หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 ชนิดของจุลินทรีย์และวิธีการเก็บรักษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ Rhizopus oligosporus TISTR 3001 (NRRL 2710) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นแข็งเอียงชนิดโพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ (potato dextrose agar) หรืออาหารวุ้นแข็งเอียงสูตรที่ 1 (ภาคผนวก ก-2) โดยลาก (streak) เชื้อบนอาหารวุ้นแข็งเอียง บ่มไว้ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 3-5 วัน จนมีการเจริญของเชื้อราและมีการสร้างสปอร์ จึงเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.2 การเตรียมสปอร์ของ R. oligosporus เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักในกล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการ

2.2.1 การเตรียมสปอร์บนอาหารวุ้นแข็งเอียงในขวดแบนสูตรที่ 2

เติมสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่ได้จากอาหารแข็งเอียงชนิดโพเทโท เดกซ์โทรส เอการ์ หรืออาหารแข็งเอียงสูตรที่ 1 ลงในอาหารวุ้นแข็งเอียงในขวดแบนสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก-3) พลิกขวดไปมาเพื่อให้สารละลายแขวนลอยของสปอร์กระจายเต็มผิวหน้า บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 3-5 วัน จนมีการเจริญของเชื้อ และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น

2.2.2 การเตรียมสปอร์เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

เติมทวีน 80 (tween 80) 0.1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 25 มล. ใช้ห่วง (loop) เขี่ยให้สปอร์หลุดออกจากสายใย (mycelium) กรองผ่านผ้าโปร่งที่ซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น เพื่อแยกส่วนสายใยออก นำสารแขวนลอยของสปอร์มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) (ภาคผนวก ก-5)

2.3 การศึกษาสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oligosporus เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักในระบบอาหารแข็งในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้น

2.3.1 การหาชนิดของสารอาหารและปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์

ใช้ปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบ ปลายข้าวเจ้าผสมรำละเอียด และปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลือง เป็นสารอาหารสำหรับเตรียมสปอร์ โดยใช้อัตราส่วนของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบ ปลายข้าวเจ้าต่อรำละเอียด และปลายข้าวเจ้าต่อกากถั่วเหลืองคงที่ 9:1 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ 20 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน เติมสารแขวนลอยของสปอร์ของ R. oligosporus ซึ่งได้จากสูตรอาหารวุ้นแข็งเอียงในขวดแบนสูตรที่ 2 จำนวน 1 มล. แปรผันปริมาณความชื้นระหว่าง 24-50% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนสปอร์โดยเติมทวีน 80 0.1% ปริมาณ 150 มล. เขย่าให้สปอร์กระจายและแขวนลอย กรองผ่านผ้าโปร่งที่ซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น ก่อนที่จะนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) (ภาคผนวก ก-5)

2.3.2 การหาอัตราส่วนอย่างละเอียดของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบ ปลายข้าวเจ้าต่อรำละเอียด และปลายข้าวเจ้าต่อกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oligosporus

2.3.2.1 ในกรณีที่ใช้ปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบ เป็นสารอาหาร

วิธีการเหมือนข้อ 2.3.1 แต่แปรผันปริมาณของปลายข้าวเจ้าต่อรำหยาบดังนี้คือ 20:0 19:1 18:2 17:3 16:4 15:5 14:6 13:7 12:8 11:9 และ 10:10 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก และใช้ความชื้นของอาหารประมาณ 34.7%

2.3.2.2 ในกรณีที่ใช้ปลายข้าวเจ้าผสมรำละเอียดเป็นสารอาหาร

วิธีการเหมือนข้อ 2.3.1 แต่แปรผันปริมาณของปลายข้าวเจ้าต่อรำละเอียดดังนี้คือ 20:0 19:1 18:2 17:3 16:4 15:5 14:6 13:7 12:8 11:9 และ 10:10 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก และใช้ความชื้นของอาหารประมาณ 33.1%

2.3.2.3 ในกรณีที่ใช้ปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลืองเป็นสารอาหาร

วิธีการเหมือนข้อ 2.3.1 แต่แปรผันปริมาณของปลายข้าวเจ้าต่อกากถั่วเหลืองดังนี้คือ 20:0 19:1 18:2 17:3 16:4 15:5 14:6 13:7 12:8 11:9 และ 10:10 โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก และใช้ความชื้นของอาหารประมาณ 34.7%

2.4 การเตรียมสปอร์ของ R. oligosporus เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการหมักบนอาหารแข็งในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้น

นำปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบอัตราส่วน 18:2 โดยใช้ความชื้นของอาหารประมาณ 34.7% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน เตรียมสปอร์โดยเติมทวีน 80 0.1% แล้วกรองผ่านผ้าโปร่งที่ซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น นับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

2.5 การเตรียมมันสำปะหลังเส้นเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก

มันเส้นที่ใช้ในการทดลองเป็นมันเส้นจากลานตากมัน อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี เป็นผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ผลิตโดยการหั่นหรือทุบหัวมันสดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ มีความยาวชิ้นละ 4-5 ซม. นำไปทำแห้งโดยตากบนลานตากจนแห้ง

บดมันเส้นด้วยเครื่องบดแบบแฮมเมอร์ มิลล์ (hammer mill) จะได้มันบดที่มีขนาดต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ผงมัน จนถึงชิ้นมันที่มีขนาด 15-20 มม. แยกขนาดของมันด้วยตะแกรงร่อน นำมันที่ได้มาแช่น้ำประมาณ 30-45 นาที นึ่งมันให้สุกโดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลาประมาณ 60 ชั่วโมง

2.6 การประกอบกล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการ และระบบควบคุมต่าง ๆ

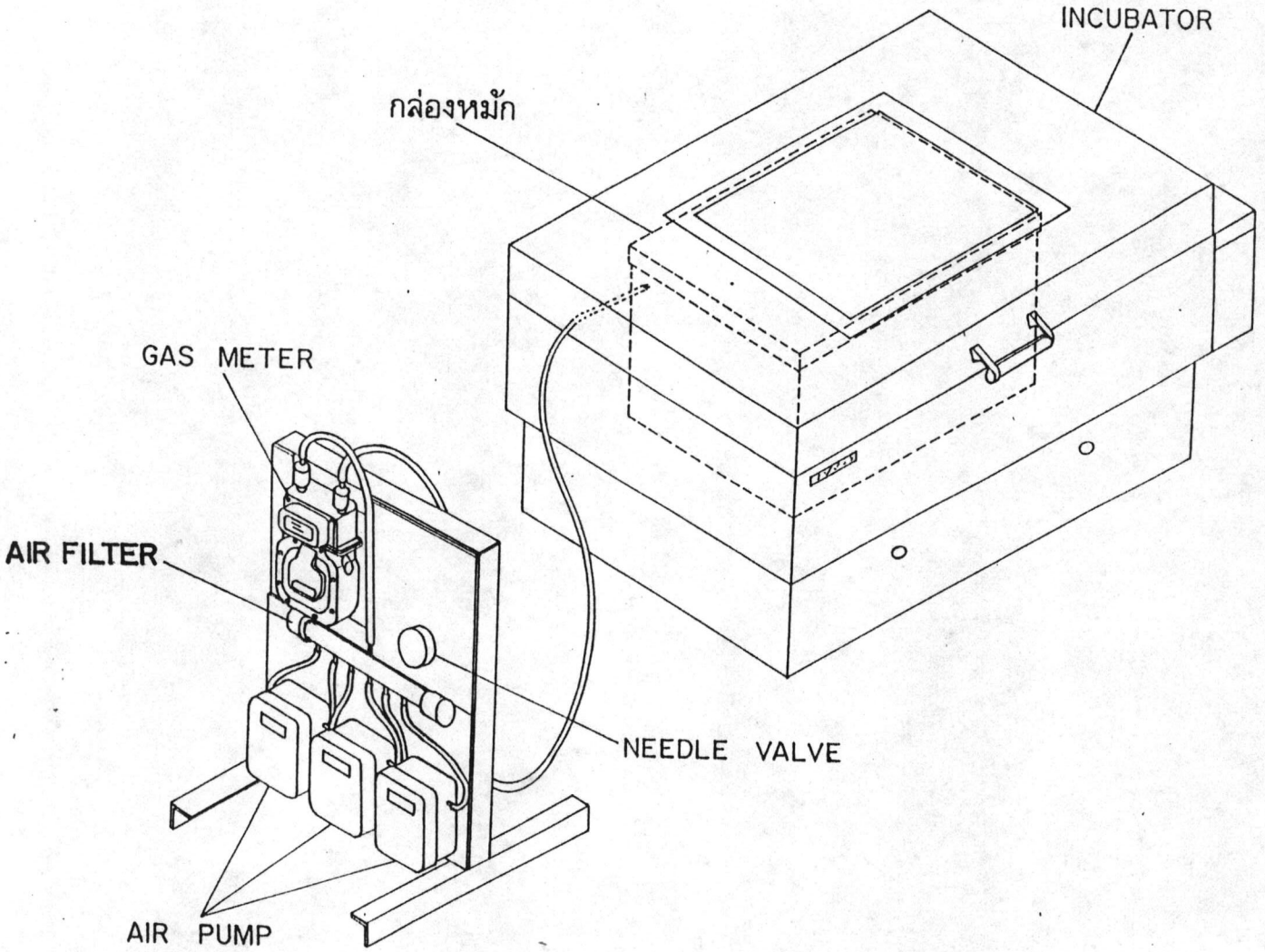
2.6.1 กล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการ

กล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการทดลองนี้ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และ 2.2 มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ

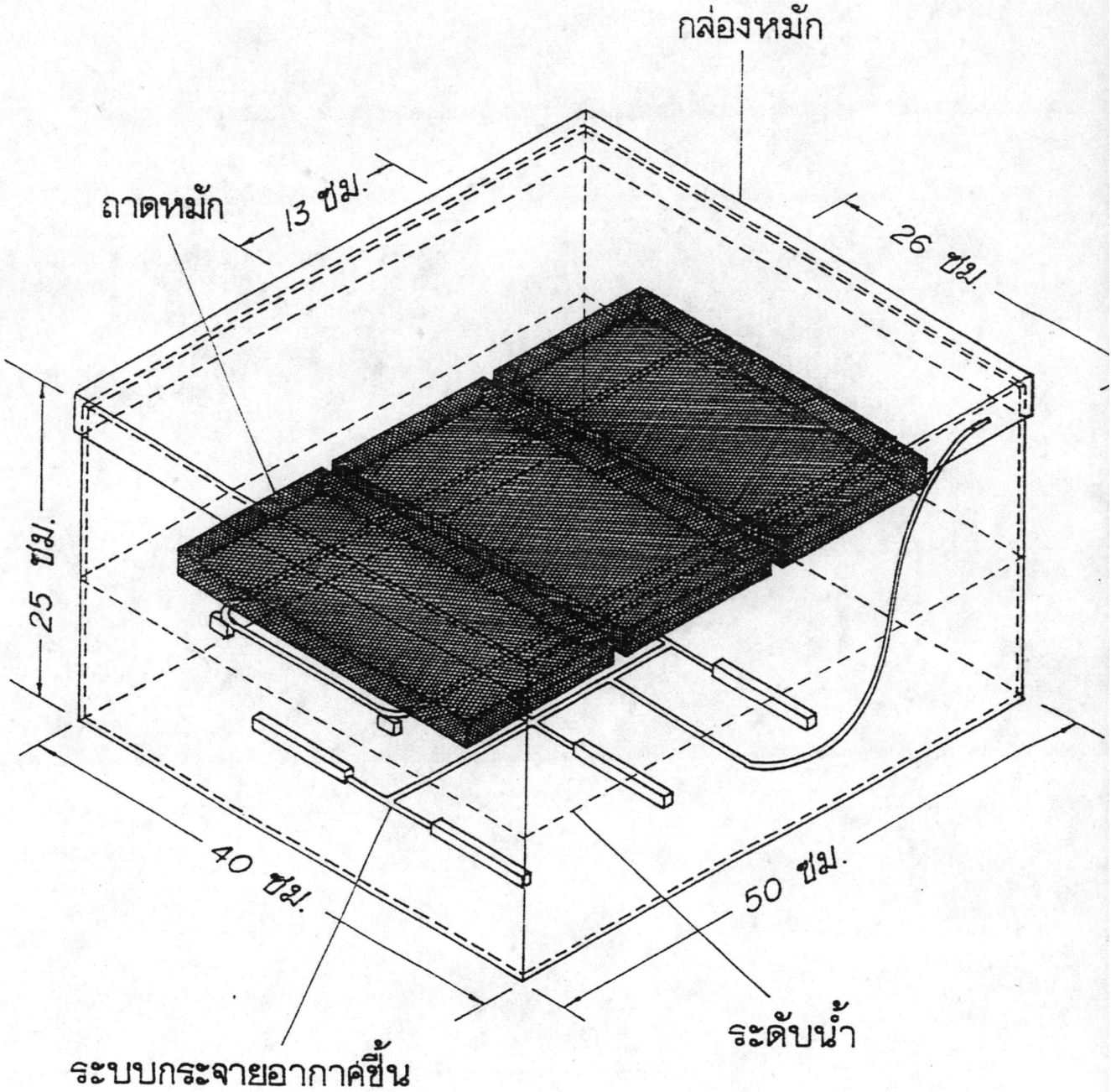
2.6.1.1 กล่องหมักพร้อมระบบควบคุม ดังแสดงในรูป 2.1 มีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมทำด้วยพลาสติกใส มีขนาด 25×40×50 ซม. ตอนบนเป็นฝาครอบเปิดปิดได้ ซึ่งเจาะรูกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 มม. 3 ช่อง เพื่อระบายอากาศและก๊าซต่าง ๆ ที่เกิดจากกระบวนการหมัก ผนังด้านข้างมีข้อต่อสำหรับเสียบสายยางให้อากาศเข้า

2.6.1.2 ส่วนประกอบของกล่องหมัก ดังแสดงในรูป 2.2 ประกอบด้วย

2.6.1.2.1 โครงเหล็กสำหรับวางถาดหมัก วางอยู่บนบ่าที่ติดอยู่กับผนังด้านในของกล่องหมัก ที่ระดับความสูง 20 ซม. จากพื้นกล่อง ทำหน้าที่รองรับถาดหมัก 3 ถาด



รูปที่ 2.1 กล่องหมักพร้อมระบบควบคุมต่าง ๆ



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของกล่องหมัก

2.6.1.2.2 ถาดหมัก ทำด้วยตะแกรงอะลูมิเนียมปลอดสนิม ขนาด 10 ช่องต่อนิ้ว กว้าง 13 ซม. ยาว 26 ซม. สูงตั้งแต่ 2-5 ซม. ทำหน้าที่บรรจุมันที่จะใช้ในการหมัก

2.6.1.2.3 ระบบกระจายอากาศขึ้น ติดตั้งที่พื้นของกล่องหมัก ทำหน้าที่จ่ายอากาศขึ้นให้ถาดหมัก ประกอบด้วยท่อกระจายอากาศหลัก ตรงปลายทั้งสองและตรงกลางของท่ออากาศหลักจะมีท่อแขนงต่อตั้งฉากออกมาทั้ง 2 ด้าน ที่ปลายจะมีหัวจ่ายอากาศ (air stone) ติดตั้งอยู่

2.6.2 <u>การควบคุมสภาวะแวดล้อมของกล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการ</u>

การควบคุมสภาวะแวดล้อมประกอบด้วยระบบควบคุมต่าง ๆ ดังนี้

2.6.2.1 ระบบควบคุมอุณหภูมิ คือ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น G.27 ของ New Brunswick Scientific., Co., Inc., U.S.A. การควบคุมทำโดยบรรจุกล่องหมักลงในตู้ควบคุมอุณหภูมิดังกล่าว

2.6.2.2 ระบบควบคุมปริมาณของอากาศที่จ่ายให้กล่องหมัก ประกอบด้วยเครื่องอัดอากาศ (air pump) ขนาดเล็ก 3 เครื่อง ทำหน้าที่จ่ายอากาศเข้าสู่เครื่องกรองอากาศก่อนที่จะผ่านก๊าซมิเตอร์ (gas meter) รุ่น MPD-23A-1 ของ Ricoh gas meter และวาล์ว (needle valve) ซึ่งทำหน้าที่วัดและควบคุมปริมาณการไหลของอากาศก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ระบบกระจายอากาศขึ้น ซึ่งอยู่ตอนล่างของกล่องหมักต่อไป

2.7 <u>การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของมันเส้นเมื่อหมักด้วย R. oligosporus</u>

2.7.1 <u>ขั้นตอนของการหมักในกล่องหมักระดับห้องปฏิบัติการ</u>

2.7.1.1 การเตรียมกล่องหมัก และระบบควบคุมต่าง ๆ โดยบรรจุกล่องหมักลงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ 37 °ซ เติมน้ำลงในกล่องหมักสูง 2.5 นิ้ว ติดตั้งโครงเหล็กและถาดหมักที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ต่อท่อทางเดินอากาศที่ผ่านเครื่องกรองอากาศเข้ากับกล่องหมัก ควบคุมปริมาณการไหลของอากาศให้ได้ 3.86×10^{-4} $ม^3$/วินาที/กก. มันแห้ง ด้วยก๊าซมิเตอร์และวาล์ว

2.7.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์ของ R. oligosporus เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้น ตามวิธีการในข้อ 2.2

2.7.1.3 การดำเนินการหมักในกล่องหมัก เตรียมอาหารในการหมักมันสำปะหลังในระบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-4) ผสมกับมันเส้นที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง พร้อมกับผสมตลอดเวลาเพื่อให้มันดูดซึมสารละลายของสารอาหารอย่างทั่วถึง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อมาตรฐาน ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ลงไป เติมน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นตามที่ต้องการผสมให้เข้ากัน บรรจุมันดังกล่าวลงในถาดหมัก ทำการหมักเป็นเวลา 84 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอรี (Lowry, 1951) (ภาคผนวก จ-4) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเจลดาห์ (Kjeldahl method) (ภาคผนวก จ-5) และความชื้นของมันหมัก (ภาคผนวก จ-6)

2.7.2 <u>การศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ในกล่องหมักที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของมันเมื่อหมักด้วย *R. oligosporus*</u>

ตัวแปรที่ศึกษาประกอบด้วย

2.7.2.1 ขนาดของชิ้นมันที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.7.1 แต่ใช้มันที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่าง ๆ กันดังนี้คือ 10 6 3 1 และมันขนาดเล็กกว่า 1 มม. ตามลำดับ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^6 สปอร์/กรัม มันแห้ง ปรับความชื้นเริ่มต้นของมันหมักประมาณ 60% บรรจุในถาดหมักให้ชั้นหมักสูง 15-20 มม.

2.7.2.2 ปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.7.1 แต่ใช้มันขนาด 3 มม. หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^6 สปอร์/กรัม มันแห้ง และแปรผันความชื้นเริ่มต้นของมันหมักระหว่าง 45-70% บรรจุในถาดหมักให้ชั้นหมักสูง 15-20 มม.

2.7.2.3 ความสูงของชั้นหมักที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.7.1 โดยใช้มันขนาด 3 มม. ในปริมาณที่ทำให้ชั้นหมักสูง 5 15 30 และ 50 มม. ตามลำดับ หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^6 สปอร์/กรัม มันแห้ง ปรับความชื้นเริ่มต้นของมันหมักประมาณ 65%

2.7.2.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ดำเนินการทดลองตามข้อ 2.7.1 โดยใช้มันขนาด 3 มม. หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่าง ๆ กันดังนี้คือ 2.5×10^{7} 2.5×10^{6} 2.5×10^{5} 2.5×10^{4} และ 2.5×10^{3} สปอร์/กรัม มันแห้ง ปรับความชื้นเริ่มต้นของมันหมักประมาณ 65% บรรจุลงในถาดหมักให้ชั้นหมักสูง 15-20 มม.

2.8 การประกอบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นในลักษณะถาดหมัก และระบบควบคุมสภาวะของการหมักในการหมักระดับขยายส่วน

2.8.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้น

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นในการทดลองนี้มีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังรูปที่ 2.3, 2.4, 2.5 และ 2.6 คือ

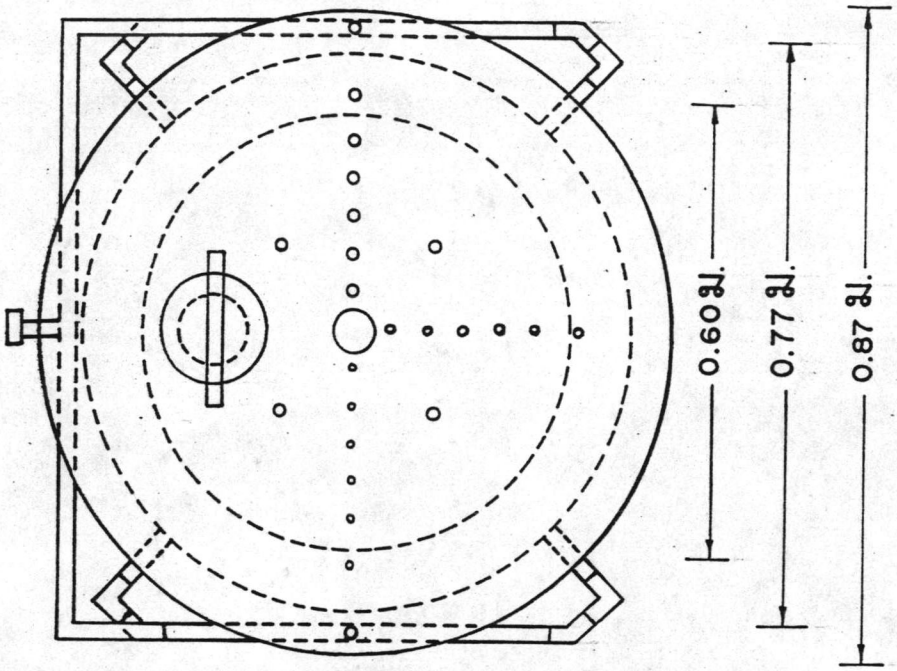
2.8.1.1 ถังปฏิกิริยา เป็นถังทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.77 เมตร สูง 0.80 เมตร ทำด้วยเหล็กปลอดสนิมที่มีความหนา 1.5 มม. ด้านข้างถังมีทางให้อากาศเข้า 4 ทาง แต่ละทางจะมีท่อต่อออกไปยังจุดศูนย์กลางถัง บนท่อมีหัวกระจายอากาศติดอยู่ ทางให้อากาศเข้า 4 ทางนั้นจะต่อออกมารวมกันเป็นทางอากาศเข้าทางท่อขนาด 25.4 มม. ที่ขอบถังด้านบนเป็นแผ่นเหล็กยื่นออกไปกว้าง 50 มม. โดยรอบเพื่อใช้เป็นที่ยึดฝาถัง ตอนล่างของถังติดตั้งขดลวดความร้อนขนาด 1000 วัตต์ 2 ตัว ในตำแหน่งตรงข้ามกัน และติดตั้งหัววัดอุณหภูมิ (sensor) ของระบบควบคุมอุณหภูมิ (thermostat)

2.8.1.2 ฝาถัง เป็นส่วนที่ปิดตัวถังด้านบน มีลักษณะเป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.87 เมตร ทำด้วยเหล็ก 2 ชั้นที่เชื่อมติดกัน ด้านบนเป็นแผ่นเหล็กเหนียวธรรมดาหนา 4.7 มม. ด้านล่างทำด้วยเหล็กปลอดสนิมหนา 1.5 มม. ยึดติดกับตัวถังด้วยตัวยึดรูปตัว c (c-clamp) ซึ่งสามารถถอดออกได้เมื่อเวลาต้องการเปิดฝาถัง บนฝาถังบริเวณตรงกลางได้เจาะเป็นช่องไว้สำหรับใส่เครื่องวัดอุณหภูมิจำนวน 10 ช่อง โดยเป็นช่องในแนวรัศมี 6 ช่อง ห่างกันช่องละ 50 มม. ส่วนอีก 4 ช่อง อยู่ที่รัศมี 150 มม. 4 จุดรอบถัง และมีช่องสำหรับใส่ท่อเพื่อดึงเอาตัวอย่างก๊าซออกไปวิเคราะห์อีก 6 จุดในแนวรัศมี ส่วนบริเวณริมด้านหนึ่งได้เจาะช่องกลมไว้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.15 เมตร มีฝาปิดเอาไว้สำหรับเป็นช่องเก็บตัวอย่างออกไปวิเคราะห์

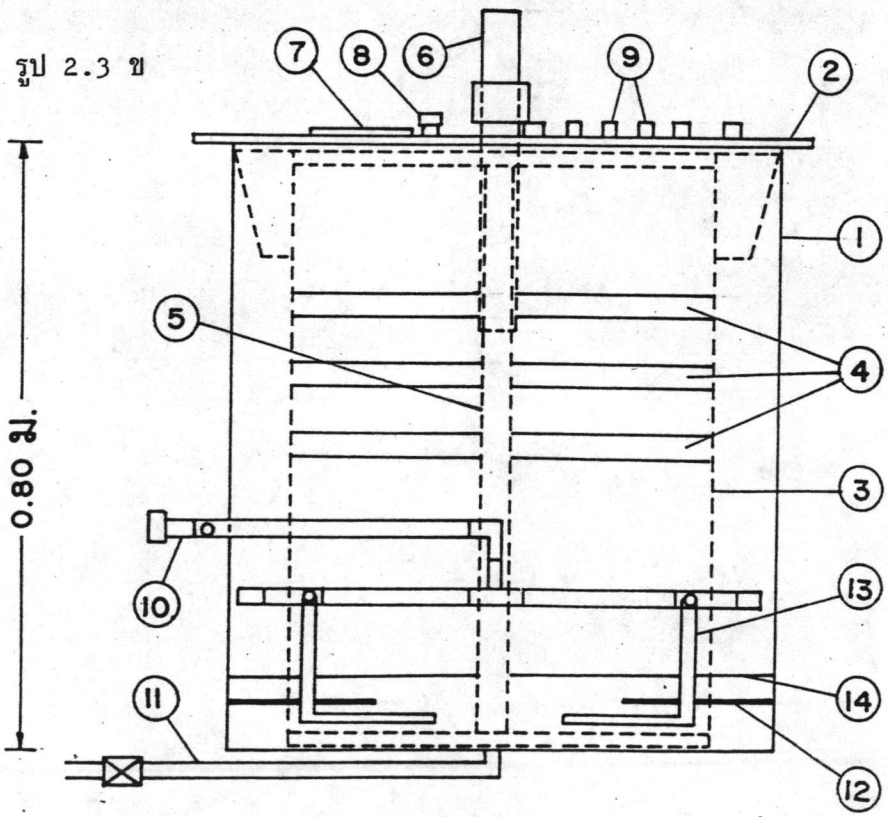
i 10295616

รูป 2.3 ก

รูปด้านบน



รูป 2.3 ข



รูปด้านข้าง

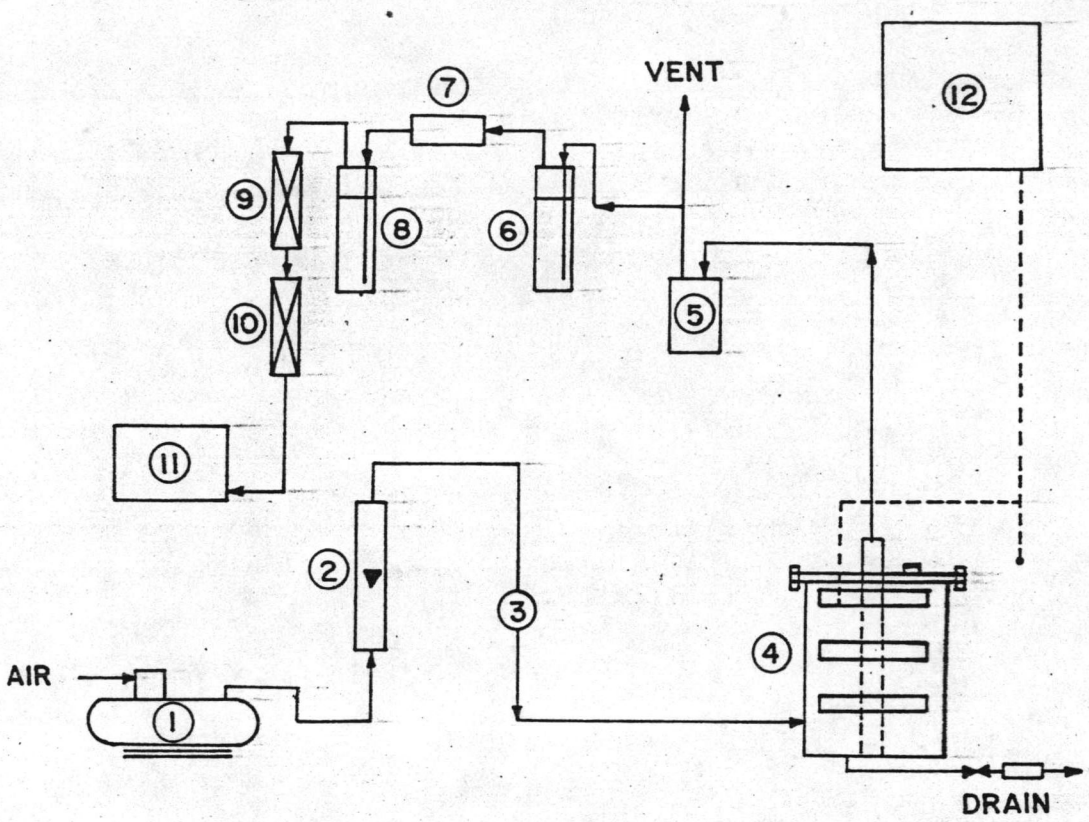
รูปที่ 2.3 ก แสดงเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นด้านบน

รูปที่ 2.3 ข แสดงเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นด้านข้าง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายรูปที่ 2.3 ข

1. ตัวถังชั้นนอกทำด้วยเหล็กปลอดสนิมหนา 1.5 มิลลิเมตร
2. ฝาถังทำด้วยเหล็กเหนียวหนา 4.7 มิลลิเมตร
3. โครงเหล็กสำหรับวางถาดบรรจุมันที่จะทำการหมัก
4. ถาดหมักทำด้วยตะแกรงลวดเหล็กปลอดสนิมหนา 16 ช่องต่อนิ้ว ยกขอบสูง 4 เซนติเมตร
5. ท่อเหล็กปลอดสนิมเจาะรูพรุนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร
6. ท่อเหล็กปลอดสนิม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร) สำหรับนำอากาศออก
7. ช่องทางสำหรับเก็บตัวอย่างมีฝาปิด
8. ช่องทางสำหรับใส่เครื่องวัดอุณหภูมิ
9. ช่องสำหรับใส่ท่อดึงตัวอย่างก๊าซ
10. ท่อขนาด 2.5 เซนติเมตร เป็นทางสำหรับให้อากาศเข้า
11. ท่อระบายน้ำขนาด 2.5 เซนติเมตร มีประตูน้ำติดอยู่ด้วย
12. ขดลวดความร้อนขนาด 1000 วัตต์
13. ท่อจ่ายอากาศขึ้นซึ่งมีหัวกระจายอากาศติดตั้งอยู่
14. ระดับน้ำภายในถังปฏิกิริยา



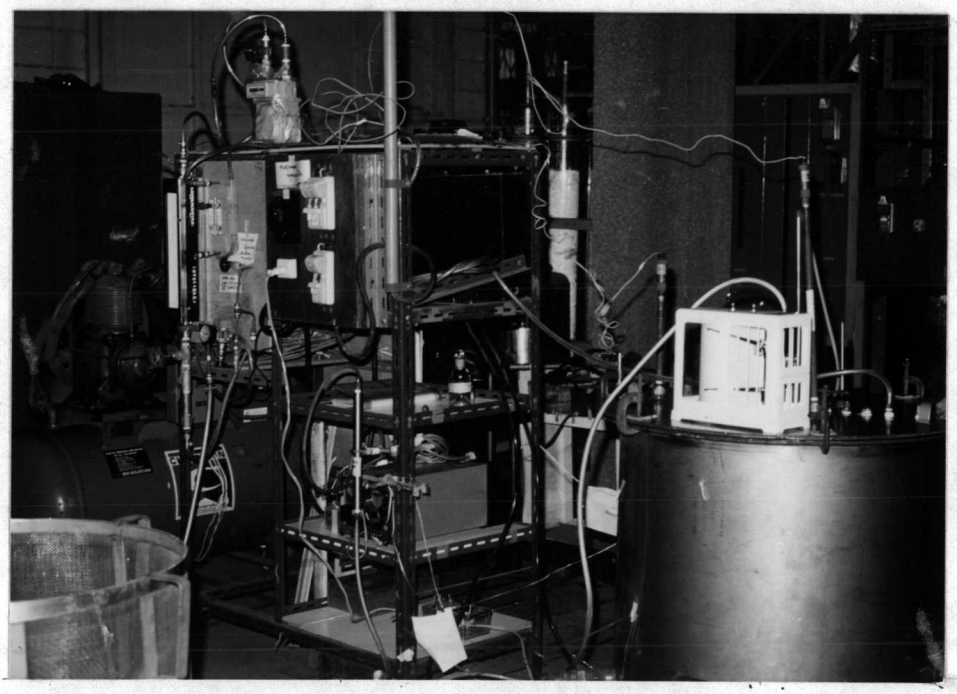
รูปที่ 2.4 แสดงแผนผังการทำงานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพระบบควบคุมและการวิเคราะห์

คำอธิบายรูปที่ 2.4

1. เครื่องอัดอากาศ
2. โรตามิเตอร์
3. เครื่องควบคุมความดัน
4. ถังปฏิกิริยา
5. ชุดดักความชื้น
6. สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตในกรดกำมะถันเข้มข้น
7. สำลี
8. กรดกำมะถันเข้มข้น
9. ซิลิกาเจล
10. ผงถ่านไว
11. เครื่องวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอินฟราเรด
12. เครื่องวัดและบันทึกอุณหภูมิแบบ 12 จุด

รูปที่ 2.5 แสดงเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นและระบบควบคุมต่าง ๆ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.6 แสดงเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นและระบบควบคุมต่าง ๆ

2.8.1.3 โครงเหล็ก วางอยู่ในถังปฏิกิริยา เป็นโครงสำหรับวางถาดบรรจุมันที่จะทำการหมัก มีลักษณะเป็นทรงกระบอกทำด้วยเหล็กปลอดสนิม สามารถวางถาดหมักซ้อนกันได้ 3 ถาด โดยถาดบนอยู่ต่ำกว่าฝาถัง 15 ซม. และมีช่องวางระหว่างถาด 30 ซม.

2.8.1.4 ถาดหมัก เป็นภาชนะสำหรับบรรจุมัน มีลักษณะเป็นถาดกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 ซม. ทำด้วยตะแกรงลวดเหล็กขนาด 16 ช่องต่อนิ้ว สูง 4 ซม. บริเวณตรงกลางเจาะรูกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มม. เป็นทางสำหรับสอดท่ออากาศออกซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มม.

2.8.1.5 ท่ออากาศออก เป็นท่อเหล็กปลอดสนิมเจาะรูพรุน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มม. ท่ออากาศออกจะสอดผ่านรูกลมตรงกลางของถาดหมักแต่ละถาด โดยปลายล่างสอดอยู่ในช่องกลมที่พื้นของโครงเหล็ก ปลายบนจะทะลุฝาถังด้านบนขึ้นไป ซึ่งจะมีที่รัดท่อเพื่อทำให้อากาศจากถังผ่านออกไปได้โดยทางท่อที่เจาะรูพรุนเท่านั้น

2.8.2 ระบบควบคุมสภาวะแวดล้อมของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ส่วนประกอบที่สำคัญคือ

2.8.2.1 ระบบควบคุมอุณหภูมิ เพื่อควบคุมอุณหภูมิของอากาศขึ้นภายในถังปฏิกิริยาให้มีค่าประมาณ 37 °ซ โดยให้ความร้อนกับน้ำซึ่งอยู่ทางตอนล่างของถังปฏิกิริยาด้วยขดลวดความร้อนขนาด 1000 วัตต์ โดยการจัดปรับเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งทำหน้าที่ปิดเปิดวงจรขดลวดความร้อนที่เป็นตัวให้ความร้อนในลักษณะที่เมื่ออากาศผ่านเข้าสู่ระบบกระจายอากาศทางตอนล่างของถังปฏิกิริยา อากาศจะผ่านขึ้นทางตอนบนก่อนที่จะออกจากถังปฏิกิริยามีความชื้นสัมพัทธ์ 100% และมีอุณหภูมิ 37 °ซ

2.8.2.2 ระบบวัดปริมาณอากาศที่จ่ายให้ถังปฏิกิริยา การจ่ายอากาศให้ถังปฏิกิริยาโดยเครื่องอัดอากาศ ซึ่งจะอัดอากาศผ่านเครื่องควบคุมความดัน (pressure regulator) ก่อนที่จะเข้าสู่โรตามิเตอร์ (rotameter) ซึ่งทำหน้าที่วัดและควบคุมปริมาณการไหลของอากาศเข้าสู่ถังปฏิกิริยา โดยผ่านระบบกระจายอากาศทางตอนล่างต่อไป

2.8.3 การวัดและบันทึกค่าตัวแปรต่าง ๆ

2.8.3.1 การวัดและบันทึกอุณหภูมิ โดยเครื่องวัดและบันทึกอุณหภูมิและเทอร์โมคับเปิล (ภาคผนวก จ-1)

2.8.3.2 การวัดและบันทึกความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ โดยเครื่องวัดและบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ (ภาคผนวก จ-2)

2.8.3.3 การวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยอินฟราเรด (ภาคผนวก จ-3)

2.8.3.4 การวิเคราะห์โปรตีนตามวิธีการของลอรี (Lowry, 1951) (ภาคผนวก จ-4)

2.8.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีการของเจลดาห์ (kjeldahl method) (ภาคผนวก จ-5)

2.8.3.6 การวิเคราะห์ความชื้นของมันหมัก (ภาคผนวก จ-6)

2.8.3.7 การคำนวณน้ำหนักแห้งสัมพัทธ์ของมันหมักที่เวลาใด ๆ (ภาคผนวก ค-3)

2.8.3.8 การคำนวณปริมาณโปรตีนเมื่อเทียบกับน้ำหนักมันแห้งเริ่มต้น (กรัม.โปรตีน/กรัม.น้ำหนักแห้งเริ่มต้น) (ภาคผนวก ค-3)

2.8.3.9 การคำนวณอัตราการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาคผนวก ค-1)

2.8.3.10 การคำนวณค่าความถี่ในการถ่ายเทมวล (ภาคผนวก ค-2)

2.9 <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของมันเส้นเมื่อหมักด้วย R. oligosporus โดยการหมักในอาหารแข็งในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตรึงชั้นในลักษณะถาดหมัก</u>

2.9.1 <u>ขั้นตอนการเตรียมการหมัก</u>

2.9.1.1 การเตรียมสปอร์ของ R. oligosporus เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น เตรียมตามวิธีการในข้อ 2.4

2.9.1.2 การเตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและระบบควบคุม เติมน้ำในถังปฏิกิริยาสูง 15 ซม. ติดตั้งถาดหมักและท่ออากาศออก ปิดฝาถังติดตั้งเทอร์โมคัปเปิลจนครบทุกจุด ต่อท่อทางออกของอากาศเข้ากับเครื่องวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปิดเครื่องอัดอากาศเพื่อจ่ายอากาศแก่ถังปฏิกิริยาโดยควบคุมปริมาณการไหลของอากาศด้วยโรตามิเตอร์ เปิดเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermostat) เพื่อควบคุมอุณหภูมิภายในถังปฏิกิริยาให้ได้ประมาณ 37 °ซ เปิดเครื่องบันทึกอุณหภูมิและเครื่องวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อทุกระบบเข้าสู่สภาวะ

ที่ต้องการคือ ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 100% อุณหภูมิในถังปฏิกิริยาประมาณ 37 °ซ และมีปริมาณการไหลของอากาศตามต้องการจึงเริ่มหมัก

2.9.1.3 การดำเนินการหมัก เตรียมอาหารในการหมักมันเส้นในระบบอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก-4) ผสมกับมันเส้นที่เตรียมจากข้อ 2.5 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง พร้อมกับผสมตลอดเวลาเพื่อให้มันเส้นดูดซึมสารอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน ผสมสารแขวนลอยของสปอร์ลงไป เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นตามต้องการ บรรจุในถาดหมัก หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยวัดและบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ตามข้อ 2.8.3

2.9.2 ขั้นตอนการทดลองหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพระดับขยายส่วน

การทดลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.9.2.1 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณการไหลของอากาศที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของมันเส้นเมื่อหมักด้วย R. oligosporus โดยหมัก 1 ถาด และใช้สภาวะที่เหมาะสม ซึ่งได้จากผลการทดลองในกล่องหมัก แต่ใช้ปริมาณการไหลของอากาศต่าง ๆ กันดังนี้

- ปริมาณอากาศ 3.83×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง
- ปริมาณอากาศ 1.53×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง
- ปริมาณอากาศ 0.76×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง
- ปริมาณอากาศ 0.31×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง
- ปริมาณอากาศ 0.15×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง

2.9.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนของมันเส้นเมื่อหมักด้วย R. oligosporus โดยหมัก 3 ถาดซ้อนกัน ใช้สภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในกล่องหมักและมีปริมาณการไหลของอากาศ ดังนี้

- ปริมาณอากาศ 0.79×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง
- ปริมาณอากาศ 0.97×10^{-4} $ม.^3$/วินาที/กก.มันแห้ง

2.10 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

แสดงไว้ในภาคผนวก ข.