65
ค.3.4 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 66
ค.3.5 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm 66
ค.3.6 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm 67
ค.3.7 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm 67
ค.3.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 68
ค.3.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 68
ค.3.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 69
ค.3.11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 69
ค.3.12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 70
ค.3.13 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 70
ค.3.14 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูโคเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 71
ค.3.15 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

ค.3.16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 72

ค.3.17 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 72

ค.3.18 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 73

ค.3.19 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) 73

ค.3.20 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm 74

ค.3.21 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm 74

ค.3.22 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm 75

ค.3.23 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm 75

ค.3.24 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm 76

ค.3.25 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm 76

ค.3.26 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm 77

ค.3.27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm 77

ค.3.28 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมัก
ของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	วงจรการเจริญของเชื้อรา	5
2.2	ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* เมื่อมองด้วยตาเปล่าและลักษณะทางสัณฐาน	6
2.3	โครงสร้างของเซลลูโลส	8
2.4	โครงสร้างสายเซลลูโลส	8
2.5	กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส	9
2.6	ถังหมักแบบถาด	14
2.7	(1) traditional packed-bed bioreactor และ (2) Zymatis packed-bed bioreactor	14
2.8	(1) ถังหมักแบบหมุน และ (2) ถังหมักแบบมีใบกวน	15
2.9	(1) Gas-solid fluidized bed bioreactors และ (2) Stirred-aerated bioreactors	16
3.1	องค์ประกอบภายนอกของถังหมักแบบหมุน (ก) ตัวถังชั้นนอก และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นนอก	21
3.2	องค์ประกอบภายในของถังหมักแบบหมุน (ก) ตัวถังชั้นใน และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นใน	22
3.3	การประกอบถังหมักชั้นนอกและชั้นในเข้าด้วยกัน	22
3.4	ลักษณะการติดตั้งถังหมักแบบหมุนเข้ากับระบบปรับอากาศ	22
3.5	ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในถังหมัก (ก) ภาพตัดขวาง และ (ข) ภาพมุมบน	23
3.6	รูป 2 มิติของถังหมักแบบหมุน	24
4.1	ความชื้นระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	31
4.2	ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	31
4.3	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าว ต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	32
4.4	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าว ต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	32
4.5	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าว ต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3	33
4.6	ความชื้นระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	37
4.7	ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm 38
4.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm 38
4.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์บต้ากลูโคซิเดสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm 39
ค.2.1 สารมาตรฐานกลูโคซามีน 60
ค.2.2 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร) 61
ค.2.3 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร) 62
ค.2.4 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร) 63
ง.1.1 ถังหมักแบบหมุน 79
ง.1.2 (ก) ถังหมักชั้นใน และ (ข) ช่องเก็บตัวอย่าง 79
ง.1.3 (ก) ฝาถังนอก และ (ข) ช่องเก็บตัวอย่าง 80
ง.1.4 (ก) มอเตอร์ และ (ข) ตัวปรับความเร็วรอบ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงาน

มะพร้าว (cocos nucifea L.) เป็นพืชเศรษฐกิจ นอกจากเราจะใช้ประโยชน์จากการบริโภคสดแล้ว ยังมีการนำมาคั้นกะทิ หรือสกัดน้ำมัน ซึ่งผลพลอยได้คือได้กากมะพร้าว (coconut copra) จำนวนมาก โดยกากมะพร้าวส่วนใหญ่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ แต่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากกากมะพร้าวเมื่อผ่านการคั้นกะทิแล้วจะเหลือโปรตีนเพียงร้อยละ 1.2 แต่มีเส้นใยจำนวนมากถึงร้อยละ 12 ทำให้ใช้ได้น้อยในสูตรอาหารสัตว์ โดยไม่เกินร้อยละ 15 ในอาหารสัตว์ปีก (นฤมล และคณะ, 2557) และร้อยละ 20 ในอาหารสุกร ทำให้เหลือกากมะพร้าวส่วนหนึ่งที่ทิ้งโดยไม่ได้ใช้ประโยชน์ จากปัญหาดังกล่าวจึงคิดที่จะนำกากมะพร้าวที่เหลือมาใช้ประโยชน์ และเพิ่มมูลค่าให้แก่กากมะพร้าว

Trichoderma reesei เป็นเชื้อราประเภทเส้นใย (filamentous fungus) ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic) และเจริญได้ดีในระดับอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) 20 - 40 °ซ มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์เซลลูเลสจำนวนมาก ซึ่งนำมาย่อยเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชและชีวมวล ซึ่งในกากมะพร้าวมีเซลลูโลสจำนวนมาก จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์เป็นซับสเตรทในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส *T.reesei* มีความสำคัญในเชิงพานิชย์และอุตสาหกรรม ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง ที่ใช้เซลลูเลสเป็นกระบวนการแรกในการเปลี่ยนสารชีวมวลเป็นน้ำตาล และนำไปผลิตเป็นเอทานอลต่อไป หรือในอุตสาหกรรมอาหาร ที่ใช้เซลลูเลสในการผลิตน้ำผลไม้ เซลลูเลสจะช่วยในการสกัดน้ำผลไม้ และทำให้ได้น้ำผลไม้ที่ใสโดยไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน (Bhat , 2000) จากประโยชน์ของเซลลูเลส จากที่ได้กล่าวมาทำให้การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ได้รับความสนใจมากขึ้น

กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) เป็นวิธีหมักเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งปราศจากน้ำอิสระ แต่น้ำจะอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วาทิต, 2545) มักมีปัจจัยอื่นๆที่ต้องควบคุมเช่น ความชื้น, อุณหภูมิ, สารอาหารที่เหมาะสม โดยสารอาหารที่สำคัญอย่างหนึ่งคือแหล่งไนโตเจน เนื่องจากจุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ แต่บางชนิดเจริญได้ดีในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีไนโตเจนอินทรีย์ได้ดีเร็วกว่าในอาหารที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ (สมใจ , 2537) ซึ่งความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป

โครงงานนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาอัตราส่วนของรำข้าวสาลีซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เติมในกากมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา *T. reesei* พร้อมทั้งสร้างถังหมักแบบหมุน เพื่อศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมต่อการหมักอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 จุดประสงค์ของโครงงาน

1.2.1 ศึกษาผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อ *T. reesei* โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจน

1.2.2 ศึกษาผลการเติมอากาศในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยเชื้อ *T. reesei* ในถังหมักแบบถังหมุน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ถังหมักแบบถังหมุนในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง

1.3.2 เอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei*

1.3.3 ทราบอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) และอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสม ในการหมักเอนไซม์เซลลูเลสจากกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei*

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1.4.1 ออกแบบและสร้างถังหมักแบบถังหมุน ลักษณะเป็นถังทรงกระบอกแนวนอน 2 ชั้น ถังชั้นนอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร และยาว 70 เซนติเมตร ถังชั้นในมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร และยาว 50 เซนติเมตร โดยชั้นถังข้างในสามารถหมุนได้ และมีท่อเติมอากาศจากด้านล่าง

1.4.2 ขอบเขตตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่

1.4.2.1 ตัวแปรต้น

- อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่อัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3
- อัตราการเติมอากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm (vvm คือ ลิตรต่อลิตรของวัสดุหมักต่อนาที)

1.4.2.2 ตัวแปรตาม

- ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยวัดปริมาณเอนไซม์ 3 ชนิด คือ endoglucanase , exoglucanase และ beta-glucosidase
- การเจริญของเชื้อโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน

1.4.2.3 ตัวแปรควบคุม

- ชนิดของเชื้อคือ *T. reesei* TISTR3080
- ร้อยละของปริมาณเชื้อ *T. reesei* เริ่มต้น แต่ละการทดลอง 1×10^{6} สปอร์ต่อกรัมซับเตรทแห้ง
- ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ความเร็วรอบในการหมุนของถังหมัก กำหนดเริ่มต้น 6 รอบต่อนาที

- ภาชนะในการหมักได้แก่ ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และถังหมักแบบถังหมุน

- อุณหภูมิในการหมักที่ 30 °ซ สำหรับการทดลองในขวดรูปชมพู่ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ตู้บ่ม สำหรับการทดลองในถังหมักโดยควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา (Fungi)

รา หรือ เชื้อรา เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดราซึ่งโตในรูปของใยหลายเซลล์ที่เรียกว่าไฮฟา (hypha) ในทางตรงกันข้าม เชื้อราที่สามารถเติบโตในรูปแบบของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวจะเรียกว่า ยีสต์ ซึ่งเชื้อรามีลักษณะทั่วไปแตกต่างจากยีสต์ โดยเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นใยมากกว่ายีสต์ เส้นใยเชื้อรา เกิดจากเซลล์หลายเซลล์ต่อกัน หรืออาจติดต่อทะลุถึงกันตลอดเป็นเซลล์เดียวขนาดยาวมากก็ได้ เชื้อราได้รับสารอาหารโดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โพลีแซคคาไรด์ให้เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ และย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือเส้นใย เชื้อราส่วนใหญ่ดำรงชีพแบบทั้งที่เป็นอิสระ หรือเป็นผู้ย่อยสลายซากอินทรีย์ (saprophyte) บางชนิดเป็นปรสิต (parasite) และบางชนิดสามารถดำรงชีวิตโดยเป็นได้ทั้งสองแบบ

เชื้อรามีโครงสร้างเรียงตัวกันเป็นเส้นใย (multicellular filamentous fungi) เส้นใยราแต่ละเส้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 ไมโครเมตร อาจแตกแขนงได้มากมาย เมื่อรวมกลุ่มจำนวนมากจนมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) เส้นใยรา หรือไฮฟา จะมีลักษณะเป็นเซลล์ติดต่อกันหลายเซลล์มีผนังกั้นหรืออาจมีลักษณะคล้ายท่อยาวตลอดไม่มีผนังกั้นภายในประกอบด้วยส่วนประกอบของเซลล์ โดยเส้นใยมีลักษณะแตกต่างกัน 3 ลักษณะ คือ เส้นใยไม่มีผนังกั้น (nonseptate hypha) เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) แบ่งเซลล์เป็นห้องๆ มีหนึ่งนิวเคลียส (uninucleate) และเส้นใยมีผนังกั้นแต่มีหลายนิวเคลียส (multinucleus) กลุ่มของเส้นใยราอาจมีลักษณะหลวมๆ หรือแน่นมากๆ ก็ได้ ส่วนปลายของเส้นใยราจะมีการเจริญที่ทำให้เกิดการยืดยาวออกไป สามารถแบ่งหน้าที่ของเส้นใยราออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนสืบพันธุ์ (fertile hypha) และส่วนเวเจเตตีฟ (vegetative part) ส่วนสืบพันธุ์สามารถสร้างสปอร์ซึ่งตามปกติสปอร์จะชูขึ้นไปในอากาศ เกิดจากกลุ่มใยราซึ่งเป็นส่วนเวเจเตตีฟ ส่วนเวเจเตตีฟนี้อาจอยู่บนผิวอาหารหรือแทงลงไปในอาหารก็ได้เพื่อดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของเชื้อรา (มยุรา และคณะ, 2555)

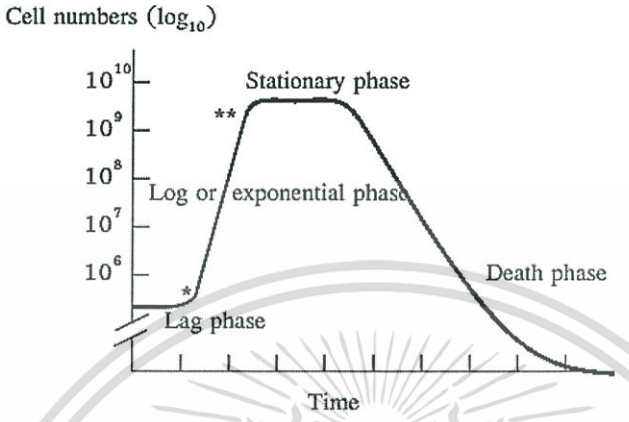
2.1.1 การเจริญของเชื้อรา

การเติบโตของเชื้อรา เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น เชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (filamentous fungi หรือ mold) การเจริญเติบโตจะทำให้เส้นใยมีความยาวและมีการแตกแขนงมากขึ้น อาจวัดการเจริญจากขนาดของโคโลนี (colony) หรือน้ำหนักแห้ง (biomass) ของเส้นใย การเจริญเติบโตของเชื้อราขึ้นอยู่กับสารอาหารและปัจจัยอื่นๆ ของสภาพแวดล้อม การเพาะเลี้ยงเชื้อราจึงสามารถทำได้โดยตัดส่วนของเส้นใยไปเพาะเลี้ยงในสารอาหารใหม่ โดยเชื้อราสามารถแบ่งเซลล์เจริญยืดยาวออกจากส่วนปลายทุกด้านของเส้นใย (มยุรา และคณะ, 2555)

ในการเจริญเติบโตของเชื้อราจะแบ่งวงจรการเจริญเติบโตออกเปนระยะต่างๆโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) โดยปกติแล้วแบ่งออกเปน 4 ระยะ คือ Lag phase เป็นระยะที่เชื้อราจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนเชื้อรายังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งเซลล์, Log phase หรือ Exponential phase เป็นช่วงที่เชื้อราเริ่มแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว, Stationary phase เป็นช่วงที่การเจริญเริ่มคงที่ และ Death phase เป็นระยะที่เชื้อราจะตายอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วงจรการเจริญของเชื้อรา

ที่มา: มัณฑนา (2545)

สำหรับการเจริญของเชื้อราในระยะ log phase หรือ exponential phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้ (สมใจ, 2537)

$$dx/dt = \mu x \qquad (2.1)$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

t คือ เวลา มีหน่วยเป็น วัน

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็น (วัน$^{-1}$)

เมื่ออินทิเกรต สมการที่ 2.1 จะได้

$$X_0 = X_t e^{\mu t} \qquad (2.2)$$

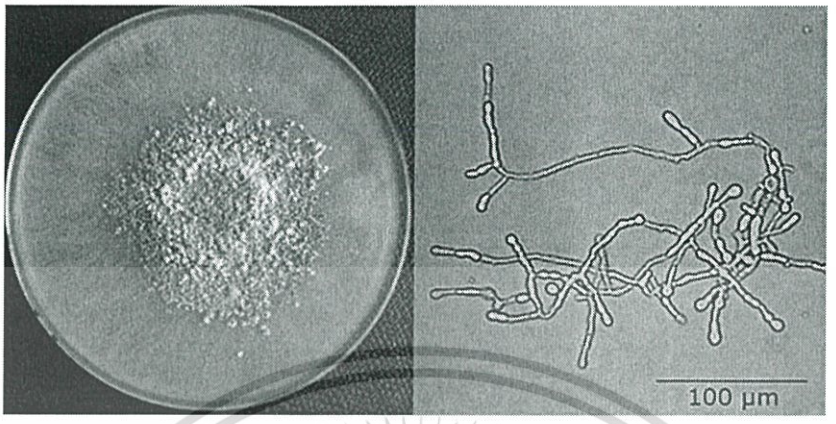
เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

X_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t วัน

e = ฐานของ natural logarithm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อรา *Trichoderma reesei*



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อรา *T. reesei* เมื่อมองด้วยตาเปล่าและลักษณะทางสัณฐาน

ที่มา: Jourdier (2013)

เป็นเชื้อราชนิดเส้นใย (filamentous fungus) ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic) และเจริญเติบโตได้ดีในระดับอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) 20 - 40 °ซ เชื้อรา *T. reesei* เป็นเชื้อราจำพวกซาโปรไฟต์ (saprophyte) ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์ และแหล่งอินทรีย์วัตถุเป็นอาหาร เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในดินทุกแห่งสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด และสร้างเส้นใยสีขาวและผลิตโคนิเดีย (conidia) หรือสปอร์ (spore) มากมายรวมเป็นกลุ่มเห็นเป็นสีเขียว บางชนิดอาจมีสีขาวหรือสีเหลือง เชื้อรา *T. reesei* เป็นศัตรูต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีเป็นปรสิต (mycoparasite) และแบ่งปันการใช้อาหารกับเชื้อโรค (competition) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตยาปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพิษ (toxins) และน้ำย่อยจำพวกเอนไซม์ (enzyme) ซึ่งเชื้อรา *T. reesei* ถูกค้นพบเป็นครั้งแรก เมื่อเชื้อรานี้เกิดขึ้นในชุดทหารเครื่องแบบ และเต็นท์ผ้าใบระหว่างช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 จากนั้นนักวิทยาศาสตร์ได้ค้นคว้า จนพบว่าเชื้อรานี้หรือสายพันธุ์ข้างเคียงสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถย่อยสลายเส้นใยพืชให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลน้ำตาลได้ การค้นพบดังกล่าว ช่วยให้สามารถผลิตเชื้อราที่ออกแบบให้ผลิตเอนไซม์หรือสารเร่งปฏิกิริยา ที่คุ้มค่าในการลงทุนในการย่อยสลายเซลลูโลสในผนังเซลพืช ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนชีวมวลสู่เชื้อเพลิงเพื่อการคมนาคมขนส่ง และสารเคมีที่จะใช้เป็นหน่วยแรกในการนำไปสังเคราะห์สารเคมีอื่นๆต่อไป ในคู่มืออนุกรมวิธานของ Rifai (1969) ได้จำแนกเชื้อรา*Trichoderma* ออกเป็น 9 สปีชีส์ (ผ่องศรี และคณะ, 2550) ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สปีชีส์ของเชื้อรา *T. reesei*

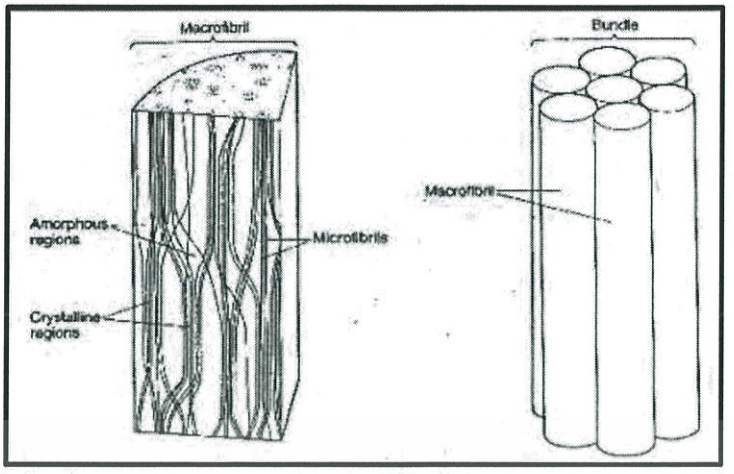
จีนัส	สปีชีส์
Trichoderma reesei	*piluliferum Webster and Rifai*
	polysporum Rifai
	hamatum (Bon.) Bain
	Koningii Oud
	aureoviride Rifai
	harianum Rifai
	- *longibrachaitum Rifai* - *pseudomokoningil Rifai* - *virile Pere*
	citrinoviride Bisset
	atroviride Bissett

T. reesei มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมจุลินทรีย์ เนื่องจากความสามารถผลิตเซลลูเลสได้หลายสายพันธุ์ *T. reesei* ได้รับการพัฒนาตั้งแต่ถูกค้นพบ โดยเน้นหนักในการเพิ่มการผลิตเซลลูเลส ได้มีการพัฒนาโปรแกรมที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม ซึ่งนำไปสู่สายพันธ์ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้มากกว่าเดิม 20 เท่า

2.3 เซลลูโลส

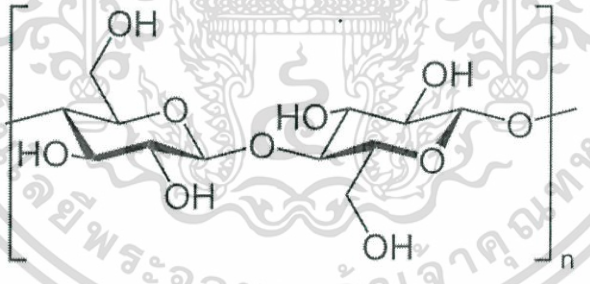
เซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กมากลักษณะเป็นแท่ง (rod-shaped units) ที่เรียกว่าไมเซล (micells) บางครั้งประกอบเป็นหน่วยใหญ่จากไมเซล 10 ถึง 20 หน่วยเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งโครงสร้างมีลักษณะส่วนใหญ่เป็นผลึก (crystalline) (รูปที่ 2.3) จึงถูกย่อยสลายได้ยากเป็นส่วนประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 45 ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติส่วนใหญ่ถูกผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และสะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช เช่น ฝ้ายมีส่วนประกอบของเซลลูโลสมากกว่าร้อยละ 97-99 จัดว่าเป็นเซลลูโลสที่บริสุทธิ์ ประกอบด้วยสายโพลิเมอร์เรียงขนานและยึดติดกันด้วยแรงกระจายตัว และพันธะไฮโดรเจน ภายในโมเลกุลเซลลูโลสจึงยึดติดกันแน่นทำให้เซลลูโลสเซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆได้ช้า เพราะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลลูโลสได้ สามารถพบเซลลูโลสในสาหร่ายและฟังไจหลายชนิด รวมทั้งในสัตว์ทะเลหลายชนิด และเนื่องจากเซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อมโดยจุลินทรีย์ จึงเป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญต่อวัฏจักรคาร์บอน (จุรีรัตน์ และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา: จุฑามาศ (2553)

ในด้านโครงสร้างทางเคมี เซลลูโลสเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส (glucose) จำนวน 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลีเมอร์เชื่อมกันด้วย β -1, 4-glycosidic bond ระหว่าง alcoholic hydroxyl groups โดยโมเลกุลสายยาวของเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคส 2,000-15,000 โมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-2,400,000 ดาลตัน การเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง (มูรนีย์, 2557)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสายเซลลูโลส
ที่มา: Richmond และ Somerville (2000)

2.3.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกการย่อยเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์คือน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่การย่อยที่ไม่สมบูรณ์จะได้ทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส (cellobiose) และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ปนกัน การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์และเซลลูโลสจะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง น้ำตาลกลูโคสจะไม่ถูกสลายต่อไป จึงได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ และไม่มีผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการปะปนออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายเซลลูโลสเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์จุลินทรีย์ในสภาพที่มีออกซิเจนผลของการย่อยสลายจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ฮิวมัส ความร้อนและจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นนี้ได้มาจากย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสม ได้แก่ การระบายอากาศ อุณหภูมิ แหล่งอาหารหลักเพียงพอกับการนำไปสร้างพลังงานเพื่อใช้ในระบบเมตาบอลีซึม และการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เอทานอล กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก กรดซักซินิก กรดบิวไทริก และกรดแลกติก เป็นต้น เอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์มีหลายชนิดทั้งเชื้อรา และแบคทีเรีย ที่นิยมนำมาใช้คือเซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *T. reesei* (ผ่องศรี และคณะ, 2550)

2.4 เซลลูเลส

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับซับสเตรทจำพวกเซลลูโลส เป็น complex enzyme ที่มีส่วนประกอบต่างๆ กัน ซึ่งการย่อยสลายเซลลูโลสตามธรรมชาติจำเป็นต้องมีเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีหน้าที่ และคุณลักษณะที่ต่างกัน กลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเบต้ากลูโคซิเดส (beta-glucosidase) (รูปที่ 2.5)

รูปที่ 2.5 กลไกการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา จุฑามาศ (2553)

กลไกการทำงานของเซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่

(1) เอนโดกลูคาเนส ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ สลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิกของซับสเตรทสังเคราะห์ได้ เช่น คาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส (CMC) โดยทำปฏิกิริยาภายในโมเลกุลเซลลูโลสแบบสุ่ม ทำให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น oligomer และน้ำตาลกลูโคสบางส่วน

(2) เอกโซกลูคาเนส เอนไซม์สามารถย่อยสลายจากปลายด้าน non-reducing end และปลายด้าน reducing end ได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) เบต้ากลูโคซิเดส เป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเซลโลไบโอส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส

2.4.1 การนำเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ประโยชน์

เอนไซม์เซลลูเลส สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ดังตัวอย่างต่อไปนี้

อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากอาหารสัตว์มีส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่มีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละชนิด อีกทั้งยังย่อยได้ยาก จุลินทรีย์ในลำไส้สัตว์บางชนิดไม่มีเอนไซม์เซลลูเลส เช่น สุกร และสัตว์ปีก จึงเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในอาหารสัตว์ เพื่อให้เอนไซม์ไปย่อยสลายเซลลูโลส ทำให้สัตว์สามารถใช้โปรตีน และไขมันจากอาหารเหล่านั้น และลดอาหารตกค้างในกระเพาะ

อุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากสิ่งสกปรกในเสื้อผ้าประกอบไปด้วยสารอินทรียหลายชนิด มีที่ทั้งละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ การนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผสมกับสารซักฝอก เพื่อช่วยให้การซักผ้ามีประสิทธิภาพและขจัดส่วนของเส้นใยที่แยกออกมา ทำให้เนื้อผ้าสว่าง ไม่หมอง และนิ่ม

อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง นำเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และนำน้ำตาลกลูโคสไปหมักด้วยยีสต์ หรือแบคทีเรียเพื่อให้ได้เป็นเอทานอล

อุตสาหกรรมกระดาษ นำเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในการเพิ่มความแข็งแรงของกระดาษ เนื่องจากเยื่อกระดาษประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อเอนไซม์ไปเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเยื่อกระดาษ ก็จะเกิดผลิตภัณฑ์บางส่วนที่ละลายน้ำได้ อนุภาคขนาดเล็กๆ สามารถจับตัวเป็นก้อน ทำให้รีดน้ำออกจากกระดาษได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์เซลลูเลสในกระบวนการทำให้หมึกหลุดออกจากกระดาษในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษรีไซเคิล โดยเอนไซม์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลส ทำให้หมึกหลุดออกมาง่าย (จุฑามาศ, 2553)

2.5 การหมัก (Fermentation)

การหมักในทางชีวเคมี เป็นกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์ เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์ โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน (Klein และคณะ, 2004)

การหมักในเชิงอุตสาหกรรม เป็นการหมักจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเห็ดรา ที่ทำโดยตั้งใจเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ ที่สามารถใช้เป็นอาหารหรือเพื่อประโยชน์อื่น ๆ ในอุตสาหกรรม สารเคมีที่มีขายทั่วไปบางอย่าง เช่น กรดน้ำส้ม กรดซิตริก และเอทานอล ล้วนผลิตโดยวิธีการหมัก (Chisti, 1999)

2.5.1 การหมักในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยใช้สารตั้งต้นอยู่ในสภาพอาหารที่เป็นของเหลว ซึ่งในอาหารเหลวจะมีการเติมสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน ธาตุอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา สามารถเพาะเลี้ยงได้ในถังหมัก โดยกระบวนการหมักอาหารเหลวโดยใช้ถังหมัก ประกอบไปด้วยส่วนของการให้อากาศและกวนให้องค์ประกอบในถังหมักเข้ากันดี และอุปกรณ์ตรวจวัดปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำและการเกิดฟอง กระบวนการหมักที่นิยมในระดับอุตสาหกรรมเป็นวิธีแบบ batch และแบบ fed-batch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักในสภาพอาหารเหลวมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เป็นระยะๆ ได้ หากหมักแบบ fed-batch culture ลดการเกิดการปนเปื้อนใช้แรงงานน้อย แต่การหมักแบบนี้มีประสิทธิภาพต่ำในการหมักที่ใช้ลิกโนเซลลูโลส ค่าใช้จ่ายสูงและได้เอนไซม์ความเข้มข้นน้อยกว่าการหมักบนอาหารแข็ง (จุฑามาศ, 2553)

2.5.2 การหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)

หมายถึง เป็นกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอาศัยน้ำซึ่งอยู่ ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับในวัสดุหมัก ดังนั้นการหมักชนิดนี้จึงมักจะเหมาะกับการใช้จุลินทรีย์ประเภทรา ซึ่งสามารถเจริญได้ในวัสดุหมักที่มีปริมาณน้ำน้อย (ภูษิต และคณะ, 2556) ปัจจุบันได้มีการนำเอาวัตถุดิบตกค้างจากอุตสาหกรรมเกษตรมาเพิ่มมูลค่า โดยการนำมาใช้เป็นวัสดุในการหมักด้วยวิธีการหมักบนอาหารแข็ง เนื่องจากหาง่ายและมีราคาถูก นอกจากนั้นยังพบว่ากระบวนการหมักบนอาหารแข็งเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานและสร้างของเสียน้อย รวมทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Pandey, 2003) การหมักบนอาหารแข็งมีข้อดีหลายอย่างเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารเหลว ดังแสดงในตารางที่ 2.2 (Couto และ Sanroman, 2006)

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของการหมักบนอาหารแข็งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลว

ข้อดี	ข้อเสีย
- ได้ผลผลิตสูง - การไหลเวียนของออกซิเจนดี - ต้นทุนต่ำ - ใช้พลังงานน้อย - วิธีการหมักไม่ซับซ้อน - สภาวะการหมักคล้ายกับแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์หลายชนิด	- ความยากในการขยายสเกล - ประสิทธิภาพในการผสมต่ำ - ควบคุมตัวแปรในการหมักยาก (เช่น ความเป็นกรด-ด่าง, ความร้อน, ความชื้น, สารอาหาร) - มีปัญหาเกี่ยวกับการสะสมความร้อน - โอกาสในการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์สูงทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์เพิ่ม

2.5.2.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง

(1) ความชื้น

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการความชื้นแตกต่างกันเช่น เชื้อราไม่ชอบเจริญในอาหารที่มีความชื้นมากหรือเปียก แต่จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความชื้นอยู่บ้าง ในขณะที่แบคทีเรียหรือยีสต์มักเจริญในอาหารที่มีลักษณะเปียกแฉะ มีน้ำอยู่มากเป็นต้น ความชื้นมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา การถ่ายโอนก๊าซออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และการถ่ายเทความร้อน ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา (สุภัตรา, 2556) เชื้อราสวนใหญ่ในการหมักบนอาหารแข็งสามารถเจริญได้ดีที่ความชื้นของวัสดุหมักอยู่ในชวงร้อยละ 40 ถึง 65 (ธัญรัตน์ และคณะ, 2551)

(2) ค่าพีเอช

ค่าพีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยจุลินทรีย์จำพวกรามักเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นต่ำ เช่น *Aspergillus awamori* และ *Thermoascus aurantiacus* เจริญได้ดีในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 สำหรับ *Trichoderma reesei* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 (เนริสา, 2543) ในระหว่างการหมักค่าพีเอชจะมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนีย หรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมา หรือมีการย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรตแล้วเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ โดยบัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่าง ป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา สำหรับการควบคุมพีเอชสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง แต่ไม่นิยมทำในอาหารแข็งมากนัก (สัญทัศน์, 2553)

(3) อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน โดยเชื้อราจะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่กว้าง คือที่ 0-62 °ซ (มยุรา และคณะ, 2555) นอกจากนั้นอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์สูงสุด จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์นั้นเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 °ซ (มูรนีย์, 2557) โดยในระหว่างการเจริญของเชื้อราจะมีความร้อนเกิดขึ้นและถ่ายเทไปยังอาหารจนทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิอาจเพิ่มสูงมากจนเชื้อราไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้ ดั้งนั้นในการหมักบนอาหารแข็งจึงต้องมีการควบคุมให้มีความเหมาะสม

(4) แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมาก และนิยมใช้อย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง หรืออาจใช้ข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเมล็ดข้าวบาร์เลย์ แลคโตส น้ำแช่ข้าวโพด ฟาร์มามีเดียร์ กากถั่วเหลือง และน้ำมันพืช เป็นต้น (สมใจ, 2537)

(5) แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการหมัก ได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน สำหรับวัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง และฟาร์มามีเดียร์ เป็นต้น (สมใจ, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(6) อากาศ

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย การเจริญ และกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีการเปลี่ยนวัตถุดิบ หรือสารอาหารไปเป็นผลิตภัณฑ์อาจขึ้นอยู่กับสภาวะมีอากาศหรือไร้อากาศ โดยทั่วไปการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เป็นกระบวนการหมักที่ต้องการอากาศ ซึ่งต้องควบคุมให้พอเหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียจะมากจะน้อยเพียงใดขึ้นกับชนิด และปริมาณของแบคทีเรีย จำนวนรอบของการเขย่าหรือกวน และปริมาตรของสารอาหารต่อปริมาตรของถังหมัก

การหมักแบบอาหารแข็งการให้อากาศมีบทบาท 2 ประการ คือ เป็นแหล่งออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ และกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ไอน้ำและสารที่ระเหยได้อื่นๆ อากาศที่ให้มักอิ่มตัวด้วยน้ำหรือปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ และอัตราการให้อากาศขึ้นกับธรรมชาติของจุลินทรีย์ ความต้องการออกซิเจนเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ปริมาณความร้อนที่เกิดจากเมตาบอลิซึม ความหนาของชั้นซับสเตรท คาร์บอนไดออกไซด์และสารระเหยได้ที่ปลดปล่อยออกมา และช่องอากาศในซับสเตรท โดยอัตราการให้อากาศต่ำจะมีคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าอากาศสูง ซึ่งจะมีผลต่อบรรยากาศโดยรวมในถังหมัก ทำให้ไม่มีศักยภาพในการผลิต แต่อัตราการให้อากาศสูงจะทำให้ความชื้นของซับสเตรท และความชื้นสัมพัทธ์สูญเสียได้มาก อาจจะทำให้ซับสเตรทแห้งหรือต้องใช้ตัวปรับความชื้นสัมพัทธ์ (สัญทัศน์, 2553)

(7) สารอาหารอื่นๆ

สารอาหารอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เช่น วิตามิน และแร่ธาตุ แหล่งวิตามินจะเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต และทำหน้าที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ แหล่งของแร่ธาตุมีผลต่อการรักษาสมดุลของสารละลายภายใน และภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้ ซึ่งเกลือแร่จะมีผลต่อการถ่ายเทอิเลกตรอนในรูปของอิออน เพื่อช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ (สุภัตรา, 2556) โดยแร่ธาตุที่มีความสำคัญ ซึ่งควรเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Mg, P, K, S, Ca และ Cl ส่วนวิตามิน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดจะสังเคราะห์วิตามินได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมวิตามินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแหล่งวิตามินส่วนใหญ่ได้มาจากแหลงคาร์บอนและไนโตรเจน (สมใจ, 2537)

2.5.2.2 ถังหมักสำหรับกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

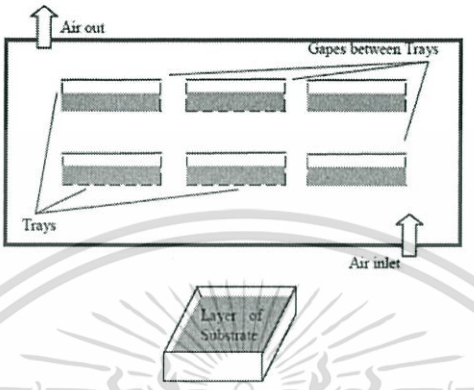
ถังหมักทั่วไปที่ใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งแบ่งออกเป็น 4 ประเภทขึ้นอยู่กับชนิดของการเติมอากาศหรือการผสม ได้แก่ ไม่มีการผสมและการเติมอากาศ ไม่มีการผสมแต่มีการเติมอากาศ มีการผสมแต่ไม่มีการเติมอากาศ และมีทั้งการผสมและการเติมอากาศ (Ali และ Zulkali, 2011)

(1) ถังหมักแบบไม่มีการผสม และการเติมอากาศ (unforced aeration, without mixing)

ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบถาด เป็นถังหมักอย่างง่าย มีมานานหลายศตวรรษใช้ในการผลิตแบบดั้งเดิมสำหรับการหมักอาหารเช่น เทมเป้ ซุปมิโซะ โคจิ และซอสถั่วเหลือง (Tokuoka และคณะ, 2010) ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักแบบถาดแสดงดังรูปที่ 2.6 ซึ่งภายในถังหมักจะประกอบด้วยถาดหลายถาดวางแยกกันเป็นชั้นๆ เพื่อให้มีช่องว่างสำหรับให้อากาศไหลผ่าน โดยทั่วไปด้านบนของถังหมักจะเป็นแบบเปิดส่วนด้านข้างล่าง หรือด้านข้างอาจจะเจาะรูเพื่อช่วยในการระบายอากาศที่ผิวหน้าของ ซับสเตรท (Ali และ Zulkali, 2011, Yang และคณะ, 2008) ส่วนอุณหภูมิในระบบอาจจะปลอยให้เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม หรือที่ถาดอาจติดตั้งระบบควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

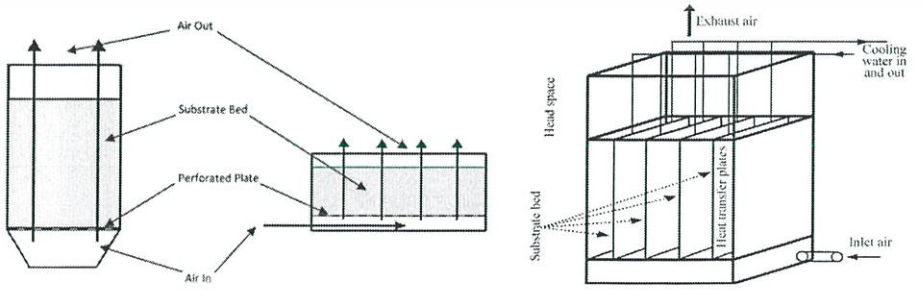
เพื่อควบคุมอุณหภูมิตามสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรียก็ได ถังหมักชนิดนี้ช่วยให ปฏิกิริยาของเอนไซมสูงขึ้นในระหวางการหมัก แตมีขอเสียคือ ตองใชพื้นที่ในการหมักมาก นอกจากนี้ เมื่อตองการขยายขนาดจะทำใหปริมาณอาหารที่ตองใช้มากและหนาขึ้น ทำใหมีปญหาในเรื่องของ การถายเทความรอน และการควบคุมตัวแปรต่างๆ เช่นความชื้น พีเอช อุณหภูมิ จะทำไดยากขึ้น (มัณฑนา, 2545)



รูปที่ 2.6 ถังหมักแบบถาด
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

(2) ถังหมักแบบไม่มีการผสม แต่มีการเติมอากาศ (forcefully-aerated, without mixing)

ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบแพคเบด (Packed-bed bioreactors) อากาศจะถูกเป่าผ่านแผ่นเพลทที่มีรูพรุน กระจายไปยังชั้นของซับสเตรท ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักแบบแพคเบด ตัวคอลัมน์ของถังสามารถวางตัวได้ทั้งแนวตั้งและแนวนอนหรือมุมอื่นๆ การเติมอากาศจะเติมจากส่วนไหนของคอลัมน์ก็ได้ สำหรับถังแนวตั้งสามารถเติมอากาศจากด้านบนหรือด้านล่างของถังได้ ในส่วนของการระบายความร้อนตัวคอลัมน์อาจหุ้มด้วยวอเตอร์แจ็คเก็ต เรียกว่า traditional packed-bed bioreactor หรือใช้แผ่นถ่ายเทความร้อนแทรกเข้าไปภายในตัวถัง เรียกว่า Zymatis packed-bed bioreactor ลักษณะแสดงดังรูปที่ 2.7 (Ali และ Zulkali, 2011) ข้อดีของถังหมักแบบแพคคือ สามารถควบคุมตัวแปรของระบบได เช่นความชื้น และอุณหภูมิไดดีกวาแบบถาด ขอเสียของการหมักแบบนี้คือ ยากที่จะแยกผลิตภัณฑ์ หรือนำผลิตภัณฑออกจากคอลัมน และรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรียไมสม่ำเสมอ (มัณฑนา, 2545)



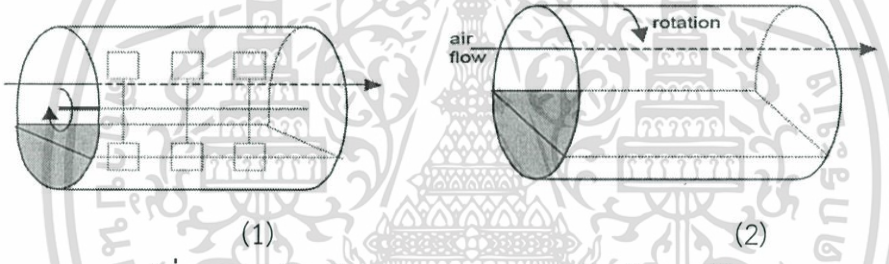
(1) (2)

รูปที่ 2.7 (1) Traditional packed-bed bioreactor และ (2) Zymatis packed-bed bioreactor
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ถังหมักแบบมีการผสม แต่ไม่มีการเติมอากาศ (unforced aeration, continuous or intermittent mixing)

ถังหมักประเภทนี้ ได้แก่ ถังหมักแบบหมุน และถังหมักแบบมีใบกวน (Rotating-drum and stirred-drum bioreactors) ลักษณะโดยทั่วไปของถังหมักประเภทนี้คือ ตัวถังเป็นถังทรงกระบอกวางตัวในแนวนอน ภายในถังจะประกอบไปด้วยชั้นของซับสเตรท และมีอากาศไหลผ่านช่องว่างของซับสเตรท กลไกการทำงานของถังหมักแบบหมุน และแบบมีใบกวนจะต่างกัน โดยถังหมักแบบหมุน ตัวถังจะหมุนรอบแกนกลางของถัง อาจนำแผ่นกั้น (baffles) มาช่วยในการเคลื่อนที่ของซับสเตรท ส่วนถังหมักแบบมีในกวน ตัวถังจะอยู่นิ่ง แต่จะติดตั้งใบกวนเพื่อช่วยในการผสมของซับสเตรทแทน (Ali และ Zulkali, 2011) ดังรูปที่ 2.8 โดยในการผสมมีทั้งแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง ผลจากการหมุนหรือการกวนจะทำให้เกิดการเสียดสี และอาจทำลายเสนใยจุลินทรีย โดยข้อเสียของถังหมักแบบหมุน การควบคุมอุณหภูมิทำได้ยาก ไม่สามารถระบายความร้อนด้วยการใช้ระบบน้ำหล่อเย็นเหมือนในระบบแพคเบด นอกจากนี้ปริมาตรที่ใช้ในการหมักมีเพียงร้อยละ 30 ของปริมาตรทั้งหมดของถังหมัก ผลิตภัณฑที่ได้จากกระบวนการหมักชนิดนี้ได้แก เอนไซม เซลล์จุลินทรีย และอาหารสัตว์ (มัณฑนา, 2545)



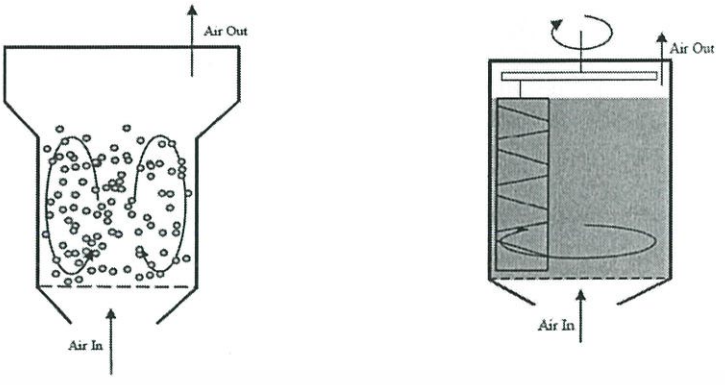
รูปที่ 2.8 (1) ถังหมักแบบหมุน และ (2) ถังหมักแบบมีใบกวน
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

(4) ถังหมักแบบมีการผสมและการเติมอากาศ (Mixed, forcefully-aerated bioreactors)

ถังหมักประเภทนี้ ได้แก่ ถังหมักแบบ ASFB (Air-solid fluidized reactor) ลักษณะของถังหมักแบบนี้จะใช้คอลัมน์สูง มีการอัดอากาศไหลเข้าทางด้านล่างด้วยความเร็วที่ทำให้อาหารลอยตัวได้ อาจใช้ใบกวนเพื่อช่วยให้อาหารแข็งกระจายตัว นอกเหนือจากการใช้แรงจากอากาศอย่างเดียว หลักการของถังหมักชนิดนี้จะให้กาซไหลขึ้นผ่านเบดของของแข็งด้วยความเร็วสูง ของแข็งจะแขวนลอยในกาซ เบดลักษณะนี้จะเรียกว่าฟลูอิดไดซเบด (Fluidized bed) สำหรับความเร็วของกาซขาเข้าจะต้องสูงกว่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิดไดซเบด โดยเบดจะมีลักษณะเหมือนน้ำเดือดแทนที่จะเป็นฟอง กาซจะเป็นตัวของแข็งเคลื่อนที่ลอยทั่วคอลัมน ขอดีของการใช ASFB คือทำให้กระบวนการอัดอากาศได้ผลดีขึ้น โดยจุลินทรียที่ใช้ออกซิเจนจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับการหมักแบบอื่น ถังหมักชนิดนี้ใช้ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย ซึ่งในระหว่างการหมักจะมีการกระเพื่อมเพื่อป้องกันการเกาะตัวเป็นของแข็งที่ผนังของถังหมัก (มัณฑนา, 2545)

ถังหมักแบบมีใบกวน ซับสเตรทจะถูกกวนมีทั้งแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง อากาศจะถูกเป่าผ่านซับสเตรท การวางตัวของซับสเตรทคล้ายกับแบบแพคเบด ลักษณะการทำงานตัวถังจะอยู่นิ่ง แต่มีการติดตั้งใบกวนช่วยในการผสมซับสเตรท และมีการเติมอากาศที่ด้านล่างของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(1) (2)

รูปที่ 2.9 (1) Gas-solid fluidized bed bioreactors และ (2) Stirred-aerated bioreactors
ที่มา: Ali และ Zulkali (2011)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Metarhizium anisopliae เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ดี โดยเชื้อราสร้างเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยสลายพนังลำตัวของแมลง ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหารแข็งทำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณที่สูงมากกว่าวิธีเพาะเลี้ยงแบบอื่นๆ และสามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรเช่น รำข้าวสาลี และเปลือกถั่ว มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์เพื่อลดต้นทุนการผลิต

อภิวิชญ์ และคณะ (2559) ได้ทำการศึกษาเรื่องการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง *M. anisopliae*เป็นเชื้อราที่เป็นศัตรูต่อแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โดยโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่เชื้อราผลิตขึ้น เพื่อย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวเหยื่อ ขณะที่เชื้อราเข้าทำลาย ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง ซึ่งจากเมล็ดธัญพืชและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทั้งหมด 11 ชนิด ซึ่งพบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมโปรติเอส 167 ± 12.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราด้วยรำข้าวสาลีร่วมกับเพปโตน พบว่าการกระตุ้นให้เชื่อราสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 305.8 ± 10.2 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 0.05 แต่ทั้งนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา และ pH ล้วนแต่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราซึ่งจะได้ทำการศึกษาวิจัยที่เหมาะสมอื่นๆต่อไป

การศึกษาเชิงเปรียบเทียบการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ โดยฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma* การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น ลำต้นข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าว ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากวัสดุเหล่านี้มีปริมาณมาก หาง่าย ราคาถูก และที่สำคัญคือประกอบด้วยพอลิแซ็กคาร์ไรด์ โครงสร้างทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยเซลลูโลสในซับสเตรทต่างๆ ได้แก่ กระดาษกรอง ฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อดูรูปแบบการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากซับสเตรทที่มีคุณลักษณะเฉพาะแตกต่างกัน

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุติเดช และคณะ (2557) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลส (กลูแคน) ในซับสเตรทต่างๆพบว่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลลูโลสในกระดาษกรอง ถูกย่อยเป็นกลูโคสได้มากสุดร้อยละ 50 รองลงมาคือ ฟางข้าวที่กาจัดลิกนินร้อยละ 43 และไม่กำจัดลิกนินร้อยละ 8 อัตราการย่อยในช่วงแรกของเซลลูโลสในซับสเตรทต่างๆมีความสัมพันธ์กับปริมาณและโครงสร้างของเซลลูโลสและปริมาณลิกนิน

ตารางที่ 2.3 แสดงการแปลงกลูแคนเป็นกลูโคสที่ซับสเตรทต่างกัน (เอนไซม์ 15 FPU/กรัม ; ซับสเตรทร้อยละ 1.5 มวลต่อปริมาตร ; pH 4.8 (สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์) ; 37 °ซ)

Substrate (1.5 g loadind)	Glucan content (g glucose equivalent)	Glucose in hydrosate (g) at 24 h	Glucan conversion (%)
Filter paper	1.6	0.8	50.0
Rice straw	0.5	0.04	8.0
Delignified rice straw	0.7	0.3	42.9

เนริสา (2543) ได้ศึกษาเรื่องการผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรพบว่า เมื่อนำ *Trichoderma reesei* Rut C-30 เลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร 4 ชนิด คือรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า เปลือกถั่วลิสง และชานอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ารำข้าวสาลีให้กิจกรรมของ ไซแลนเนสสูงสุด 23.931 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และรำข้าวเจ้ามีกิจกรรมของเซลลูเลสสูงสุด 0.656 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ารำข้าวสาลีมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสหรือไซแลนมากที่สุด โดยมีปริมาณ 26.10 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนเปลือกถั่วมีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด 35.13 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง โดยที่การมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูงในรำข้าวสาลีมีผลส่งเสริมการผลิตไซแลนเนสได้ เมื่อนำรำข้าวสาลีมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้กิจกรรมของไซแลนเนสสูงสุด 27.946 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ corn steep liquor เมื่อศึกษาถึงผลของสารที่มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส 3 ชนิด คือ ไซแลน ไซโลส และ beta-methyl - xyloside พบว่าไซแลนมีผลต่อการผลิตไซแลนเนสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ไซโลสและ beta-methyl-xyloside มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเพิ่มขึ้น โดยไซโลสที่ระดับความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.85 เท่า และ beta-methyl-xyloside ที่ระดับความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.32 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุสำหรับการสร้างถังหมักแบบแพคเบด

1) แผ่นอลูมิเนียมอัลลอยด์ ความหนา 1 มิลลิเมตร
2) แผ่นสแตนเลส 304 ความหนา 1 มิลลิเมตร
3) เพลาสแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว
4) หน้าแปลนแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร
5) มุ้งลวดอลูมิเนียม
6) ท่อ PVC ขนาด 3 หุน
7) ตลับลูกปืน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว
8) เหล็กกล่องสี่เหลี่ยมความยาว 6 เมตร
9) coupling สำหรับมอเตอร์ กำลัง 15 วัตต์
10) ปะเก็นยาง
11) แผ่นไม้

3.1.2 วัสดุสำหรับการเพาะเชื้อ

1) เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080
2) อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar, PDA)
3) น้ำกลั่น

3.1.3 วัสดุสำหรับการหมัก

1) เชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080
2) ซับสเตรทที่ใช้ในการทดลอง คือ กากมะพร้าว ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)
3) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง คือ รำข้าวสาลี ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

3.1.4 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์ผล

3.1.4.1 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3) โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)
4) โพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ($KHSO_4$)
5) แอมโมเนียมซัลฟาเมต ($H_6N_2SO_3$)
6) MBTH (methyl -2- benzothai zolinone hydrazine hydrochloride)
7) เฟอร์ริคคลอไรด์ 6-ไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
8) กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (D-(+)-Glucosamine hydrochloride)
9) น้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.2 วัสดุสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1) โซเดียมอะซิเตรทแอนไฮดรัส (CH_3COONa)

2) กรดอะซิติก (CH_3COOH)

3) 3,5–Dinitrosalicylic acid (DNS)

4) โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$)

5) กลูโคสบริสุทธ์ (D-(+)-Glucose)

6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

7) CMC (Carboxymethylcellulose)

8) cellobiose

9) กระดาษกรอง Advantec เบอร์ 1

3.1.5 อุปกรณ์

3.1.5.1 อุปกรณ์สำหรับการสร้างถังแบบแพคเบด

1) สว่านไฟฟ้า

2) กรรไกรตัดเหล็ก

3) ประแจ

4) ไขควง

5) เครื่องเชื่อม

6) เลื่อยจิ๊กซอ

7) คีมย้ำรีเวท

3.1.5.2 อุปกรณ์สำหรับเพาะเชื้อ

1) จานเพาะเชื้อ

2) แท่งแก้วสามเหลี่ยม

3) ไมโครปิเปต

4) ขวดเก็บเชื้อ

5) กล้องจุลทรรศน์

6) เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม

7) ตะเกียงแอลกอฮอล์

8) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

9) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.5.3 อุปกรณ์สำหรับเตรียมซับสเตรท

1) กะละมัง

2) ทัพพี

3) เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 3 กิโลกรัม

4) บีกเกอร์

5) อลูมิเนียมฟอยล์

5) กระบอกตวง

6) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.4 อุปกรณ์สำหรับกระบวนการหมัก

1) ถังหมักแบบหมุน 35 ลิตร
2) ตัวกรองอากาศขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำจากวัสดุ PTFE
3) อุปกรณ์ปรับอัตราการไหลอากาศ
4) ชุดปรับความชื้นอากาศ
5) ปั๊มลม
6) มอเตอร์ กำลัง 15 วัตต์
7) ตัวปรับความเร็วรอบมอเตอร์
8) ซิลเลอร์
9) ชุดปรับอุณหภูมิอากาศ
10) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
11) สำลีก้อน
13) ตู้บ่ม

3.1.5.5 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

1) ช้อนตักตัวอย่าง
2) ถุงเก็บตัวอย่าง
3) ตู้อบลมร้อน
4) ครกบดตัวอย่าง
9) แท่งแก้ว
10) บีกเกอร์
11) ปั๊มสุญญากาศ (Vacumm pump)
12) ขวดเก็บตัวอย่าง
13) หลอดทดลอง

3.1.5.6 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ผล

3.1.5.6.1 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ความชื้น

1) ถ้วยอะลูมิเนียม
2) ตู้อบลมร้อน
3) โถแก้วดูดความชื้น
4) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

3.1.5.6.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Libra S12)
2) คิวเวทท์ (Cuvette)
3) หลอดทดลอง
4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)
5) ไมโครปิเปต
6) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot Plate & Magnetic Stirrer)
8) กระบอกตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9) ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร (Volumetric flask)

10) บีกเกอร์

11) เครื่องชั่งน้ำหนัก

3.1.3.6.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กลูโคซามีน

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Libra S12)

2) คิวเวทท์ (Cuvette)

3) หลอดทดลอง

4) ไมโครปิเปต

5) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

6) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Hot Plate & Magnetic Stirrer)

7) กระบอกตวง

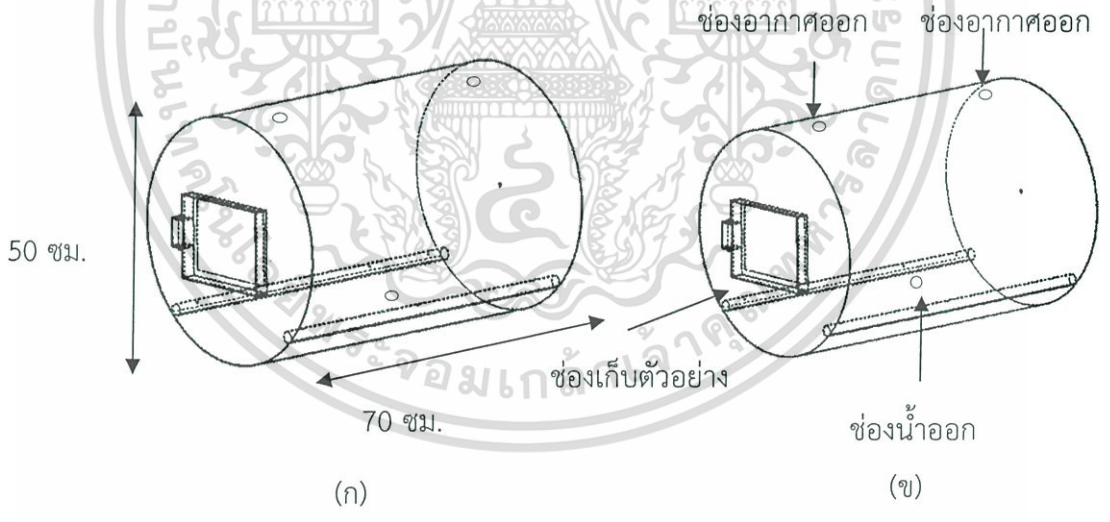
8) บีกเกอร์

9) อ่างน้ำร้อน (Water bath)

10) เครื่องชั่งน้ำหนัก

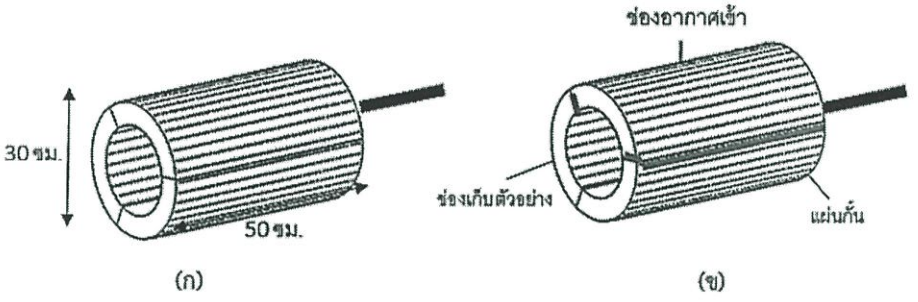
3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การออกแบบถังหมักแบบหมุน



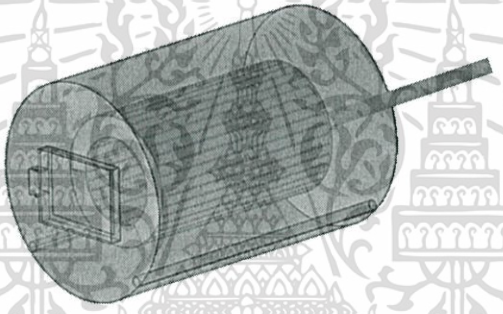
รูปที่ 3.1 องค์ประกอบภายนอกของถังหมักแบบหมุน
(ก) ตัวถังชั้นนอก และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

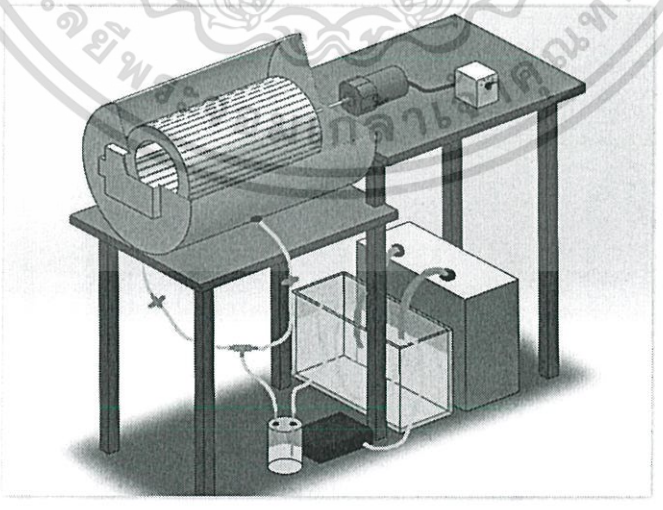


รูปที่ 3.2 องค์ประกอบภายในของถังหมักแบบหมุน
(ก) ตัวถังชั้นใน และ (ข) ส่วนประกอบต่างๆของถังชั้นใน

3.2.2 การประกอบถังหมักแบบหมุน



รูปที่ 3.3 การประกอบถังหมักชั้นนอกและชั้นในเข้าด้วยกัน

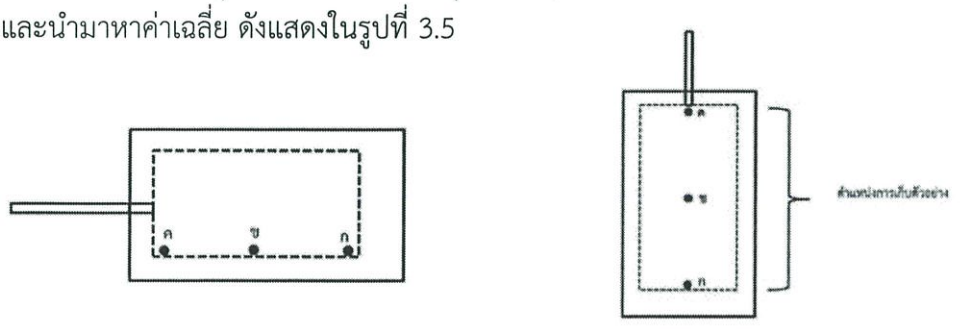


รูปที่ 3.4 ลักษณะการติดตั้งถังหมักแบบหมุนเข้ากับระบบปรับอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การเก็บตัวอย่างภายในถังหมักแบบหมุน

เก็บตัวอย่าง 3 จุด คือ (ก) ด้านหน้าสุดของถัง, (ข) จดกึ่งกลางถัง และ (ค) ด้านหลังสุดของถังหมัก และนำมาหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงในรูปที่ 3.5



(ก) (ข)

รูปที่ 3.5 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในถังหมัก (ก) ภาพตัดขวาง และ (ข) ภาพมุมบน

3.2.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดย ใส่ PDA (Potato dextrose agar) ในอัตราส่วน 39 กรัมต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาพักให้เย็น และใส่จานเพาะเชื้อ รอให้แข็งตัว แล้วนำเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเข้าตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 30 °ซ รอการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บสปอร์ โดยใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.5 การเตรียมซับสเตรท

นำกากมะพร้าวไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นปรับความชื้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ

3.2.6 การหมัก

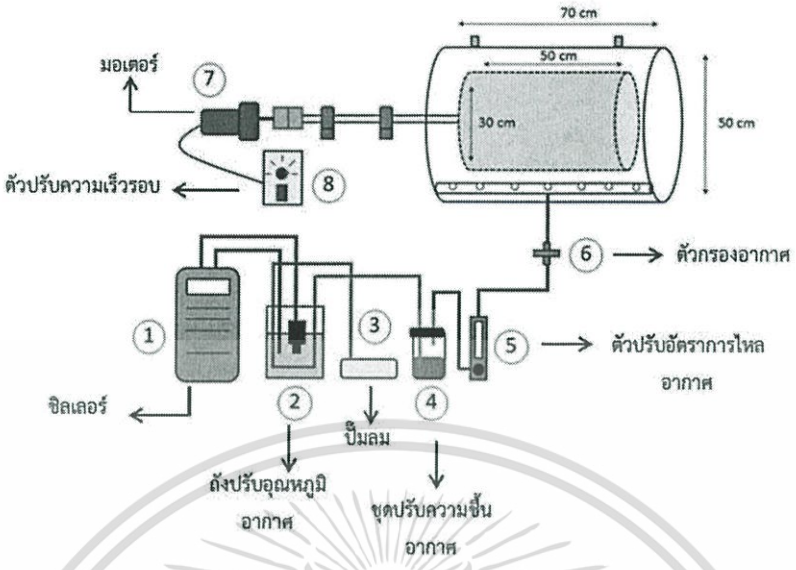
3.2.6.1 การหมักเพื่อหาอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสม

ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 20 มิลลิลิตร อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ศึกษาคือ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 ปริมาณเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 เริ่มต้นแต่ละการทดลอง $1x10^6$ สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทร้อยละ 60 (ฐานเปียก) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ โดยตู้บ่ม ระยะเวลาในการหมัก 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

3.2.6.2 การหมักเพื่อหาอัตราการเติมอากาศด้วยถังหมักแบบหมุน

ทำการหมักในถังหมักแบบหมุนโดยเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่อัตราส่วน 3:2 ศึกษาอัตราการเติมอากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 vvm (vvm คือ ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของกากมะพร้าวต่อนาที) น้ำหนักซับสเตรท 2.8 กิโลกรัม กำหนดความเร็วรอบเริ่มต้นในการหมุนของถังหมักเป็น 6 รอบต่อนาที ร้อยละของปริมาณเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 เริ่มต้นแต่ละการทดลอง $1x10^6$ สปอร์ต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าเท่ากับ 30 °ซ ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก 1 วัน (ระบบการควบคุมสภาวะการหมักในถังหมักแบบหมุน ดังรูป 3.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.6 ระบบการหมักสำหรับถังหมักแบบหมุน

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ความชื้น

นำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนักก่อนอบ จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ จนน้ำหนักคงที่ หลังอบนำไว้ในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักหลังอบ คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสมการที่ (3.1)

$$\text{ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)} = \frac{\text{มวลเปียกของวัสดุ (กรัม)} - \text{มวลแห้งของวัสดุ(กรัม)}}{\text{มวลเปียกของวัสดุ(กรัม)}} \times 100 \qquad (3.1)$$

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำตัวอย่างจากการหมักมาอบจนน้ำหนักคงที่แล้วบดให้ละเอียดเก็บตัวอย่างมา 10 มิลลิกรัม และใส่กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น ร้อยละ 60 ต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปรับความความเข้มข้นให้เหลือร้อยละ 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 121 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปรับให้ค่าความเป็นกรดด่าง ให้เป็นกลาง โดยการเติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรโดยการเติมน้ำกลั่นจากนั้นแบ่งมา 0.5 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมไนไตร ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร มา 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมซัลฟาเมต ความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยมวลต่อปริมาตร มา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วนำมาเขย่าเป็นเวลา 3 นาทีจากนั้น เติม MBTH ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ° ซ เป็นเวลา 3 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว และเติมเฟอริคคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปวิเคราะห์กลูโคซามีนโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณกลูโคซามีนจากสมการ (3.2) ซึ่งได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคซามีน ดังแสดงในภาคผนวก ค.3
สมการมาตรฐาน

$$y = 0.0406x + 0.0071 \ (R^2 = 0.9806) \qquad (3.2)$$

แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
แกน x คือ ค่าปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมกลูโคซามีนต่อมิลลิลิตร)

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.3)

ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)

$$= \frac{\text{ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดก่อนทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \qquad (3.3)$$

3.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส (Exoglucanase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม กระดาษกรอง Advantec เบอร์ 1 ขนาด 2 x 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.4)

Filter paper activity (FP, ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)

$$= \frac{0.185x \text{ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \qquad (3.4)$$

เมื่อ ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส คำนวณได้จากสมการที่ (3.7)

3.3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (Endoglucanase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม CMC (Carboxymehylcellulose) ร้อยละ 2 ใน CH_3COONa ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็น จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.5)

Carboxymethylcellulase activity (CMC, ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)

$$= \frac{0.185x \text{ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (3.5)$$

เมื่อ ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส คำนวณได้จากสมการที่ (3.7)

3.3.5 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Beta-glucosidase activity)

นำตัวอย่างกากมะพร้าวที่ได้จากการหมักบนอาหารแข็ง 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์จากนั้นทำการกสัดเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย CH_3COONa ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองเอากากมะพร้าวออกโดยใช้เครื่องกรองสูญญากาศ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการเติม CH_3COONa 2 มิลลิลิตร และเติมเซลลูโลไบโอส ที่มีความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ในสารละลาย CH_3COONa 0.05 โมลาร์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็น ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

คำนวนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสในหน่วย ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ดังสมการที่ (3.6)

Cellobiase activity (CB, ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)

$$= \frac{0.0926x \text{ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรทั้งหมดในการสกัด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \quad (3.6)$$

เมื่อ ค่า x คือ ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส คำนวณได้จากสมการที่ (3.7)

3.3.6 การวิเคราะห์เอนไซม์ด้วยวิธี DNS method

หลังจากสกัดเอนไซม์จากกากมะพร้าวหมักด้วยการแช่สารละลายบัฟเฟอร์ CH_3COONa (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) นำสารละลายส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการยับยั้งปฏิกิริยา นำไปเขย่า 3 นาที จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959)

คำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสจากสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐานกลูโคส ดังแสดงในภาคผนวก ค.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการมาตรฐาน

$$y = 22.89x + 0.2133 \ (R^2 = 0.9803) \qquad (3.7)$$

เมื่อ แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

แกน x คือ ค่าปริมาณความเข้มข้น (มิลลิกรัมกลูโคสต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน)

จากการหมักกากมะพร้าวโดยเชื้อ *T. reesei* TISTR3080 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) เป็นเวลา 7 วัน ที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3 นำไปวัดความชื้น ปริมาณกลูโคซามีน ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นดังนี้

4.1.1 ความชื้น

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลีลงในการหมัก (อัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:0) พบว่าหลังการหมักความชื้นมีการลดลงจากความชื้นเริ่มต้น โดยมีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 21.68 ± 15.60 (ฐานเปียก) ซึ่งพบว่าในอัตราส่วน 3:0 นี้ มีความชื้นต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการหมักโดยมีการเติมรำข้าวสาลีดังรูปที่ 4.1 อาจเนื่องมาจากวัสดุแต่ละชนิดมีการดูดซับน้ำที่แตกต่างกัน

เมื่อทำการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีในการหมัก หลังการหมักพบว่าความชื้นมีการลดลงจากตอนเริ่มต้น และพบว่าเมื่อเติมรำข้าวสาลีลงไปในการหมักช่วยให้การดูดซับน้ำดีขึ้น โดยการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:1 พบว่าหลังการหมักความชื้นมีการลดลงจากเริ่มต้น โดยมีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.70 ± 13.08 เมื่อปรับอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:2 พบว่ามีความชื้นโดยเฉลี่ยตลอดการหมักใกล้เคียงกันเท่ากับร้อยละ 27.70 ± 13.08 และเมื่อทดลองปรับอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีให้เท่ากันคือที่อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีเป็น 3:3 พบว่ามีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 26.70 ± 13.55 ซึ่งจากการเติมรำข้าวสาลีในการหมักมีความชื้นที่สูงกว่าแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) ดังรูปที่ 4.1

ซึ่งความชื้นที่ลดลงระหว่างการหมัก อาจเนื่องมาจากผลของการหายใจของเชื้อรา ทำให้เกิดความร้อนขึ้นระหว่างการหมัก และในการหมักในขวดทดลองรูปชมพู่ไม่มีการระบายความร้อนของซับสเตรทที่เพียงพอ เมื่อมีความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้น้ำมีการระเหยออกไปจากซับสเตรท

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.1.2.1 การเจริญของเชื้อรา

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:0 เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 โดยการหาปริมาณกลูโคซามีน ในตัวอย่างกากมะพร้าวบดแห้ง พบว่าที่การเริ่มของการหมักมีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นเท่ากับ 55.97 ± 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และในวันที่ 5 ของการหมักพบว่า เชื้อรามีการเจริญสูงที่สุด วัดปริมาณกลูโคซามีนได้ 75.96 ± 21.55 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง (ดังรูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการหมักโดยมีการรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้เชื้อรา พบว่าเชื้อรามีการเจริญเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 มีการเจริญของเชื้อราสูงสุด จากการวัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 73.54 ± 1.60 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 253.67 ± 14.96 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ถัดมาเป็นอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อลำข้าวสาลีที่ 3:2 และ 3:1 ตามลำดับ โดยการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 64.92 ± 3.85 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง วัดการเจริญสูงสุดของเชื้อราได้ในวันที่ 6 ของการหมัก มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 157.36 ± 23.29 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:1 วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 55.97 ± 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง มีการของเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการหมัก มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 75.96 ± 21.55 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ซึ่งจากปริมาณกลูโคซามีนที่วัดได้จากการเติมรำข้าวสาลีทั้ง 3 อัตราส่วนคือ 3:1, 3:2, และ 3:3 มีค่ามากกว่าที่อัตราส่วน 3:0 แสดงว่าเชื้อรามีการเจริญที่การหมักแบบมีการเติมรำข้าวสาลีดีกว่าไม่มีการเติมรำข้าวสาลี ดังรูปที่ 4.2

4.1.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา (Specific growth rate)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณกลูโคซามีน โดยใช้การคำนวณจากสมการ การเจริญของเชื้อราที่ระยะ exponential (สมการที่ 2.2) ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองพบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:2 และ 3:1 ตามลำดับ โดยในการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:0 มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่มีการเติมรำข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ

อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$)
3:0	0.024
3:1	0.034
3:2	0.062
3:3	0.091

4.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.06 ± 0.16 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุด

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:1 และ อัตราส่วน 3:3 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:2 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.23 ± 0.08 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:3 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.19 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 1 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสสูงกว่า (รูปที่ 4.3) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

4.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0 แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.027 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

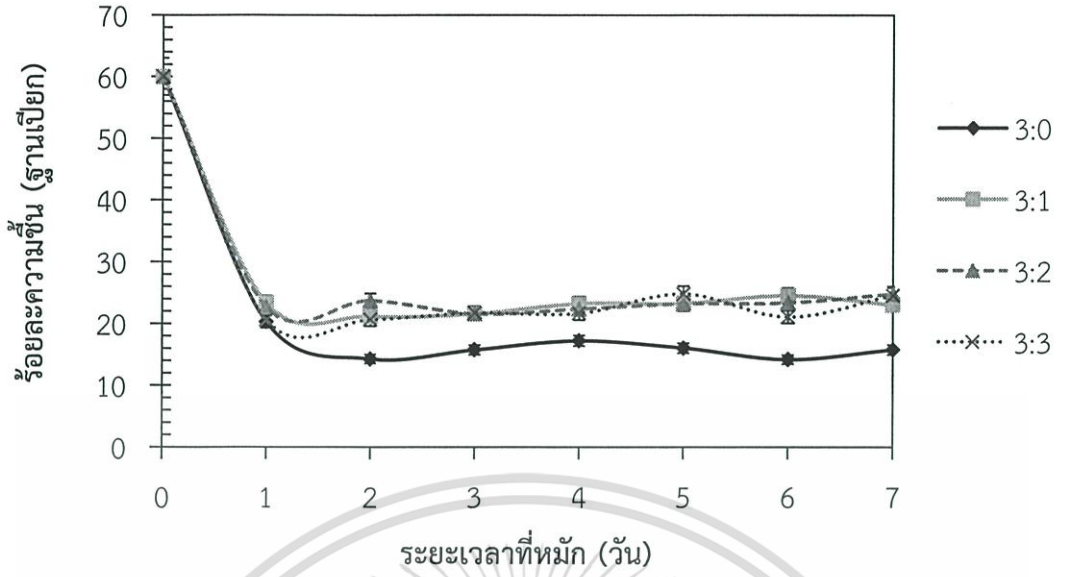
ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:1 และ อัตราส่วน 3:3 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:2 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.21 ± 0.01 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:3 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.17 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสสูงกว่า (รูปที่ 4.4) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

4.1.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

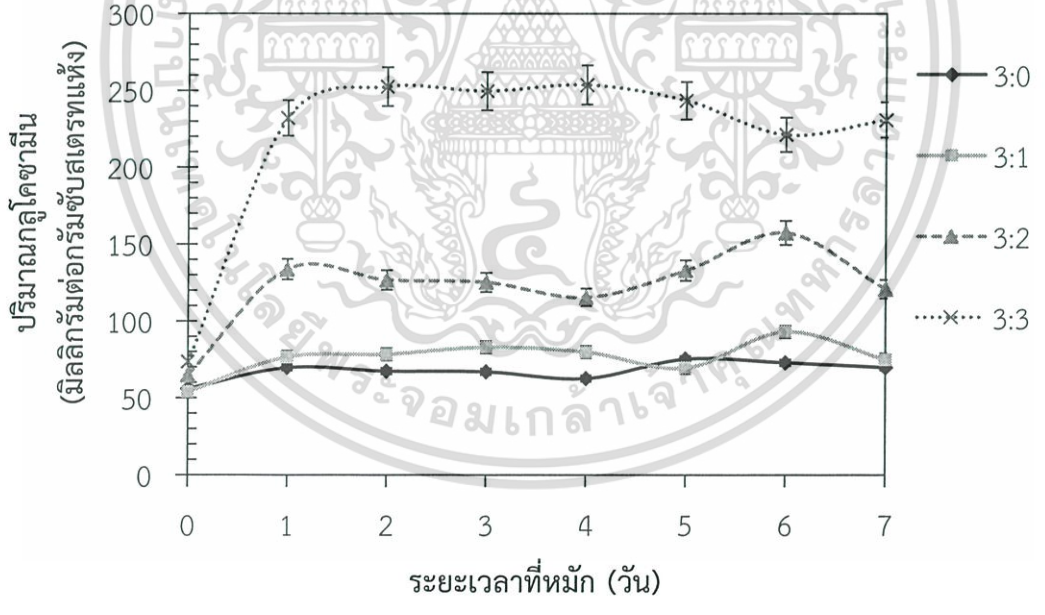
จากการหมักกากมะพร้าวในขวดทดลองรูปชมพู่ โดยไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 0.37 ± 0.2 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 7 ของการหมัก

ในการหมักกากมะพร้าวโดยมีการเติมรำข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3 เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราส่วน 3:2 และ อัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 3:3 สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.00 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราส่วน 3:2 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราส่วน 3:1 วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก แล้วเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมรำข้าวสาลี (อัตราส่วน 3:0) พบว่าการเติมรำข้าวสาลีมีผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่า (รูปที่ 4.5) แสดงว่าการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

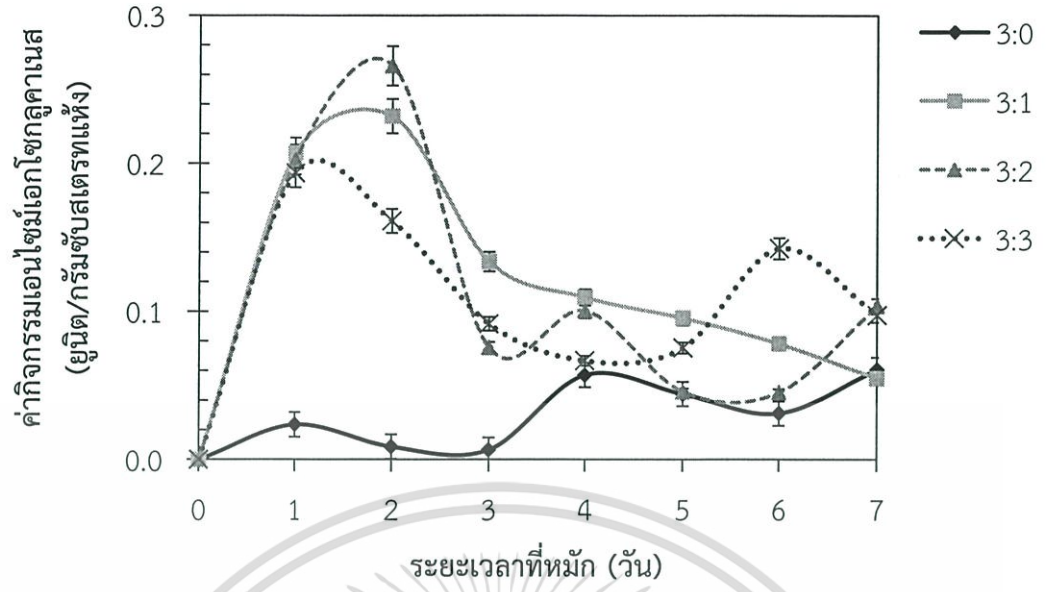


รูปที่ 4.1 ความชื้นระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

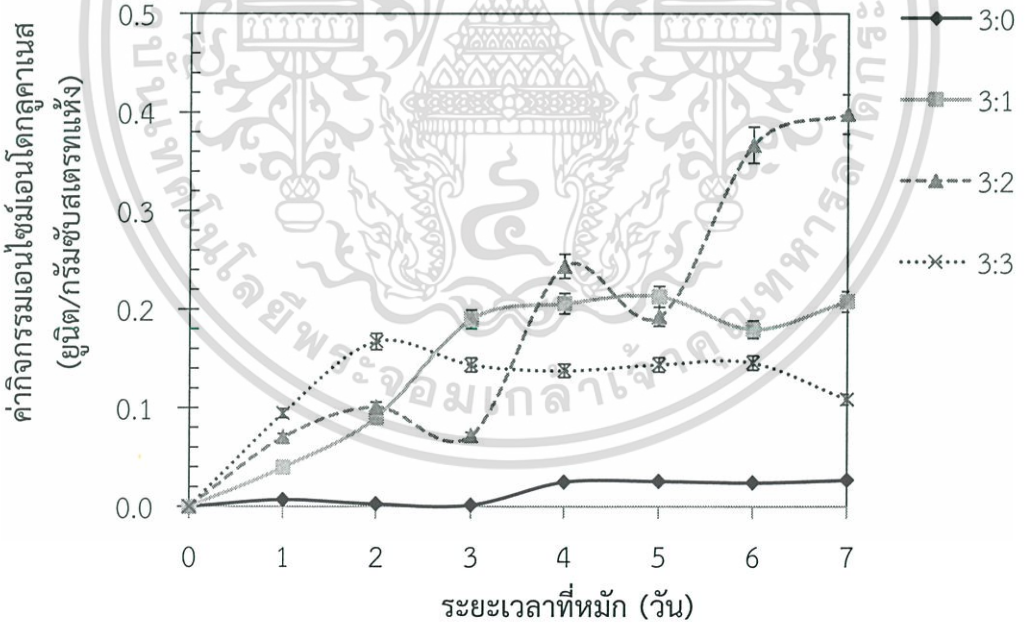


รูปที่ 4.2 ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

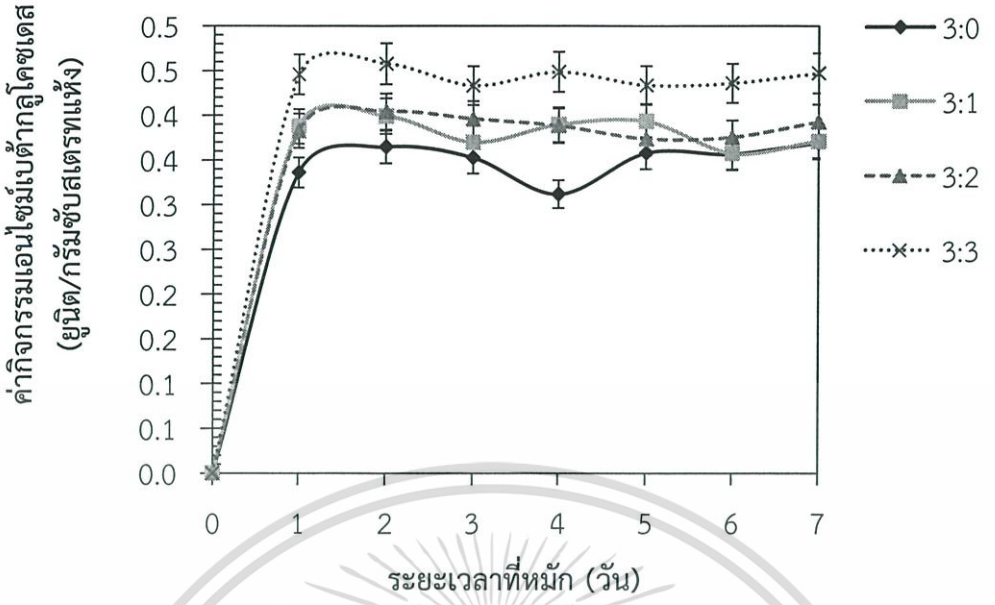


รูปที่ 4.3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีใน อัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3



รูปที่ 4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีใน อัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างการหมักที่การเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีในอัตราส่วน 3:0, 3:1, 3:2 และ 3:3

4.2 การวิเคราะห์ผลของการเติมอัตราการเติมอากาศ

จากการหมักกากมะพร้าวโดยเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 ในถังหมักแบบหมุนขนาด 35 ลิตร โดยเลือกใช้อัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 เป็นเวลา 5 วัน วัน มีการควบคุมอุณหภูมิอากาศขาเข้าที่ 30 °ซ ควบคุมความเร็วรอบที่ 6 รอบต่อนาที ความชื้นเริ่มต้นในการหมักเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก) อัตราการเติมอากาศที่ศึกษาคือ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm นำไปวัดความชื้น ปริมาณกลูโคซามีน ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นดังนี้

4.2.1 ความชื้น

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นพบว่าความชื้นมีการลดลงจากตอนเริ่มต้น โดยอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm มีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.48 ± 15.98 (ฐานเปียก) เมื่อทำการทดลองปรับอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm พบว่ามีความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 27.97 ± 15.70 (ฐานเปียก) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm และเมื่อการทดลองหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยเพิ่มอัตราการเติมอากาศให้มีปริมาณมากขึ้น โดยปรับอัตราการเติมอากาศเป็น 1.5 vvm พบว่าความชื้นมีการลดต่ำลงมากที่สุด โดยวัดความชื้นเฉลี่ยตลอดการหมักได้เท่ากับร้อยละ 24.65 ± 17.44 (ฐานเปียก)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศความชื้นสูงกว่ากว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ โดยความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉลี่ยตลอดการหมักเท่ากับร้อยละ 28 ± 15.25 (ฐานเปียก) (ดังรูปที่ 4.6) แสดงว่าการหมักแบบเติมอากาศในถังหมักแบบหมุนมีผลต่อความชื้น โดยการเพิ่มปริมาณอากาศในอัตราสูง มีผลทำให้ซับสเตรทมีความแห้งมากขึ้น และสูญเสียความชื้นไป

4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.2.2.1 การเจริญของเชื้อรา

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุนและมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* TISTR3080 โดยการหาปริมาณกลูโคซามีน ในตัวอย่างกากมะพร้าวบดแห้ง พบว่าที่การอัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm มีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาเป็นอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 79.70 ± 15.03 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 202.77 ± 87.18 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง, ที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 107.78 ± 37.69 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 161.06 ± 10.77 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 71.32 ± 6.08 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 151.12 ± 4.48 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการเจริญของเชื้อราต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ วัดปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นได้เท่ากับ 64.92 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง และมีการเจริญของเชื้อราสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการหมัก วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 133.72 ± 4.76 มิลลิกรัมต่อกรัมซับสเตรทแห้ง (รูปที่ 4.7)

4.2.2.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา (Specific growth rate)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณกลูโคซามีน โดยใช้การคำนวณจากสมการ การเจริญของเชื้อราที่ระยะ exponential (สมการที่ 2.2) ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$) ของเชื้อราที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ

อัตราการเติมอากาศ (vvm)	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน$^{-1}$)
0 (หมักในขวดรูปชมพู่)	0.089
0.5	0.082
1.0	0.101
1.5	0.093

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อราสูงที่สุด รองลงมาคือ 1.5 , 0 และ 0.5 vvm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

4.2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.09 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.44 ± 0.06 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.33 ± 0.07 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการผลิตไซม์เอกโซกลูคาเนสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศสามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก (รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสมากที่สุด

4.2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส

จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm และ 0.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.31 ± 0.04 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.28 ± 0.09 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.33 ± 0.07 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ มีการผลิตไซม์เอนโดกลูคาเนสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศ สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.24 ± 0.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก (รูปที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

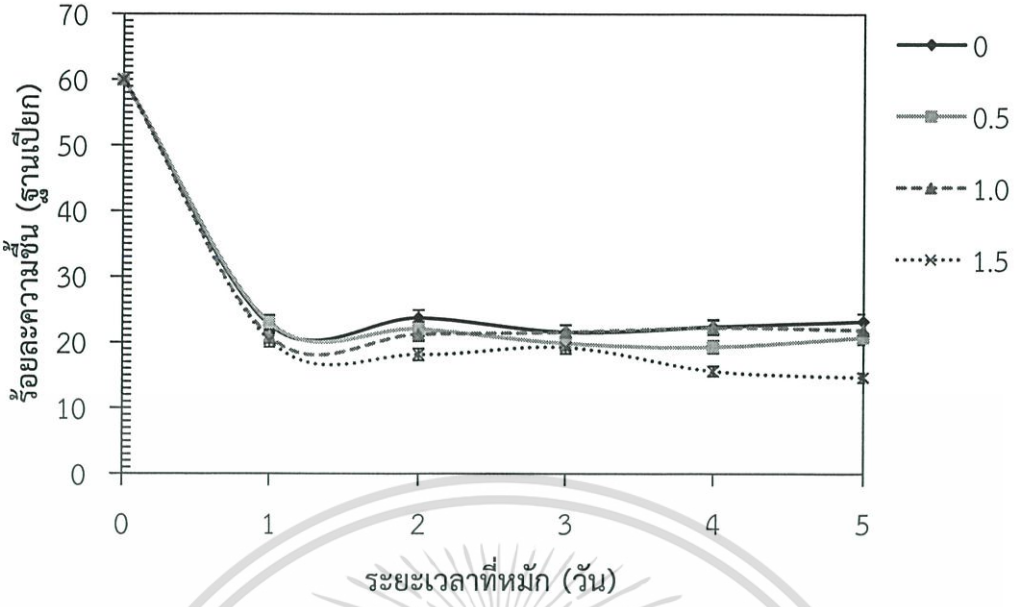
แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนสมากที่สุด

4.2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

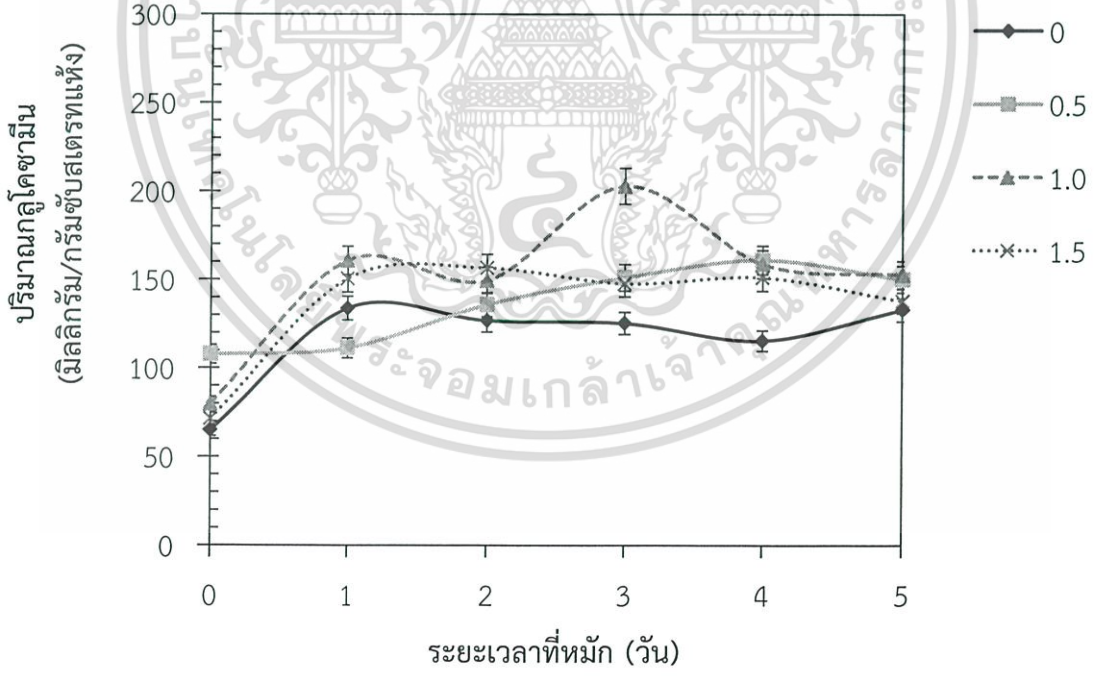
จากการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 โดยใช้ถังหมักแบบหมุน และมีการเติมอากาศระหว่างการหมัก แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุด รองลงมาคืออัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.54 ± 0.21 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก, อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.46 ± 0.05 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 5 ของการหมัก และอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.03 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 4 ของการหมัก

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ โดยเปรียบเทียบกับการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 (หมักในขวดรูปชมพู่) ที่ระยะเวลาในการหมัก 5 วัน พบว่าที่การหมักแบบไม่มีการเติมอากาศมีการผลิตไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ต่ำกว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศที่ 1.0 และ 0.5 vvm สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 0.40 ± 0.02 ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง ในวันที่ 2 ของการหมัก (รูปที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบมีการเติมอากาศโดยใช้ถังหมักแบบหมุนเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในอัตราที่สูงกว่าการหมักแบบไม่มีการเติมอากาศ (หมักในขวดรูปชมพู่) โดยที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนโดกลูคาเนสมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

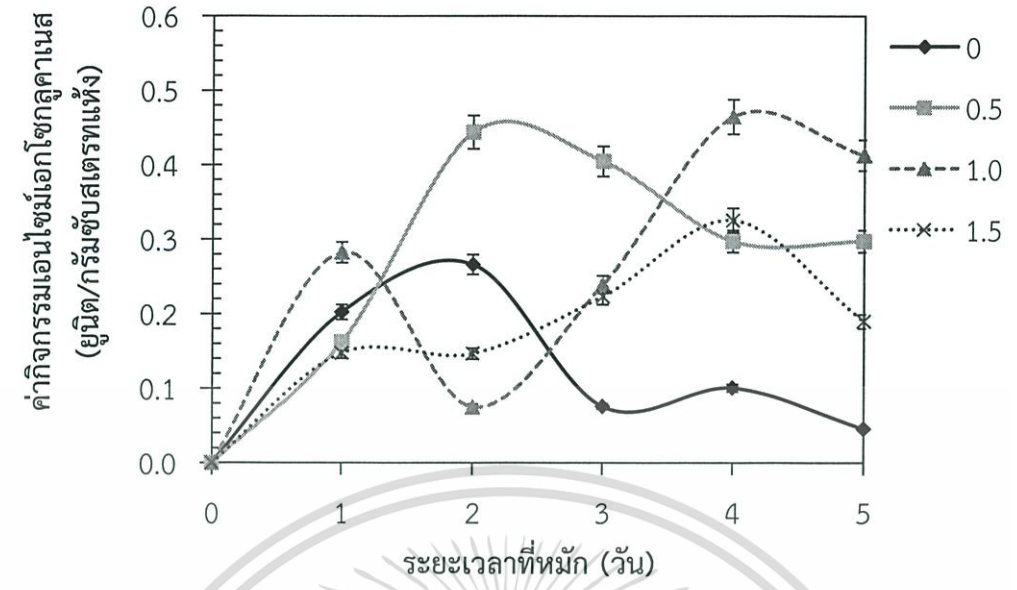


รูปที่ 4.6 ความชื้นระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

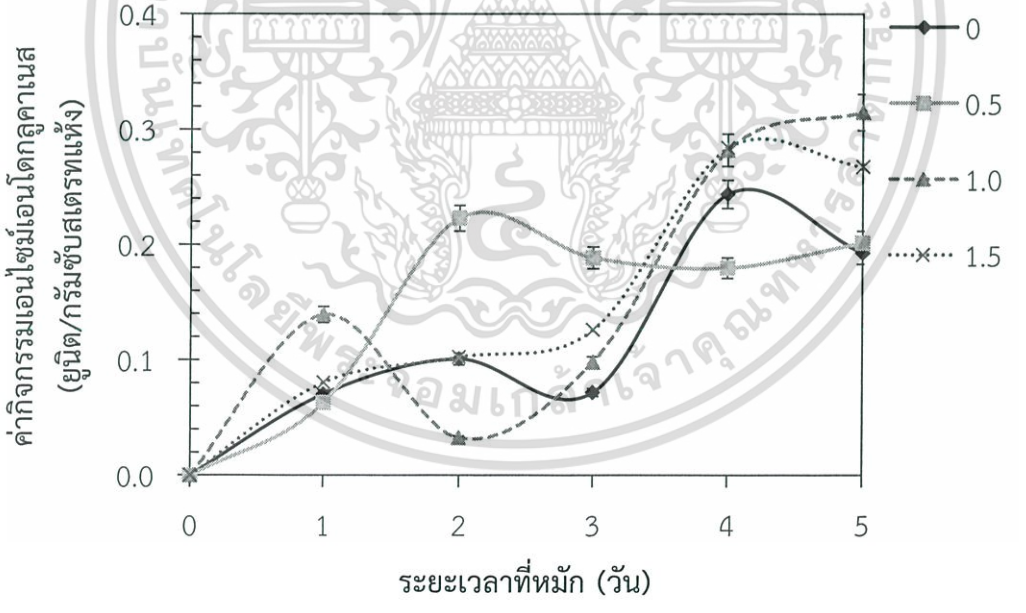


รูปที่ 4.7 ปริมาณกลูโคซามีนระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

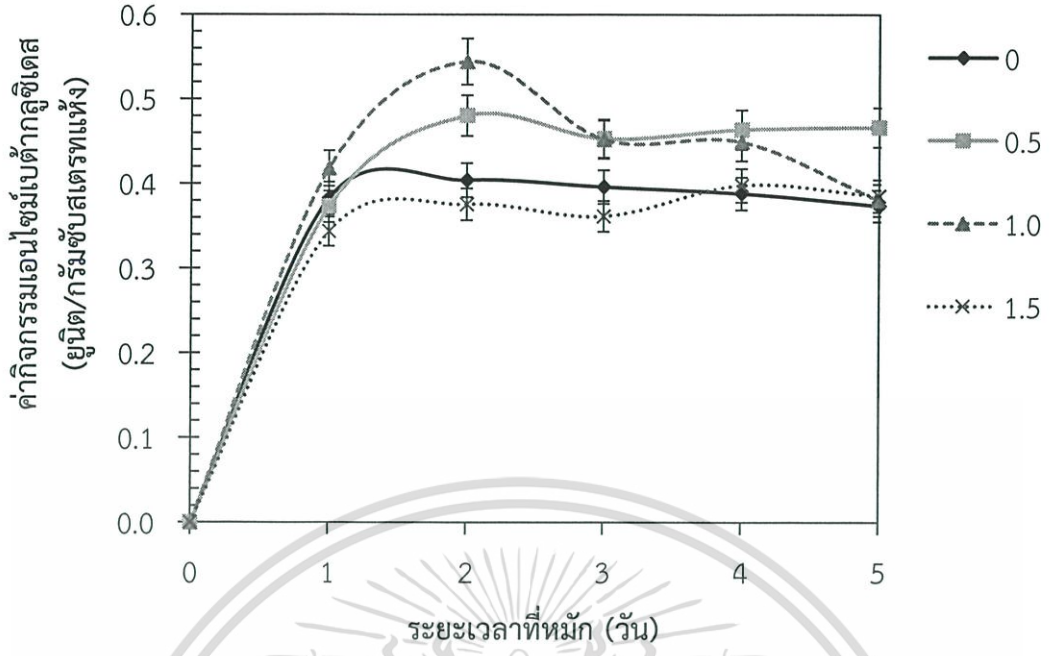


รูปที่ 4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm



รูปที่ 4.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศ ที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสระหว่างหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การเติมรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ในระหว่างการหมักนั้นส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา และอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080 โดยการหมักกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่อัตราส่วน 3:2 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส และเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส ในขณะที่อัตราส่วน 3:3 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูซิเดสและการเจริญของเชื้อรา เมื่อทำการทดลองการเติมอากาศในถังหมักแบบหมุนโดยการหมักในอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 พบว่าการเจริญและอัตราการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 ในขวดรูปชมพูโดยไม่มีการเติมอากาศ พบว่าอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส, เอนโดกลูคาเนส และเบต้ากลูโคซิเดส รวมทั้งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR3080 อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการปรับปรุงชุดปรับความชื้นอากาศ โดยใช้ถังที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ให้สามารถบรรจุน้ำได้มากขึ้น ช่วยให้มีปริมาณที่มาก ไม่ต้องเติมน้ำบ่อย แต่ควรเติมน้ำเป็นระยะ เพื่อให้อากาศมีความชื้นตลอดเวลา

2. ในกระบวนการหมักควรมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา และควรระวังการปนเปื้อนในระหว่างทำการหมัก

3. ในการหมักในถังหมักแบบหมุน ควรเปลี่ยนตะแกรงรองซับสเตรทให้มีความถี่ของช่องน้อยลง เพื่อป้องกันการหกของซับสเตรทตามรูตะแกรงระหว่างที่ถังหมักมีการหมุนเพื่อกวนซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จุฑามาศ รถา. 2553. การผลิตเอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อราที่แยกจากดิน. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บันฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

จุรีรัตน์ สุดชะเน, ชนานันท์ หุตางกูร, ปิ่นหทัย ขำคมเขต และพวงผกา คุ้มสีไว. 2555. การคัดเลือกเชื้อราทนร้อนที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสย่อยสลายชานอ้อยเพื่อใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตเอทานอล โดย *saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

ชุติเดช เพิ่มศรีบรูสุข, ปริปก พศิสุวรรณ และกนก รัตนะกนกชัย. 2557. การศึกษาเชิงเปรียบเทียบการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสบริสุทธิ์ฟางข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดลิกนินด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma* . วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 45 (2) : 341-344.

ธัญรัตน์ สหายา, จรัญ ฉัตรมานพ และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2551. การพัฒนาถังหมักแพคเบดเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับการหมักแบบแห้ง. บทความวิจัย. 11 (1) : 83-89.

นฤมล สมคุณา, จรัส สว่างทัพ, จิรประภา รอดจากเข็ญ และสุรศักดิ์ อุตรวิเชียร. 2557. การศึกษาการเพิ่มระดับโปรตีนของกากมะพร้าวสดและแห้ง. แก่นเกษตร. 42 (1) : 290-294.

เนริสา คุณประทุม. 2543. การผลิตไซแลนเนสจาก *Trichoderma reesei* โดยวัสดุเหลือใช้จาก การเกษตร. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และสิทธินันท์ ท่อแก้ว. 2550. การผลิตเอนไซม์ไตรโคเดอร์-มา รีสิอี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ภูษิต สายแวว, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2556. การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำปะหลังในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแพคเบด. วิศวกรรมสาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 : 75-83.

มัณฑนา โคติบุญโล. 2545. การออกแบบระบบให้อากาศของถังหมักแบบหมุนสำหรับการหมักแบบแห้ง. ปริญญานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรา ศรีกัลยานุกูล, ฐปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. 2555. การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ. รายงานผลการวิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ งบประจำปี 2554.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วาทิต ชนัศรุติพันธุ์. 2545. จลนศาสตร์การเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะมิเลสโดย *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์ สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญทัศน์ สินจรูญศักดิ์. 2553. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสโดยเชื้อรา *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร, ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

สุภัตรา โอกระโทก. 2556. ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* เพื่อเป็นอาหารในไก่ไข่ . วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อภิวิชญ์ ทองแก้วยวน และธนัญชนก ไชยรินทร์. 2559 . การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง. แก่นเกษตร. 44 (1) : 924 -929.

Ali, H.K.Q. and Zulkali, M.M.D. 2011. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation. Engineering aspects of food biotechnology quarterly. 25 : 255-266.

Bhat, M.K. 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnology advances. 18 (5) : 355–383.

Chisti,Y. 1999. Fermentation (industrial). Basic considerations: 663-674.

Couto, R.S. and Sanroman, A.M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. Journal of food engineering. 76 (3) : 291–302.

Jourdier, E. 2013 . Modeling and optimization of cellulase production by *Trichoderma reesei* for lignocellulosic bio refineries.[ออนไลน์]. http:// www.ifpenergiesnouvelles.com/Expertise/Research-divisions/Applied-Chemistry-and-Physical-Chemistry/Microorganisms-change-their-diet. สืบค้นวันที่ 27/05/2017.

Klein, D.W., Lansing, M., and Harlay, .J. 2004. Microbiology . New York: McGraw-Hill.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31 : 426-428.

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Journal of biochemical engineering. 13 (2–3) : 81-84.

Richmond, T.A. and Somerville, C.R. 2000. The cellulose synthase superfamily. Plant physiology, 124 (2) : 495–498.

Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers. 116 : 1-56.

Tokuoka, M., Sawamura, N., Kobayashi, K. and Mizuno, A.J. 2010. Simple metabolite extraction method for metabolic profiling of the solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. Journal of bioscience and bioengineering. 110 (6) : 665–669.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yang, Z., Zhang, B., Chen, X., Bai, Z. and Zhang, H. 2008. Studies on pyrolysis of wheat straw residues from ethanol production by solid-state fermentation. Journal of analytical and applied pyrolysis. 81 (2) : 243–246.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก องค์ประกอบของกากมะพร้าว

ก.1 องค์ประกอบของกากมะพร้าว

ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง

ข.1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

ข.2 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบ

ค.1 ความชื้น

ค.2 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์

ค.3 ผลการวัดปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์

ภาคผนวก ง ถังหมัก

ง.1 ส่วนประกอบของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
องค์ประกอบของกากมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.1
องค์ประกอบของกากมะพร้าว

ตารางที่ ก.1 องค์ประกอบของกากมะพร้าว

รายการที่ตรวจวิเคราะห์, ทดสอบ	รหัส 397	Method
ความชื้น (%)	4.62	AOAC 18th ed., 2010, Method 934.01
โปรตีน (%)	6.47	AOAC 18th ed., 2010, Method 984.13
ไขมัน (%)	30.94	AOAC 18th ed., 2010, Method 2003.05
เยื่อใย (%)	34.89	AOAC 18th ed., 2010, Method 962.09
เถ้า (%)	1.16	AOAC 18th ed., 2010, Method 942.05
เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (AIA)(%)	0.02	AOAC 18th ed., 2010, Method 942.05
NDF (%)	65.52	Neutral Detergent Fiber /Forage Fiber Analysis. Goering and Van Soest, 1970
ADF (%)	55.65	Acid Detergent Fiber /Forage Fiber Analysis. Goering and Van Soest, 1970
ลิกนิน (%)	16.29	Acid Detergent Lignin /Forage Fiber Analysis. Goering and Van Soest, 1970

* ตรวจวิเคราะห์ โดยฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ข้อมูลดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.1
วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

1. ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

1. นำผงกลูโคซามีนบริสุทธิ์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำสารละลายมาผสมกับสารละลาย $NaNO_2$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และ $KHSO_4$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายใสปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที

4. เติม MBTH ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร

5. นำของผสมไปต้มเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาลดอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว

6. เติม $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

7. วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

8. ทำตามข้อ 2 - 7 เพื่อทำแบลงสำหรับปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่ง “ศูนย์” (Set zero)

2. ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. นำผงกลูโคสบริสุทธิ์ (D-(+)-Glucose) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.03 0.05 0.07 และ 0.10 โดยมวลต่อปริมาตร

2. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 ในแต่ละความเข้มข้น ไปวิเคราะห์โดยการปิเปตสารละลายกลูโคส (สารละลายมาตรฐาน) ดังกล่าว จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง

3. เติมสารละลาย DNS reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาลดอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว

5. เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7. ทำตามข้อ 3-6 เพื่อทำแบลงสำหรับปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่ง “ศูนย์” (Set zero)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.2
วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยการใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biochem, Single Beam Spectrophotometer Libra S12 200-999 nm , England)

1. เปิดเครื่อง Spectrophotometer

2. กดปุ่ม F2 ของตัวเครื่องเมื่อหน้าจอขึ้นแสดงผล เพื่อทำการปรับค่ามาตรฐานเครื่อง (Calibration)

3. กดปุ่ม λ เพื่อป้อนค่าความยาวคลื่นที่ต้องการวัด

4. เติมสารละลาย (blank) ให้ได้ประมาณร้อยละ 80 ของคิวเวทท์ จากนั้นนำคิวเวทท์ด้านใส เข้าหาด้านลำแสง แล้วทำการปิดฝาช่องใส่คิวเวทท์ กดปุ่ม □ เพื่อปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่งศูนย์

5. นำสารละลายที่เตรียมไว้มาทำการวัด โดยเริ่มต้นจากสารละลายที่ความเข้มข้นต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ข้อมูลดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.1
ความชื้น

ตารางที่ ค.1.1 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.8177	4.0105	16.75
2	4.3517	3.8563	11.38
3	3.6513	3.2294	11.55
4	4.6080	3.9653	13.95
5	3.8592	3.2923	14.69
6	4.8678	4.1233	15.29
7	3.8124	3.2162	15.64

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.2 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.9288	3.9050	20.77
2	4.4449	3.7177	16.36
3	3.8496	3.0373	21.10
4	4.9295	3.9557	19.75
5	3.6873	3.2391	12.16
6	4.3244	3.8128	11.83
7	3.6042	3.0632	15.01

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.3 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0 (การทดลองครั้งที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.2152	3.2339	23.28
2	4.8698	4.1367	15.05
3	3.5752	3.0551	14.55
4	5.1973	4.2684	17.87
5	4.0163	3.1625	21.26
6	3.6956	3.1265	15.40
7	2.8168	2.3486	16.62

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.4 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:0

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	16.7549	20.7718	23.2800	20.2689
2	11.3841	16.3603	15.0540	14.2661
3	11.5548	21.1009	14.5474	15.7344
4	13.9475	19.7545	17.8727	17.1916
5	14.6896	12.1552	21.2584	16.0344
6	15.2944	11.8305	15.3994	14.1748
7	15.6384	15.0103	16.6217	15.7568

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.5 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	3.3712	2.5641	23.94103
2	2.8289	2.2611	20.07141
3	5.2908	4.1643	21.29168
4	5.3029	4.1643	21.47127
5	5.1123	4.0548	20.68541
6	5.0725	3.9802	21.53376
7	4.8429	3.9233	18.98862

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.6 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	3.3006	2.5153	23.7926
2	2.9324	2.2658	22.7322
3	4.1337	3.1432	23.9616
4	5.0904	3.8312	24.7368
5	4.0137	3.0382	24.3043
6	5.0773	3.7249	26.6362
7	4.4072	3.0975	29.7173

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.7 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1 (การทดลองครั้งที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	3.5541	2.7611	22.3123
2	2.7972	2.2180	20.7064
3	5.2295	4.2117	19.4627
4	5.0400	3.8609	23.3948
5	5.6678	4.2638	24.7715
6	5.1399	3.8337	25.4129
7	5.1118	4.0675	20.4292

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.8 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:1

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	23.9410	23.7926	22.3123	23.3486
2	20.0714	22.7322	20.7064	21.1700
3	21.2917	23.9616	19.4627	21.5720
4	21.4713	24.7368	23.3948	23.2010
5	20.6854	24.3043	24.7715	23.2537
6	21.5338	26.6362	25.4129	24.5276
7	18.9886	29.7173	20.4292	23.0450

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.9 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	5.5927	4.1942	25.0058
2	5.1311	4.0416	21.2333
3	5.3161	4.1720	21.5214
4	4.7599	3.8605	18.8954
5	5.1284	4.0543	20.9442
6	5.1234	3.9337	23.2209
7	5.1530	4.0344	21.7077

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.10 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	5.1868	3.9982	22.9159
2	4.8775	3.4196	29.8903
3	5.0192	3.8943	22.4119
4	4.8768	3.7849	22.3897
5	4.6483	3.0940	33.4380
6	5.1547	3.8692	24.9384
7	4.6543	3.2202	30.8124

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.11 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2 (การทดลองครั้งที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	5.2585	4.2047	20.0399
2	5.2136	4.172	19.9785
3	5.3312	4.2251	20.7477
4	5.9544	4.4178	25.8061
5	5.3412	4.5296	15.1951
6	5.1944	4.0558	21.9198
7	5.2110	4.0751	21.7981

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.12 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:2

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	25.0058	22.9159	20.0399	22.6539
2	21.2333	29.8903	19.9785	23.7007
3	21.5214	22.4119	20.7477	21.5603
4	18.8954	22.3897	25.8061	22.3637
5	20.9442	33.4380	15.1951	23.1924
6	23.2209	24.9384	21.9198	23.3597
7	21.7077	30.8124	21.7981	24.7727

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.13 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.9345	4.0287	18.3565
2	4.9204	4.0947	16.7812
3	4.9496	3.9572	20.0501
4	5.2050	4.0935	21.3545
5	5.2474	3.9726	24.2939
6	4.7730	3.8131	20.1110
7	4.8007	3.8153	20.5262

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.14 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.4922	3.7424	16.6912
2	4.8561	3.8879	19.9378
3	4.5973	3.7143	19.2069
4	5.0359	3.8576	23.3980
5	4.8741	3.7274	23.5264
6	4.5770	3.5411	22.6327
7	4.7980	3.6075	24.8124

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.15 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3 (การทดลองครั้งที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.6260	3.3902	26.7142
2	5.7960	4.3392	25.1346
3	4.2753	3.1690	25.8765
4	5.2224	4.1672	20.2053
5	4.1070	3.0159	26.5668
6	5.0479	4.0159	20.4441
7	4.2189	3.0251	28.2965

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.16 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลี (แหล่งไนโตรเจน) ที่ 3:3

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	18.3565	16.6912	26.7142	20.5873
2	16.7812	19.9378	25.1346	20.6178
3	20.0501	19.2069	25.8765	21.7112
4	21.3545	23.3980	20.2053	21.6526
5	24.2939	23.5264	26.5668	24.7957
6	20.1110	22.6327	20.4441	21.0626
7	20.5262	24.8124	28.2965	24.5450

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.17 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.7224	3.6044	23.6744
2	3.9955	3.1005	22.4002
3	4.1601	3.2912	20.8865
4	3.4069	2.6726	21.5533
5	4.9253	3.8622	21.5845

* (จุดที่ 1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.18 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.6725	3.5467	24.0942
2	4.9464	3.9500	20.1439
3	4.0509	3.2896	18.7934
4	3.3665	2.7758	17.5464
5	4.8821	3.9296	19.5100

* (จุดที่ 2) กึ่งกลางถังหมัก, ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.19 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.4128	3.4802	21.1340
2	4.8164	3.6848	23.4947
3	3.9802	3.1902	19.8482
4	3.6974	3.0016	18.8186
5	4.7161	3.7183	21.1573

* (จุดที่ 3) ด้านหลังสุดของถังหมัก, ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.20 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	23.6744	24.0942	21.1340	22.9675
2	22.4002	20.1439	23.4947	22.0130
3	20.8865	18.7934	19.8482	19.8427
4	21.5533	17.5464	18.8186	19.3061
5	21.5845	19.5100	21.1573	20.7506

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.21 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	5.1646	4.1770	19.1225
2	5.4202	4.4087	18.6617
3	5.1074	4.2757	16.2842
4	5.5971	4.6860	16.2781
5	5.5218	4.6237	16.2646

* (จุดที่ 1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.22 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.9311	3.9607	19.6792
2	4.7659	3.9527	17.0629
3	5.4378	4.2965	20.9883
4	5.1124	4.2829	16.2253
5	5.4918	4.5868	16.4791

* (จุดที่ 2) กึ่งกลางถังหมัก, ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.23 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่าง

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.6754	3.4193	26.8662
2	5.5174	4.4514	19.3207
3	3.7102	3.1242	15.7943
4	5.4958	4.6449	15.4827
5	3.8524	3.2655	15.2347

* (จุดที่ 3) ด้านหลังสุดของถังหมัก ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.24 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.0 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	21.6041	21.3415	19.6471	20.8642
2	24.0327	22.5396	17.1555	21.2426
3	22.5347	21.8627	20.2570	21.5515
4	23.4622	23.9049	19.3798	22.2490
5	22.6866	21.6505	21.3362	21.8911

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.25 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.5457	3.4139	24.8983
2	4.3733	3.4839	20.3370
3	4.2941	3.3238	22.5961
4	4.4652	3.9053	12.5392
5	4.3862	3.3635	23.3163

* (จุดที่ 1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.26 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 2)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.2862	3.4006	20.6617
2	3.6609	3.0449	16.8265
3	4.0909	3.0721	24.9041
4	3.8761	3.2741	15.5311
5	4.3877	3.8940	11.2519

* (จุดที่ 2) กึ่งกลางถังหมัก ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.27 ความชื้นของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่าง (จุดที่ 3)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
1	4.7123	3.6755	22.0020
2	3.8481	3.1291	18.6845
3	4.3184	3.4352	20.4520
4	4.4911	3.8479	14.3217
5	4.3877	3.8940	11.2519

* (จุดที่ 3) ด้านหลังสุดของถังหมัก ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

ตารางที่ ค.1.28 ความชื้นเฉลี่ยของซับสเตรทระหว่างการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 1.5 vvm ของการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 จุด

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 1	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 2	ร้อยละความชื้น ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1	24.8983	20.6617	22.0020	22.5206
2	20.3370	16.8265	18.6845	18.6160
3	22.5961	24.9041	27.3990	24.9664
4	12.5392	15.5311	14.3217	14.1306
5	23.3163	11.2519	11.2519	15.2734

* ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ 60 (ฐานเปียก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.2
กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์

ตารางที่ ค.2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร
0	0
30	1.346
40	1.419
50	2.133
60	2.439

นำค่าจาก ตาราง ค.2.1 มาพลอตกราฟ จะได้สมการของสารมาตรฐานดังสมการที่ ข.2.1 แสดงในรูปที่ ข.2.1

$$y = 0.0406x + 0.0071 \quad \text{(ค.2.1)}$$

รูปที่ ค.2.1 สารมาตรฐานกลูโคซามีน

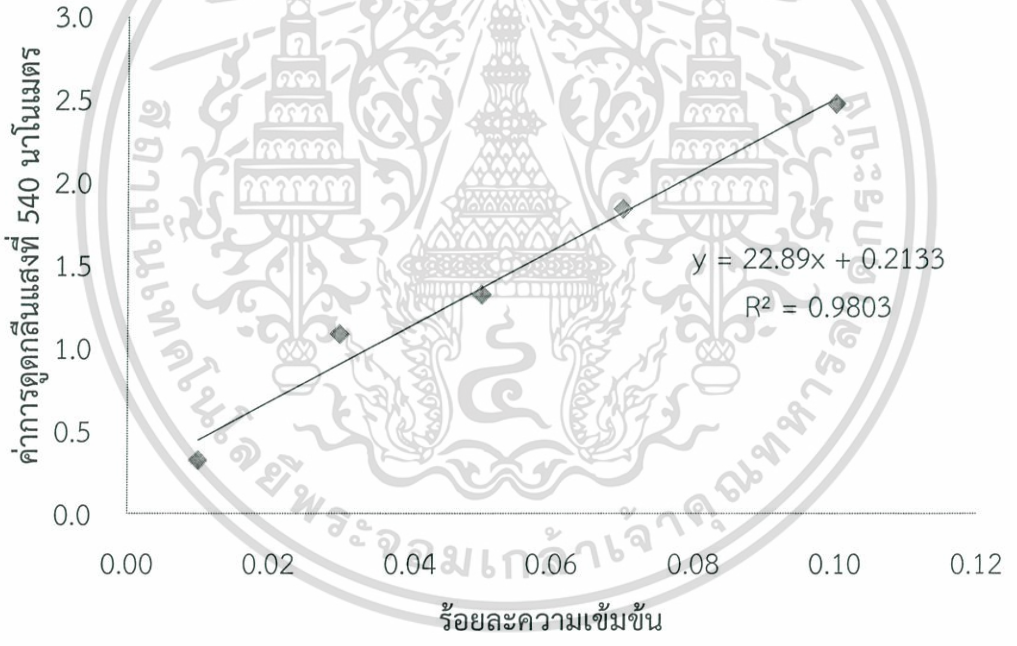
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร)

ร้อยละความเข้มข้นของกลูโคส	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0.01	0.318
0.03	1.081
0.05	1.317
0.07	1.834
0.10	2.468

นำค่าจาก ตาราง ค.2.2 มาพลอตกราฟ จะได้สมการของสารมาตรฐานดังสมการที่ ค.2.2 แสดงในรูปที่ ค.2.2

$$y = 22.89x + 0.2133 \quad \text{(ค.2.2)}$$



รูปที่ ค.2.2 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร)

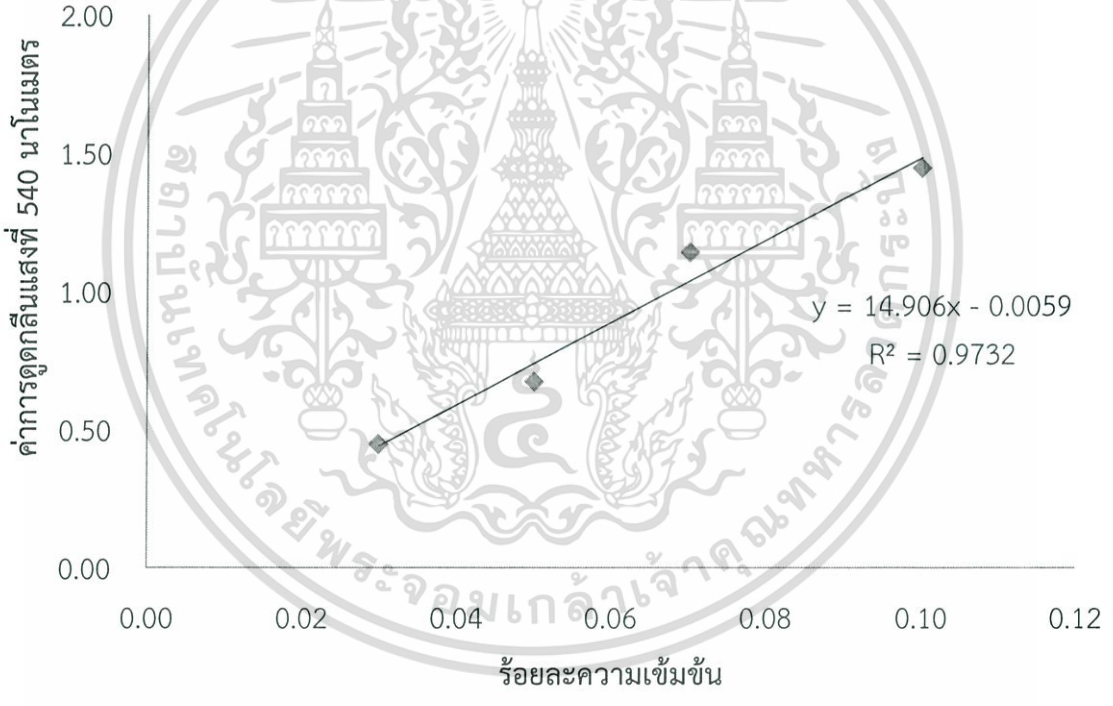
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร)

ร้อยละความเข้มข้นของกลูโคส	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0.03	0.446
0.05	0.672
0.07	1.139
0.10	1.446

นำค่าจาก ตาราง ค.2.3 มาพลอตกราฟ จะได้สมการของสารมาตรฐานดังสมการที่ ค.2.3 แสดงในรูปที่ ค.2.2

$$y = 14.906x - 0.0059 \quad \text{(ค.2.3)}$$



รูปที่ ค.2.3 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร)

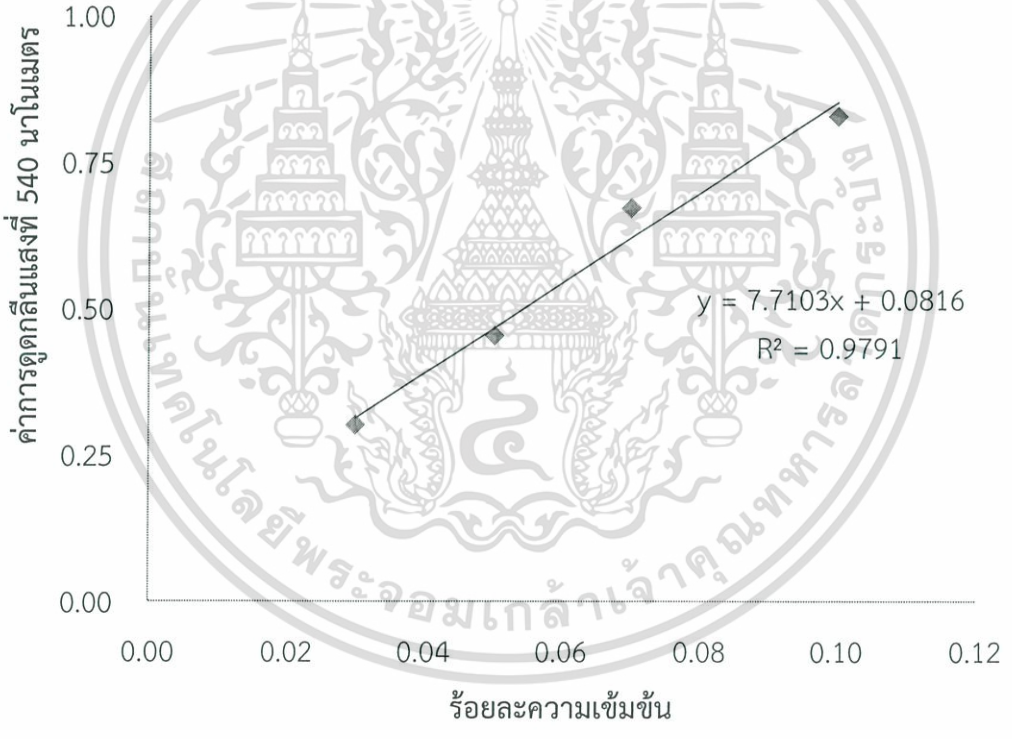
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร)

ร้อยละความเข้มข้นของกลูโคส	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0.03	0.301
0.05	0.454
0.07	0.671
0.10	0.828

นำค่าจาก ตาราง ค.2.4 มาพลอตกราฟ จะได้สมการของสารมาตรฐานดังสมการที่ ค.2.4 แสดงในรูปที่ ค.2.2

$$y = 7.7103x + 0.0816 \quad \text{(ค.2.4)}$$



รูปที่ ค.2.4 สารมาตรฐานกลูโคส (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.3
การวัดปริมาณกลูโคซามีน และกิจกรรมเอนไซม์

1. การวัดปริมาณกลูโคซามีน

ตารางที่ ค.3.1 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.246	0.231	0.226	58.8424	55.1478	53.9163	55.9688
1	0.275	0.309	0.286	65.9852	74.3596	68.6946	69.6798
2	0.235	0.346	0.262	56.1330	83.4729	62.7833	67.4631
3	0.311	0.282	0.245	74.8522	67.7094	58.5961	67.0525
4	0.310	0.261	0.214	74.6059	62.5369	50.9606	62.7011
5	0.414	0.260	0.265	100.2217	62.2906	63.5222	75.3448
6	0.312	0.391	0.207	75.0985	94.5567	49.2365	72.9639
7	0.296	0.250	0.326	71.1576	59.8276	78.5468	69.8440

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.2 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.215	0.243	0.221	51.2069	58.1034	52.6847	53.9984
1	0.321	0.328	0.306	77.3153	79.0394	73.6207	76.6585
2	0.263	0.355	0.358	63.0296	85.6897	86.4286	78.3826
3	0.316	0.363	0.354	76.0837	87.6601	85.4433	83.0624
4	0.312	0.338	0.344	75.0985	81.5025	82.9803	79.8604
5	0.301	0.273	0.295	72.3892	65.4926	70.9113	69.5977
6	0.365	0.455	0.335	88.1527	110.3202	80.7635	93.0788
7	0.351	0.298	0.286	84.7044	71.6502	68.6946	75.0164

ตารางที่ ค.3.3 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.273	0.285	0.254	65.4926	68.4483	60.8128	64.9179
1	0.546	0.533	0.571	132.7340	129.5320	138.8916	133.7192
2	0.585	0.492	0.488	142.3399	119.4335	118.4483	126.7406
3	0.458	0.483	0.606	111.0591	117.2167	147.5123	125.2627
4	0.503	0.390	0.534	122.1429	94.3103	129.7783	115.4105
5	0.512	0.489	0.639	124.3596	118.6946	155.6404	132.8982
6	0.695	0.706	0.537	169.4335	172.1429	130.5172	157.3645
7	0.503	0.479	0.511	122.1429	116.2315	124.1133	120.8292

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.4 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราส่วนกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0	0.306	0.312	0.299	73.6207	75.0985	71.8966	73.5386
1	0.895	0.900	1.053	218.6946	219.9261	257.6108	232.0772
2	1.059	0.993	1.045	259.0887	242.8325	255.6404	252.5205
3	0.992	0.953	1.117	242.5862	232.9803	273.3744	249.6470
4	0.998	1.107	1.006	244.0640	270.9113	246.0345	253.6700
5	0.987	1.041	0.958	241.3547	254.6552	234.2118	243.4072
6	0.897	0.902	0.917	219.1872	220.4187	224.1133	221.2397
7	0.987	0.913	0.934	241.3547	223.1281	228.3005	230.9278

ตารางที่ ค.3.5 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	
0	0.268	0.531	0.535	64.2611	129.0394	130.0246	107.7750
1	0.408	0.493	0.476	98.7438	119.6798	115.4926	111.3054
2	0.570	0.545	0.56	138.6453	132.4877	136.1823	135.7718
3	0.553	0.805	0.503	134.4581	196.5271	122.1429	151.0427
4	0.630	0.642	0.711	153.4236	156.3793	173.3744	161.0591
5	0.604	0.584	0.662	147.0197	142.0936	161.3054	150.1396

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.6 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	
0	0.401	0.292	0.299	97.0197	70.1724	71.8966	79.6962
1	0.657	0.615	0.707	160.0739	149.7291	172.3892	160.7307
2	0.61	0.623	0.609	148.4975	151.6995	148.2512	149.4828
3	0.652	0.601	1.238	158.8424	146.2808	303.1773	202.7668
4	0.664	0.656	0.634	161.7980	159.8276	154.4089	158.6782
5	0.628	0.638	0.615	152.9310	155.3941	149.7291	152.6847

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

ตารางที่ ค.3.7 ปริมาณกลูโคซามีนในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 650 นาโนเมตร			ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัม/กรัมซับสเตรทแห้ง)			ค่าเฉลี่ยปริมาณกลูโคซามีน
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	
0	0.293	0.274	0.323	0.7042	0.6574	0.7781	0.7132
1	0.629	0.623	0.601	1.5318	1.5170	1.4628	1.5039
2	0.576	0.549	0.802	1.4012	1.3347	1.9579	1.5646
3	0.556	0.67	0.594	1.3520	1.6328	1.4456	1.4768
4	0.606	0.615	0.641	1.4751	1.4973	1.5613	1.5112
5	0.556	0.573	0.571	1.3520	1.3938	1.3889	1.3782

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวัดกิจกรรมเอนไซม์

ตารางที่ ค.3.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.316	0.290	0.384	0.0045	0.0034	0.0075	0.0051	0.0236
2	0.254	0.226	0.289	0.0018	0.0006	0.0033	0.0019	0.0087
3	0.219	0.257	0.261	0.0002	0.0019	0.0021	0.0014	0.0065
4	0.551	0.512	0.423	0.0148	0.0130	0.0092	0.0123	0.0570
5	0.396	0.472	0.429	0.0080	0.0113	0.0094	0.0096	0.0443
6	0.444	0.304	0.354	0.0101	0.0040	0.0061	0.0067	0.0311
7	0.418	0.550	0.572	0.0089	0.0147	0.0157	0.0131	0.0606

ตารางที่ ค.3.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.247	0.263	0.235	0.0015	0.0022	0.0009	0.0015	0.0071
2	0.223	0.217	0.239	0.0004	0.0002	0.0011	0.0006	0.0026
3	0.219	0.218	0.225	0.0002	0.0002	0.0005	0.0003	0.0015
4	0.247	0.331	0.431	0.0015	0.0051	0.0095	0.0054	0.0249
5	0.358	0.330	0.332	0.0063	0.0051	0.0052	0.0055	0.0256
6	0.314	0.460	0.224	0.0044	0.0108	0.0005	0.0052	0.0241
7	0.366	0.280	0.391	0.0067	0.0029	0.0078	0.0058	0.0267

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:0 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2.240	2.184	2.085	0.150	0.1461	0.1395	0.1452	0.3360
2	2.316	2.319	2.426	0.155	0.1552	0.1624	0.1575	0.3646
3	2.343	2.153	2.330	0.157	0.1440	0.1559	0.1522	0.3525
4	1.928	1.754	2.355	0.129	0.1173	0.1576	0.1346	0.3116
5	2.339	2.598	1.992	0.157	0.1739	0.1332	0.1546	0.3578
6	-	2.301	-	-	0.1540	-	0.1540	0.3564
7	-	2.377	2.391	-	0.1591	0.1600	0.1595	0.3693

ตารางที่ ค.3.11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.107	1.449	1.156	0.0390	0.0540	0.0412	0.0447	0.2069
2	1.18	1.088	1.814	0.0422	0.0382	0.0699	0.0501	0.2318
3	0.902	0.858	0.863	0.0301	0.0282	0.0284	0.0289	0.1336
4	0.719	0.876	0.670	0.0221	0.0290	0.0200	0.0237	0.1095
5	0.631	0.639	0.787	0.0182	0.0186	0.0251	0.0206	0.0954
6	0.677	0.506	0.617	0.0203	0.0128	0.0176	0.0169	0.0781
7	0.504	0.509	0.440	0.0127	0.0129	0.0099	0.0118	0.0548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.391	0.471	0.368	0.0078	0.0113	0.0068	0.0086	0.0397
2	0.639	0.545	0.795	0.0186	0.0145	0.0254	0.0195	0.0902
3	0.981	1.207	1.271	0.0335	0.0434	0.0462	0.0411	0.1899
4	1.154	1.386	1.156	0.0411	0.0512	0.0412	0.0445	0.2058
5	1.258	1.219	1.324	0.0456	0.0439	0.0485	0.0460	0.2129
6	1.207	0.987	1.114	0.0434	0.0338	0.0393	0.0389	0.1797
7	1.211	1.433	1.082	0.0436	0.0533	0.0380	0.0449	0.2079

ตารางที่ ค.3.13 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:1 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2.496	2.363	2.647	0.1671	0.1581	0.1772	0.1675	0.3877
2	2.681	2.370	2.677	0.1795	0.1586	0.1792	0.1724	0.3992
3	2.520	2.224	2.415	0.1687	0.1488	0.1616	0.1597	0.3697
4	2.477	2.520	2.543	0.1658	0.1687	0.1702	0.1682	0.3894
5	2.645	2.546	2.424	0.1770	0.1704	0.1622	0.1699	0.3933
6	2.043	2.427	2.453	0.1367	0.1624	0.1642	0.1544	0.3575
7	2.437	2.340	2.407	0.1631	0.1566	0.1611	0.1603	0.3710

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.14 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูโคเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.096	1.275	1.274	0.0386	0.0464	0.0463	0.0438	0.2024
2	1.698	1.564	1.327	0.0649	0.0590	0.0487	0.0575	0.2660
3	0.533	0.626	0.604	0.0140	0.0180	0.0171	0.0164	0.0756
4	0.864	0.609	0.659	0.0284	0.0173	0.0195	0.0217	0.1005
5	0.589	0.468	0.262	0.0164	0.0111	0.0021	0.0099	0.0457
6	0.406	0.518	0.387	0.0084	0.0133	0.0076	0.0098	0.0452
7	0.841	0.598	0.736	0.0274	0.0168	0.0228	0.0224	0.1034

ตารางที่ ค.3.15 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.557	0.49	0.638	0.0150	0.0121	0.0186	0.0152	0.0704
2	0.374	0.805	0.957	0.0070	0.0258	0.0325	0.0218	0.1008
3	0.743	0.46	0.503	0.0231	0.0108	0.0127	0.0155	0.0718
4	1.693	1.285	1.28	0.0646	0.0468	0.0466	0.0527	0.2437
5	0.557	1.447	1.494	0.0150	0.0539	0.0560	0.0416	0.1925
6	2.019	2.073	1.993	0.0789	0.0812	0.0778	0.0793	0.3667
7	2.112	2.143	2.295	0.0829	0.0843	0.0909	0.0861	0.3981

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2.164	2.456	2.791	0.1448	0.1644	0.1868	0.1653	0.3827
2	2.652	2.447	2.726	0.1775	0.1638	0.1825	0.1746	0.4042
3	2.660	2.569	2.440	0.1781	0.1720	0.1633	0.1711	0.3961
4	2.625	2.209	2.685	0.1757	0.1478	0.1797	0.1677	0.3883
5	2.443	2.406	2.389	0.1635	0.1610	0.1599	0.1615	0.3738
6	2.496	2.294	2.481	0.1671	0.1535	0.1660	0.1622	0.3755
7	2.62	2.475	2.506	0.1754	0.1656	0.1677	0.1696	0.3926

ตารางที่ ค.3.17 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.268	1.026	1.216	0.0461	0.0355	0.0438	0.0418	0.1933
2	1.011	1.014	1.007	0.0348	0.0350	0.0347	0.0348	0.1611
3	0.573	0.717	0.710	0.0157	0.0220	0.0217	0.0198	0.0916
4	0.575	0.283	0.772	0.0158	0.0030	0.0244	0.0144	0.0667
5	0.683	0.424	0.651	0.0205	0.0092	0.0191	0.0163	0.0753
6	0.944	0.919	0.891	0.0319	0.0308	0.0296	0.0308	0.1424
7	0.671	0.775	0.641	0.0200	0.0245	0.0187	0.0211	0.0975

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.18 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:2 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.790	0.640	0.616	0.0252	0.0186	0.0176	0.0205	0.0947
2	0.850	0.994	1.279	0.0278	0.0341	0.0466	0.0362	0.1672
3	0.855	0.992	0.924	0.0280	0.0340	0.0310	0.0310	0.1435
4	0.866	0.945	0.875	0.0285	0.0320	0.0289	0.0298	0.1378
5	1.006	0.882	0.887	0.0346	0.0292	0.0294	0.0311	0.1438
6	0.850	1.011	0.941	0.0278	0.0348	0.0318	0.0315	0.1456
7	0.742	0.786	0.723	0.0231	0.0250	0.0223	0.0235	0.1085

ตารางที่ ค.3.19 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมกากมะพร้าวต่อรำข้าวสาลีที่ 3:3 (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2.843	2.804	2.98	0.1903	0.1877	0.1995	0.1925	0.4457
2	2.936	2.975	2.947	0.1966	0.1992	0.1973	0.1977	0.4577
3	2.839	2.795	2.75	0.1901	0.1871	0.1841	0.1871	0.4331
4	2.934	2.867	2.88	0.1964	0.1919	0.1928	0.1937	0.4485
5	2.84	2.774	2.781	0.1901	0.1857	0.1862	0.1873	0.4337
6	2.709	2.954	2.775	0.1813	0.1978	0.1858	0.1883	0.4359
7	2.896	2.87	2.887	0.1939	0.1921	0.1933	0.1931	0.4470

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.20 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.918	1.113	-	0.0308	0.0393	-	0.0350	0.1621
2	2.383	2.143	2.704	0.0948	0.0843	0.1088	0.1040	0.4809
3	2.378	2.096	2.176	0.0946	0.0822	0.0857	0.1033	0.4776
4	1.430	1.821	1.802	0.0532	0.0702	0.0694	0.0643	0.2972
5	1.682	1.723	1.650	0.0642	0.0660	0.0628	0.0643	0.2974

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

ตารางที่ ค.3.21 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.514	0.543	0.515	0.0131	0.0144	0.0132	0.0136	0.514
2	0.991	1.722	1.236	0.0340	0.0659	0.0447	0.0482	0.991
3	1.037	1.422	0.980	0.0360	0.0528	0.0335	0.0408	1.037
4	1.255	1.091	0.962	0.0455	0.0383	0.0327	0.0389	1.255
5	1.120	1.241	1.271	0.0396	0.0449	0.0462	0.0436	1.120

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.22 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 0.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.335	1.253	1.382	0.1626	0.1519	0.1687	0.0350	0.1621
2	1.541	1.701	1.803	0.1893	0.2100	0.2233	0.0960	0.4439
3	1.496	1.774	1.503	0.1834	0.2195	0.1844	0.0875	0.4048
4	1.705	1.801	1.374	0.2105	0.2230	0.1676	0.0643	0.2972
5	1.531	1.820	1.556	0.1880	0.2255	0.1912	0.0643	0.2974

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

ตารางที่ ค.3.23 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.607	1.610	1.614	0.0609	0.0610	0.0612	0.0610	0.2823
2	0.593	0.276	0.885	0.0166	0.0027	0.0293	0.0162	0.0750
3	1.280	1.590	1.322	0.0466	0.0601	0.0484	0.0517	0.2392
4	1.997	2.635	2.908	0.0779	0.1058	0.1177	0.1005	0.4647
5	2.727	2.002	2.039	0.1098	0.0781	0.0798	0.0892	0.4127

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.24 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.950	0.862	0.897	0.0322	0.0283	0.0299	0.0301	0.1394
2	0.432	0.215	0.475	0.0096	0.0001	0.0114	0.0070	0.0325
3	0.662	0.787	0.647	0.0196	0.0251	0.0189	0.0212	0.0981
4	1.161	1.521	2.145	0.0414	0.0571	0.0844	0.0610	0.2820
5	1.661	1.675	1.979	0.0632	0.0639	0.0771	0.0681	0.3149

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

ตารางที่ ค.3.25 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	1.735	1.813	1.774	0.098	0.225	0.219	0.181	0.4181
2	2.003	2.498	2.082	0.132	0.313	0.259	0.235	0.5443
3	1.957	-	2.118	0.127	-	0.264	0.195	0.4521
4	1.793	2.003	1.838	0.105	0.249	0.228	0.194	0.4493
5	2.035	-	1.562	0.137	-	0.192	0.164	0.3804

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.26 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.580	1.129	1.118	0.0160	0.0400	0.0395	0.0318	0.1473
2	0.958	0.791	1.068	0.0325	0.0252	0.0373	0.0317	0.1466
3	1.420	1.329	1.208	0.0527	0.0487	0.0435	0.0483	0.2234
4	1.609	2.249	1.615	0.0610	0.0889	0.0612	0.0704	0.3255
5	1.093	1.519	0.844	0.0384	0.0570	0.0276	0.0410	0.1897

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

ตารางที่ ค.3.27 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	0.478	0.519	0.836	0.0116	0.0134	0.0272	0.0174	0.0804
2	0.740	0.663	0.757	0.0230	0.0196	0.0238	0.0221	0.1024
3	0.878	0.810	0.822	0.0290	0.0261	0.0266	0.0272	0.1260
4	1.133	1.960	1.762	0.0402	0.0763	0.0677	0.0614	0.2839
5	1.833	1.875	0.902	0.0708	0.0726	0.0301	0.0578	0.2674

* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3.28 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในตัวอย่างจากการหมักของอัตราการเติมอากาศที่ 1.5 vvm

ระยะเวลาที่หมัก (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร			ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			ค่าเฉลี่ยปริมาณความเข้มข้นกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมซับสเตรทแห้ง)
	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3		
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2.124	2.156	2.372	0.1421	0.1442	0.1587	0.1484	0.3435
2	2.425	2.456	2.395	0.1623	0.1644	0.1603	0.1623	0.3758
3	2.449	2.136	2.413	0.1639	0.1429	0.1615	0.1561	0.3614
4	2.746	2.552	2.409	0.1838	0.1708	0.1612	0.1720	0.3981
5	2.558	2.498	2.407	0.1712	0.1672	0.1611	0.1665	0.3854

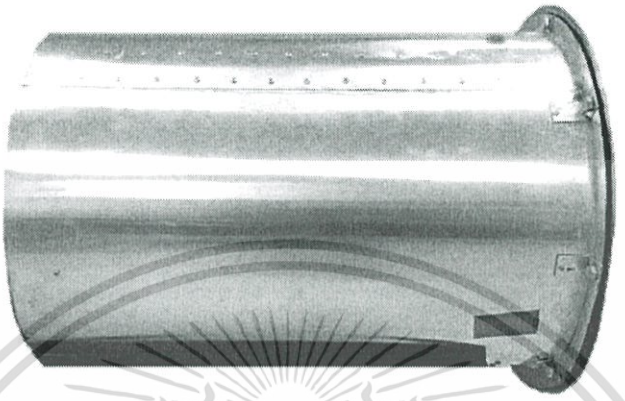
* ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง จุดที่ (1) ด้านหน้าสุดของถังหมัก, (2) กึ่งกลางถังหมัก และ (3) ด้านหลังสุดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.1
ส่วนประกอบของถังหมัก

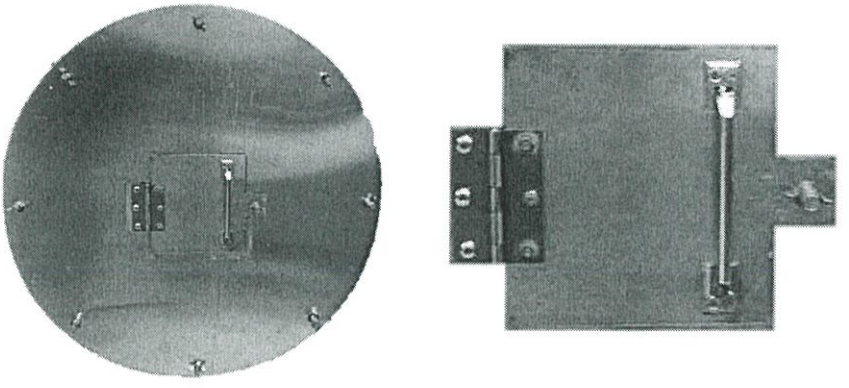


รูปที่ ง.1.1 ถังหมักแบบหมุน

(ก) (ข)

รูปที่ ง.1.2 (ก) ถังหมักชั้นใน และ (ข) ช่องเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ ง.1.3 (ก) ฝาถังนอก และ (ข) ช่องเก็บตัวอย่าง

(ก) (ข)

รูปที่ ง.1.4 (ก) มอเตอร์ และ (ข) ตัวปรับความเร็วรอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้