บทที่ 4

การอภิปรายผลการทดลอง

1. <u>การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์</u>

การศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ โดยการทำโครมาโต-กราฟฟีกระดาษ (รูปที่ 25) พบว่าเอนไซม์ย่อยแป้งได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์อย่างเดียว แสดงว่าเอนไซม์นี้คือ กลูโคอะไมเลส ไม่ใช่อัลฟาอะไมเลส หรือเบตาอะไมเลส

2. <u>การหาสภาพทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลว</u>

จากการทดลองเติมสารช่วยการเขย่าและเพาะเลี้ยงสปอร์ เพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้นนั้น ผลปรากฏว่าทั้งลูกแก้ว และขดลวดสเตนเลสไม่สามารถช่วยกระจายเส้นใยของ *Rhizopus* sp. ที่งอกออกมา เชื้อรายังคงเกาะกลุ่มเหมือนกับเชื้อราที่ไม่ได้เติมลูกแก้ว หรือขดลวดสเตนเลส ทั้งนี้ปรากฏการณ์รวมตัวเป็นกลุ่มของเส้นใยของ *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลวนั้น เป็นลักษณะปกติของ *Rhizopus* sp. ซึ่งเส้นใยจะรวมเป็นก้อนขณะที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า (Radley, 1976)

เมื่อทำการทดลองเปลี่ยนลักษณะของขวดที่ใช้จากขวดทรงกรวย (Erlenmeyer flask) เป็นขวดทรงกรวยก้นบุบ (baffled flask) ผลปรากฏว่าสายใยของ *Rhizopus* sp. ที่งอกจากสปอร์สามารถกระจายเป็นเม็ดชนิดหลวมหู (pellet) ในอาหารเหลว โดยที่ขวดก้นบุบจะช่วยทำให้ของเหลวกระจายไม่ไหลวนไปทางเดียวกัน ป้องกันไม่ให้เส้นใยพันกันเป็นก้อน นอกจากนี้ยังเพิ่มการให้อากาศ และแรงกวนในอาหารเหลว (Metz และคณะ, 1977)

ดังนั้นการทดลองนี้จึงพิสูจน์ว่า การเลี้ยง *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลว สามารถทำได้จริง โดยใช้ขวดก้นบุบช่วยในการเพาะเลี้ยงสปอร์เป็นเชื้อตั้งต้น ในช่วงเวลาวิกฤต คือ ในระยะการงอกเส้นใยจากสปอร์ หลังจากนั้นนำเม็ดราไปเลี้ยงในขวดทรงกรวยธรรมดาได้

3. <u>การใช้กากถั่วเหลืองจากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนเป็นอาหารผลิตกลูโคอะไมเลส</u>

ผลการใช้กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นส่วนผสมของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา เพื่อผลิตกลูโคอะไมเลส ปรากฏว่า *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองที่ย่อยแล้ว ผลิตกลูโคอะไมเลสสูงกว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อย สำหรับ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ I ผลิตกลูโคอะไมเลสได้ใกล้เคียงกันทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีกากถั่วเหลืองที่ผ่านหรือไม่ผ่านการย่อยดังรูปที่ 9

4. <u>การทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการย่อยโปรตีน</u>

ผลการทดลองเปรียบเทียบปัจจัยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการย่อยโปรตีน ปรากฏว่า แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการย่อยโปรตีนมีผลร่วมกันในการเพิ่มแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ฉ)

สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสม จากการวิเคราะห์ Duncan's multiple range test ปรากฏว่า การใช้แป้งข้าวเจ้ากับกากรำที่ย่อยแล้ว หรือแป้งข้าวเหนียวกับกากรำที่ไม่ย่อย ให้ผลผลิตกลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และต่างจากสูตรอื่น ๆ ทั้งหมด ในตารางที่ 5 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ซึ่งแสดงวิธีวิเคราะห์ในภาคผนวก ฉ)

เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกลูโคอะไมเลสบนอาหารแข็ง จะเห็นว่าส่วนใหญ่ใช้ข้าวเจ้าและรำ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เช่น การผลิตกลูโคอะไมเลสของ *Rhizopus oryzae* ในอาหารแข็ง ใช้ข้าวเจ้าและรำหยาบเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (ไกรฤกษ์, 2526) สำหรับเชื้อ *Amylomyces* sp. ที่ผลิตกลูโคอะไมเลสในอาหารแข็ง ใช้แป้งข้าวเจ้า รำหยาบ และกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

5. <u>ผลการหาอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสม</u>

การหาอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนที่เหมาะสม ผลปรากฏว่า อัตราส่วนที่ให้กลูโคอะไมเลสสูงสุดคือ 25 เมื่ออัตราส่วนมากกว่านี้ กลูโคอะไมเลสจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากแป้งที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดต้องผ่านการย่อยด้วยอัลฟาอะไมเลส ซึ่งจะให้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงกว่า เนื่องจากกลูโคสเป็นสารยับยั้งการสร้างกลูโคอะไมเลส ดังนั้น ผลของอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจนต่อการสร้างกลูโคอะไมเลสยังมีผลของกลูโคสร่วม

อยู่ด้วย

เมื่อพิจารณาการผลิตบนอาหารแข็ง แม้จะไม่มีรายงานคาร์บอน/ไนโตรเจน แต่ก็จะเห็นว่าใช้อัตราส่วนแหล่งคาร์บอน/แหล่งไนโตรเจนสูงเช่นเดียวกับการหมักในอาหารเหลว เช่น การผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *R. oryzae* จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้ออัตราส่วนข้าวเจ้า : รำหยาบ = 5.1 (ไกรฤกษ์, 2526) ในขณะที่การผลิตกลูโคอะไมเลสของ *Amylomyces* sp. ดีที่สุดในอาหารที่มีอัตราส่วน แป้งข้าวเจ้า : รำหยาบ : กากถั่วเหลือง = 2:3:5

6. <u>การหาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส</u>

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสดังแสดงไว้ในรูปที่ 11 พบว่าปริมาณกลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 °ซ เป็น 40 °ซ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 °ซ ปริมาณของกลูโคอะไมเลสจะลดลง

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิแบบแฟคตอเรียล พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 99% และพีเอชมีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงไว้ในภาคผนวก ฉ การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 จะมีการผลิตกลูโคอะไมเลสสูงสุด จากการวิเคราะห์ Duncan's multiple range test พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 6 6.0 และ 5.5 ให้การผลิตกลูโคอะไมเลสที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาคผนวก ฉ)

7. <u>การศึกษาการเพาะเลี้ยง *Rhizopus* sp. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

7.1 <u>ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ กับเวลา</u>

จากการเลี้ยง *Rhizopus* sp. ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 10 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่าง ๆ เมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงไว้ในรูปที่ 18 พบว่าปริมาณของกลูโคอะไมเลส จะเข้าสู่ระยะทวีคูณในระยะที่การเจริญของราเป็นระยะทวีคูณ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง *Rhizopus oryzae* ของไกรฤกษ์ (2526) และการเพาะเลี้ยง *Amylomyces* sp. ของจตุรพร (2528) ในอาหารแข็ง

ค่าพีเอชของอาหาร มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น ซึ่งต่างจากการหมักของ *Rhizopus oryzae* ในอาหารแข็ง (ไกรฤกษ์, 2526) ซึ่งพีเอชไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก การหมักในอาหารเหลวจึงมีข้อเสียเปรียบการหมักในอาหารแข็งในเรื่องของค่าพีเอช ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ข้อ 9 และ 10 ในการทดลองในถังหมักตลอดการทดลองจึงต้องเติม 10% NaOH ด้วยเครื่องควบคุมพีเอช จึงทำให้พีเอชมีค่าคงที่ที่พีเอช 5.0 ตลอดการทดลอง

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ซึ่งปรับให้มีค่า 15 ส่วนในล้านส่วน ในตอนเริ่มต้นของการหมัก พบว่าในขณะที่เซลล์เริ่มจะมีการเจริญ และมีการสร้างกลูโคอะไมเลส ออกซิเจนที่ละลายในอาหารจะลดลงจนเป็นศูนย์ ยกเว้นเมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที ออกซิเจนที่ละลายมีมากเกินพอ จะลดลงจนคงที่ที่ 5 ส่วนในล้านส่วน แสดงว่าเซลล์ต้องการออกซิเจนอย่างมาก เพื่อใช้ในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ หรืออาจเกิดจากเซลล์มีความเข้มข้นมากจนเกาะที่เยื่อวัดออกซิเจนที่ละลาย ทำให้ค่าออกซิเจนที่อ่านได้เป็นศูนย์ผิดไปจากความจริง

7.2 <u>การทดสอบอิทธิพลของการกวน และการให้อากาศแบบแฟคทอเรียล</u>

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ตารางที่ 9 พบว่าทั้งการกวน และการให้อากาศมีอิทธิพลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส ดังแสดงการวิเคราะห์ทางสถิติในภาคผนวก ฉ

7.3 <u>ผลของการกวน</u>

จากผลการเปรียบเทียบอัตราการกวนในถังหมัก ซึ่งกล่าวในบทที่ 3 ปรากฏว่ากลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น เมื่อการกวนเพิ่มจาก 50 เป็น 150 และ 200 รอบ/นาที ทั้งนี้เนื่องจาก *Rhizopus* sp. เป็นเชื้อราซึ่งต้องการอากาศอย่างยิ่ง (strickly aerobe) การเพิ่มการกวนจึงเป็นการเพิ่มอากาศให้แก่อาหารเหลว ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น และเพิ่มการสร้างกลูโคอะไมเลส ดังปรากฏอย่างชัดเจนในรูปที่ 19 และ 21 แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนการกวนจาก 200 รอบ/นาที เป็น 300 และ 400 รอบ/นาที ปริมาณกลูโคอะไมเลสกลับลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากแรงเฉือนของใบพัดจะตัดเส้นใยของ *Rhizopus* sp. ทำให้เซลล์เสียไซโตพลาสซึมออกนอกเซลล์ทั้งหมด เพราะ *Rhizopus* sp. เป็นเชื้อราที่ไม่มีผนังกั้นในสายใย (viable cell) จะเป็นการรวมทั้งเซลล์ที่ขาดตายแล้ว และเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่

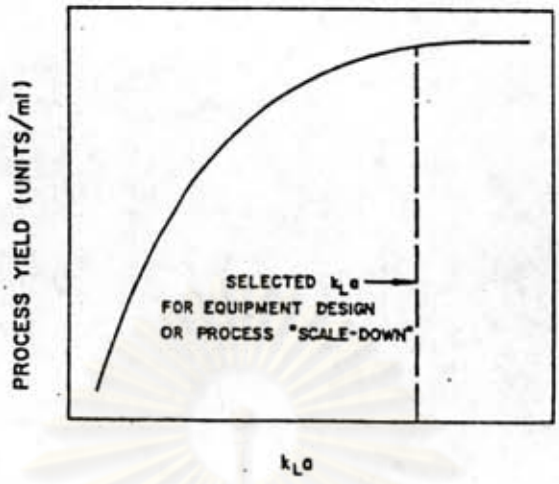
เนื่องจากไม่มีรายงานการผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *Rhizopus* sp. ในถังหมักเลย จะมีแต่รายงานของ *Aspergillus* sp. ต่าง ๆ เช่น Van Lanen และคณะ (1968) ผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *A. niger* ต้องกวน 430 รอบ/นาที สำหรับการผลิต 40 แกลลอน ในขณะที่ NOVO (1972) กวน 400 รอบ/นาที เมื่อใช้ *A. niger* ผลิตขนาด 1200 ลิตร จะเห็นว่าอัตราการกวนที่เหมาะสม เป็นการกวนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในปริมาตรหนึ่งเท่านั้น ซึ่งจะต้องคำนวณหาอัตราการกวนที่เหมาะสมใหม่ เมื่อต้องการขยายขนาด โดยต้องทราบค่าสัมประสิทธิการถ่ายเทออกซิเจน ($k_L a$) ของการหมักที่ให้ผลผลิตดีที่สุด จึงได้ทดลองทำ dynamic measurement ในการทดลองต่อไป

11. การทดลอง dynamic measurement

จากการทดลองตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 11 ผลจากการปิดการให้อากาศ และการกวน และเปิดใหม่อีกครั้งหนึ่ง ในการเลี้ยง *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm แสดงไว้ในรูปที่ 23 ซึ่งจะหาค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ (volumetric oxygen demand rate) rX ได้ 2.7 ppm/นาที

เมื่อนำผลจากรูปที่ 24 มาคำนวณจะได้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (volumetric oxygen transfer coefficient) $k_L a$ ได้ 42 (ชั่วโมง)$^{-1}$ และหาค่าความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายที่สมดุลย์ (equilibrium dissolved oxygen concentration) C^* ได้ 10.3 ppm (ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าความเป็นจริง เนื่องจากตั้งค่าออกซิเจนที่ละลายที่สมดุลย์ตอนเริ่มต้นการหมักได้ 15 ppm เพื่อไม่ให้เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายอ่านค่าติดลบในตอนท้ายของการหมัก)

การหมักเชื้อราในอาหารเหลวนั้น ออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว เป็นปัจจัยที่สำคัญ ค่า $k_L a$ เป็นค่าที่แสดงประสิทธิภาพของการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศสู่อาหารเหลว โดยทั่วไปเมื่อ $k_L a$ เพิ่มจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มจนถึงจุดหนึ่งแล้วจึงคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 28 ซึ่งค่า $k_L a$ ที่ต่ำที่สุดที่ให้ผลิตภัณฑ์สูงสุด จะเป็นค่าที่เลือกไว้ใช้ในการคำนวณเพื่อขยายขนาด โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้



รูปที่ 28 การเลือก k_La สำหรับการขยายขนาด (Wang, 1979)

1. ความเร็วใบพัด, N (impeller speed)
2. อัตราการไหลของแกส, Q (volumetric gas flow rate
3. ปริมาตร, V_L
4. จำนวนใบพัดในแกน, N_i (number of impeller)
5. เส้นผ่าศูนย์กลางใบพัด, D_i (diameter of impeller)
6. ความหนาแน่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ρ (broth density)
7. ความหนืดของอาหาร, n (viscosity)
8. ค่าคงที่แรงดึงดูด, g_c (gravitational constant)
9. อัตราการเจริญ, μ (specific growth rate)
10. พลังงานที่ใช้ระหว่างให้อากาศ, P_g (gassed power)
11. พลังงานที่ใช้เมื่อไม่ให้อากาศ, P_o (nongassed power)

$$k_La = k_1 (P_g/V_L)^{0.4} V_s^{0.5} N^{0.5} \quad (1)$$

$$V_s = Q/D_i^2 \quad (2)$$

$$P_g = k_2 \left[\frac{P_o^2 N D_i^3}{Q^{0.56}} \right]^{0.45} \quad (3)$$

$$P_o = \left[\frac{0.5\rho N^3 D_i^5}{g_c}\right] (D_i^2 n\rho)/\mu \qquad (4)$$

จากความสัมพันธ์นี้เมื่อแทนค่าสมการ (2), (3) และ (4) ในสมการที่ 1 ถ้าทราบขนาดและองค์ประกอบของถังหมัก และความหนาแน่นและความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้สามารถออกแบบการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ขึ้นได้ โดยสามารถคำนวณหาอัตราการกวน, การให้อากาศ ที่จะให้ค่า $k_L a$ คงเดิมได้ (Wang, 1979)

12. <u>การใช้อุลตราฟิลเตรชันทำเอนไซม์ให้เข้มข้นและบริสุทธิ์</u>

การใช้เยื่อสังเคราะห์ขนาดกักโมเลกุล 100,000 ปรากฏว่าเอนไซม์ผ่านเยื่อสังเคราะห์ออกมา และไม่ปรากฏว่ามีแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสในสารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อ แสดงว่ากลูโคอะไมเลสมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 100,000 ดาลตัน และแม้ว่าขั้นตอนนี้จะไม่ได้ทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น เนื่องจากจากการเติมบัฟเฟอร์ทำไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration) แต่ก็จะเห็นได้ว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 1.31 เท่า ดังกล่าวไว้ในตารางที่ 9 (การทำงานจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.31 เท่า) เนื่องจากมีการแยกโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 100,000 ดาลตัน ที่ไม่มีแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสออกไป

เมื่อใช้เยื่อสังเคราะห์ขนาดกักโมเลกุล 30,000 ปรากฏว่าเอนไซม์อยู่ในสารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อ และไม่ปรากฏว่ามีแอคทิวิตีของกลูโคอะไมเลสในสารละลายที่ผ่านเยื่อสังเคราะห์ออกมา แสดงว่ากลูโคอะไมเลสมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 30,000 ดาลตัน ในการใช้เยื่อสังเคราะห์ขนาดกักโมเลกุล 30,000 นี้ สามารถทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น 9.59 เท่า และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.42 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ก่อนผ่านเยื่อขนาดกักโมเลกุล 100,000 (crude enzyme) กับเอนไซม์ที่ถูกกักในเยื่อขนาดกักโมเลกุล 30,000 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีความเข้มข้น 6.95 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น (crude enzyme) และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.7 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น

เมื่อเปรียบเทียบกับการทำกลูโคอะไมเลสของ *R. oryzae* ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80% พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ (การทำงานจำเพาะ) เพิ่มขึ้น 7.45 เท่า (ไกรฤกษ์, 2526) เห็นได้อย่างชัดเจนว่าการใช้วิธีอุลตราฟิล-

เตรชันทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้น นอกจากจะทำให้เอนไซม์เข้มข้นได้มากกว่าวิธีตกตะกอนโปรตีนแล้ว ยังจะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น โดยมีขั้นตอนที่น้อยกว่า ใช้วิธีไม่รุนแรง และสะดวกกว่าวิธีตกตะกอนโปรตีน

อัตราการไหลกลับเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการใช้อุลตราฟิลเตรชัน เพราะถ้าอัตราการไหลกลับต่ำเกินไป จะมีโพลาไรเซชันเกิดขึ้น เป็นผลให้มีเอนไซม์ติดค้างอยู่ที่เยื่อในสภาพของเจล ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดหลังผ่านเยื่อขนาด 100,000 ลดน้อยลงจากก่อนผ่านเยื่อ (ตารางที่ 11) จาก 620.01 มก. เป็น 596.33 มก. (ค่านี้ได้รวมโปรตีนที่ไม่ผ่านเยื่อด้วย) นอกจากนี้ การทำงานของเอนไซม์ทั้งหมดหลังผ่านเยื่อขนาด 100,000 น้อยกว่าก่อนผ่านเยื่อ อาจเกิดจากการเสียสภาพของเอนไซม์ เนื่องจากต้องใช้เวลาทำงานนาน เพราะการเกิดโพลาไรเซชัน ทำให้อัตราการไหล (Flux) ลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 23)

เมื่อใช้อัตราการไหลกลับอยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการใช้เยื่อสังเคราะห์ขนาด 30,000 ปรากฏว่าอัตราการไหลคงที่ไม่ลดลง (รูปที่ 24) แสดงว่าไม่มีการเกิดโพลาไรเซชัน เนื่องจากสารละลายมีความเข้มข้นต่ำ เมื่อได้ลดปริมาตรลง 6 เท่า ($V_f/V_r = 6$) สารละลายเริ่มข้นขึ้น จึงมีการเกิดโพลาไรเซชันเล็กน้อย

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้นำเชื้อ *Rhizopus* sp. สายพันธุ์ II ที่มีความสามารถผลิตกลูโคอะไมเลส 0.6 หน่วย/มล. ในขั้นต้น นำมาหาสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ผลิตกลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้นเป็น 12.27[ก] หน่วย/มล. (123[ก] หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต *Rhizopus oryzae* บนอาหารแข็ง (ไกรฤกษ์, 2526) ซึ่งผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูงสุด 76.85[ก] หน่วย/กรัม อาหารเลี้ยงเชื้อ (415[ข] กรัม/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ) เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกลูโคอะไมเลส โดยการตรึงเซลล์บนแผ่น (disk) ในถังปฏิกรณ์ของ *Rhizopus Thailandensis* (Ju and Wang, 1984) สามารถผลิตกลูโคอะไมเลสได้ 4.96[ก] หน่วย/มล. (53,640[ก] หน่วย/ลิตร) ในการผลิตแบบ batch

---

ก นิยาม 1 หน่วย = ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคส 1 ไมโครโมลจากแป้งในเวลา 1 นาที ที่สภาวะเหมาะสม

ข นิยาม 1 หน่วย = ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคส 1 มิลลิกรัม จากแป้งในเวลา 30 นาที ที่สภาวะเหมาะสม

ค นิยาม 1 หน่วย = ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคส 1 มิลลิกรัม จากแป้งในเวลา 1 ชั่วโมง ที่สภาวะเหมาะสม

และสำหรับการผลิตแบบต่อเนื่องได้ 2.51[ก] หน่วย/มล. (35,100[ก] หน่วย/ลิตร) และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตกลูโคอะไมเลสจาก *Amylomyces* sp. บนอาหารแข็ง (จตุรพร, 2528) จะผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูงสุด 144[ก] หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ (780[ข] หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ)

จะเห็นได้ว่าการเลี้ยง *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลวจะผลิตกลูโคอะไมเลสได้ปริมาณมากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง เมื่อเทียบในหน่วยระบบเดียวกันต่อน้ำหนักแห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน นอกจากจะผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าจากวัตถุดิบเท่ากันแล้ว การผลิตในอาหารเหลวยังควบคุมสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า สำหรับการผลิตบนอาหารแข็ง สำหรับการตรึงเซลล์บนแผ่นจะผลิตเอนไซม์ได้ต่อเนื่องจริง แต่จะได้เอนไซม์ที่เจือจางมาก สำหรับ *Amylomyces* sp. นั้นผลิตกลูโคอะไมเลสได้มากกว่า *Rhizopus* sp. ในอาหารเหลวเล็กน้อย

การผลิตกลูโคอะไมเลสในอาหารเหลวจากเชื้อราในประเทศไทยโดยเฉพาะ จาก *Rhizopus* sp. จึงเป็นประโยชน์สำหรับการขยายขนาดการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์ขนาดใหญ่ในระดับการค้า เช่น บริษัท NOVO เดนมาร์คนั้น ไม่มีการผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็งเลย วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงเป็นความรู้ระดับพื้นฐาน สำหรับการพัฒนาเทคโนโลยีในประเทศไทยเลยในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย