บทที่ 3

การทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 เครื่องมือ ได้แก่

3.1.1 เครื่องหมัก (Fermentor) เป็นเครื่องหมักขนาด 5 ลิตร ของ NBS (New Brunswick scientific Co., Inc.) แบบ MF -105 โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้คือ

1. อ่างแก้ว (Fermenter jar)

เป็นแก้วรูปทรงกระบอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.14 เมตร สูง 0.30 เมตร มีปริมาตรทั้งหมด 5 ลิตร และปริมาตรที่ใช้งาน $1\frac{1}{4} - 3\frac{1}{2}$ ลิตร ภายในมี Electrode 2 อันคือ Reference และ measurement electrode จุ่มอยู่พร้อมทั้งใบกวนมี 3 ใบพัด (impeller) มี Baffles ติดอยู่ข้างถัง 4 อัน และมี single orifice sparger อยู่ทางด้านล่างของอ่างแก้ว ซึ่งต่อกับท่อให้อากาศเข้ามา ด้านบนของอ่างแก้วมีแผ่นเหล็กปิดอยู่ ซึ่งเป็นที่เปิดของท่อต่าง ๆ คือ ท่อให้อากาศเข้าและออก ท่อเติมกรดหรืออ่างในการหมัก ท่อน้ำเข้าและออก ท่อสำหรับดึงตัวอย่าง (sample line) ท่อสำหรับใส่เชื้อ ถรด หรือด่าง (Addition line) ท่อใส่สารกำจัดฟอง นอกจากนี้ยังมีเครื่องวัดต่าง ๆ ต่อระหว่างอ่างแก้วกับตัวเครื่องใหญ่ได้แก่ ground assembly. foam prove jack, Level prove jack, Temperature prove jack และ Recorder prove jack.

2. ท่ออากาศเข้าและออก (Air inlet และ Air outlet)

ซึ่งอากาศจะผ่าน glass wool ที่ฆ่าเชื้อแล้วเข้าไปในอ่างแก้ว เพื่อให้อากาศแก่จุลินทรีย์ โดยมีเครื่องวัดเรียกว่า flow meter ซึ่งควบคุมโดย Air pressure regulation และ air pressure gauge โดยมีช่วงระหว่าง 880-8800 มิลลิลิตร/นาที (cc/min)

3. เครื่องกวน (Agitator)

มีความสามารถในการกวนอยู่ในช่วง 100-1000 รอบ/นาที

4. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Temperature recorder)

จะวัดได้ตั้งแต่ 5-60 องศาเซลเซียส โดยจะมีความแตกต่างอยู่ในช่วง ± 0.25 องศาเซลเซียส

เครื่องมือที่กล่าวมาข้างต้นจะดูได้จากรูปที่ 7,8,9.

3.1.2 เครื่องควบคุม pH (pH controller) เป็นเครื่อง model pH-21 ของ NBS (New Brunswick scientific co., Inc, New Brunswick,N.J.USA) ใช้ในการควบคุม pH ในการทดลอง โดยจะนำ jack ของ Reference และ Measurement electrode ที่จุ่มอยู่ในอ่างแก้วมาเสียบกับ เครื่องควบคุม pH ซึ่งทราบผลได้ด้วย pH recorder โดย pH จะอยู่ในช่วง 2-12 หน่วย มีความแตกต่าง ± 0.05 pH ซึ่งควบคุมได้โดยการเติมกรดหรือด่าง (0.1N HCl และ 0.1N NaOH) โดยอัตโนมัติ บันทึกการเปลี่ยนแปลง pH โดยใช้ pH recorder ซึ่งถูกพล็อตเป็นกราฟ. มีความเร็วกระดาษ 1 นิ้ว/ชั่วโมง

3.1.3 เครื่องระเหยสูญญากาศ (vacuum evaporator) เป็นเครื่องของบริษัท Heidolph type 51111,U/min 40-290 ประเทศเยอรมัน ใช้ในการระเหยน้ำออกจากเอนไซม์ ให้เอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น การระเหยจะทำภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิต่ำ

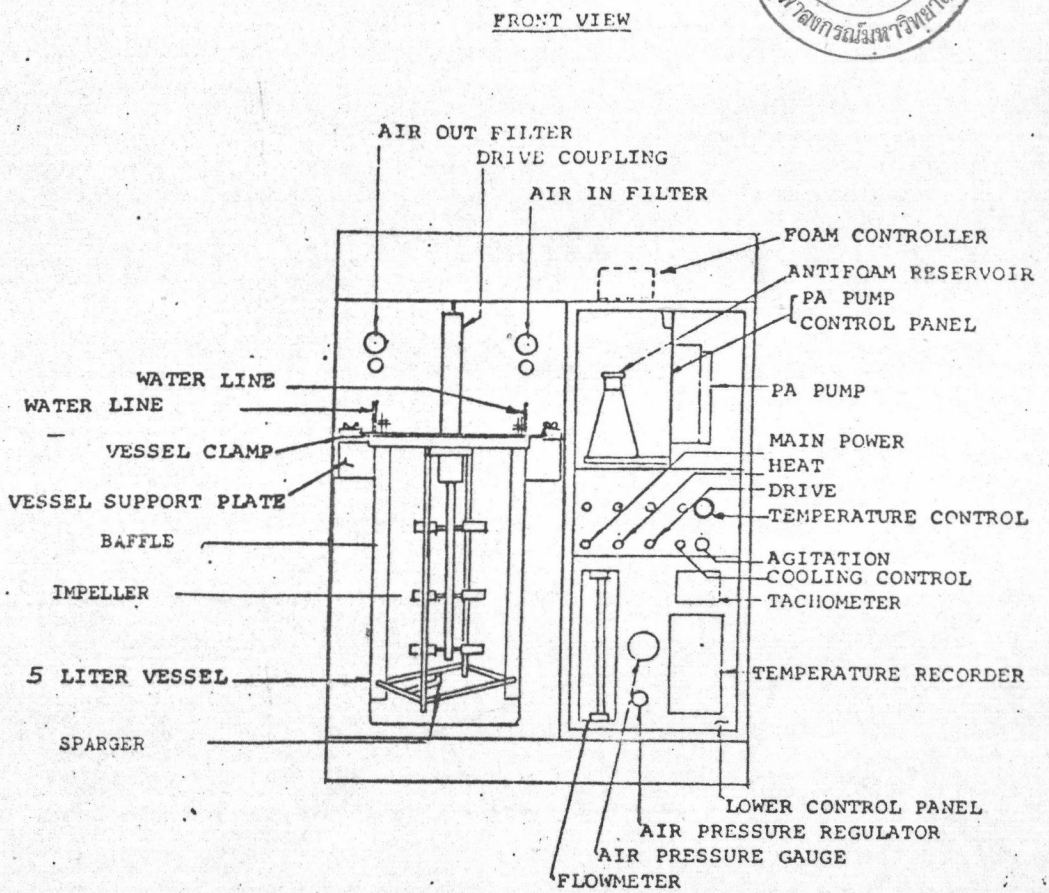
3.1.4 เครื่องมืออื่น ๆ ได้แก่

3.1,4.1 เครื่องเขย่า (shaker) ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในช่วงที่มีการแปรค่าอาหารเสริมและปริมาณที่ใช้ เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างยีสต์สกัด (yeast extract) กับยีสต์แห้ง และศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยจะมีอัตราการเขย่า 240 รอบ/นาที

3.1.4.2 เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องเหวี่ยงแบบความเร็วสูงที่ที่ควบคุมความเย็นได้ (High speed refrigirated centrifuge) แบบจำลอง B-20 ของบริษัท Damon/IEC เมสสาชูเซทส์ สหรัฐอเมริกา

3.1.4.3 Haematocytometer ของบริษัท AO Instrument, Scientific Instrument Division นิวยอร์ค สหรัฐอเมริกา เป็นเครื่องมือสำหรับนับจำนวนเชื้อราที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้ง

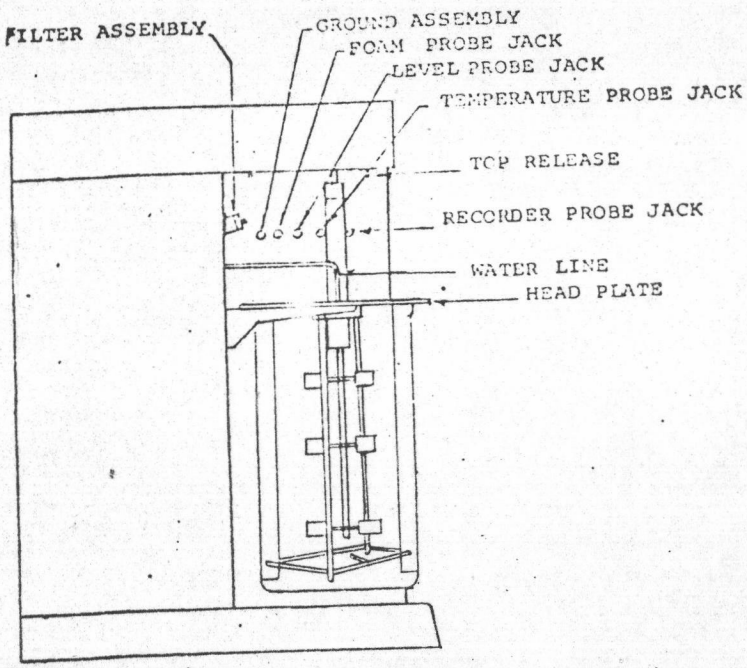
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทางด้านหน้า (32)

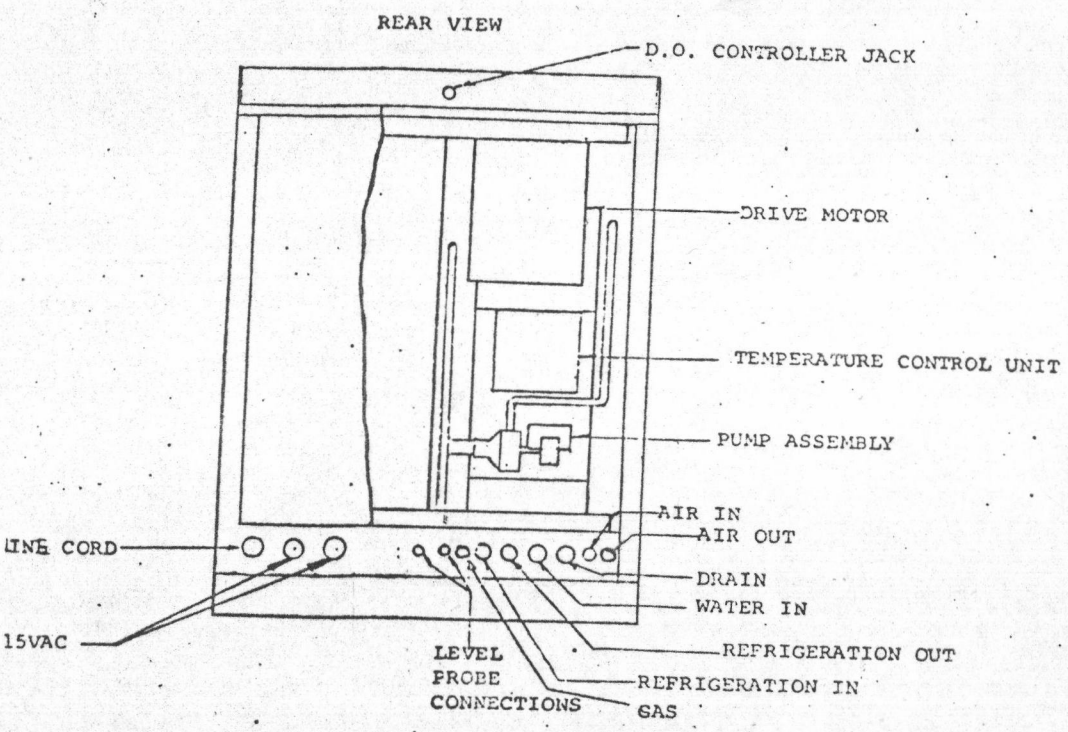
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ

SIDE VIEW



รูปที่ 8 เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทางด้านข้าง (32)

I16518910.



รูปที่ 9 เครื่องหมัก (Fermentor) ขนาด 5 ลิตร ของ NBS มองทางด้านหลัง (32)

3.1.4.4 Spray dryer ของภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เมตร, ความสูง 1.41 เมตร Atomizer เป็น Rotary type ทิศทางการป้อนเป็นแบบ co-current สามารถปรับอุณหภูมิ Inlet temperature โดยใช้ thermostat มีเครื่องวัดอุณหภูมิ ลมร้อนเข้าและออก เมื่อผงแห้งแล้วก็จะเข้าไปในขวดเก็บตัวอย่าง

3.1.4.5 Drum dryer เป็นแบบ Double drum ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

3.1.4.6 Spectrophotometer UV เลขเครื่อง 5347 ของบริษัท Prolabo ปารีส ฝรั่งเศส

3.1.4.7 pH meter ของบริษัท Electronic Instruments Limited, model 7010 ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้ในการวัด pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้

3.1.4.8 Hand refractometer ของบริษัท Atago N2 ประเทศญี่ปุ่น ใช้ในการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ช่วง 0-32 และ 32-58 องศาบริกซ์

3.2 กรรมวิธีการผลิตเอนไซม์

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ ในการทดลองแต่ละครั้งใช้ยีสต์แห้งจากโรงงานเบียร์และแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ยีสต์ซึ่งใช้ในการทดลองนี้ได้ขอมาจากโรงงานเบียร์อมฤต และพันธุ์ของยีสต์ดังกล่าวคือ S.carlsbergensis เป็นสารละลายยีสต์ (yeast slurry) ที่ได้จากถังหมักของขบวนการหมักครั้งสุดท้าย มีลักษณะเป็นของเหลวข้น มียีสต์ปนมากับน้ำเบียร์ มีสีน้ำตาลคล้ายกาแฟ มีกลิ่นแอลกอฮอล์แรง สารละลายยีสต์ที่ได้มาจากโรงงานแต่ละครั้งจะมีปริมาณของแข็งไม่คงที่โดยเปอร์เซ็นต์ของของแข็งจะอยู่ในช่วง 6.63-12.7% (6.63,9.35,9.78,12.7)

ในการเตรียมยีสต์แห้ง ทำที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำสารละลายยีสต์มาผสมน้ำด้วยอัตราส่วน 1:20 โดยปริมาตร ในบ่อซีเมนต์ตื้น ๆ โดยมีเครื่องกวนคอยกวนยีสต์กับน้ำให้เข้ากัน จากนั้นจะนำมาเข้าเครื่องเหวี่ยง แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำออก เอาส่วนที่เป็นของแข็งมาอบแห้ง โดยใช้ drum dryer สภาวะที่ใช้ได้แก่

ความดัน (P_g) 7 กก/ซม^2 ความเร็ว 20 รอบ/นาที ซึ่งยีสต์แห้งที่ได้มีความชื้น 3.34% โปรตีน 40.3% ไขมัน 4.08% เส้นใย 5.09% และเถ้า 3.59% แผนผังแสดงการเตรียมยีสต์แห้งที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 10

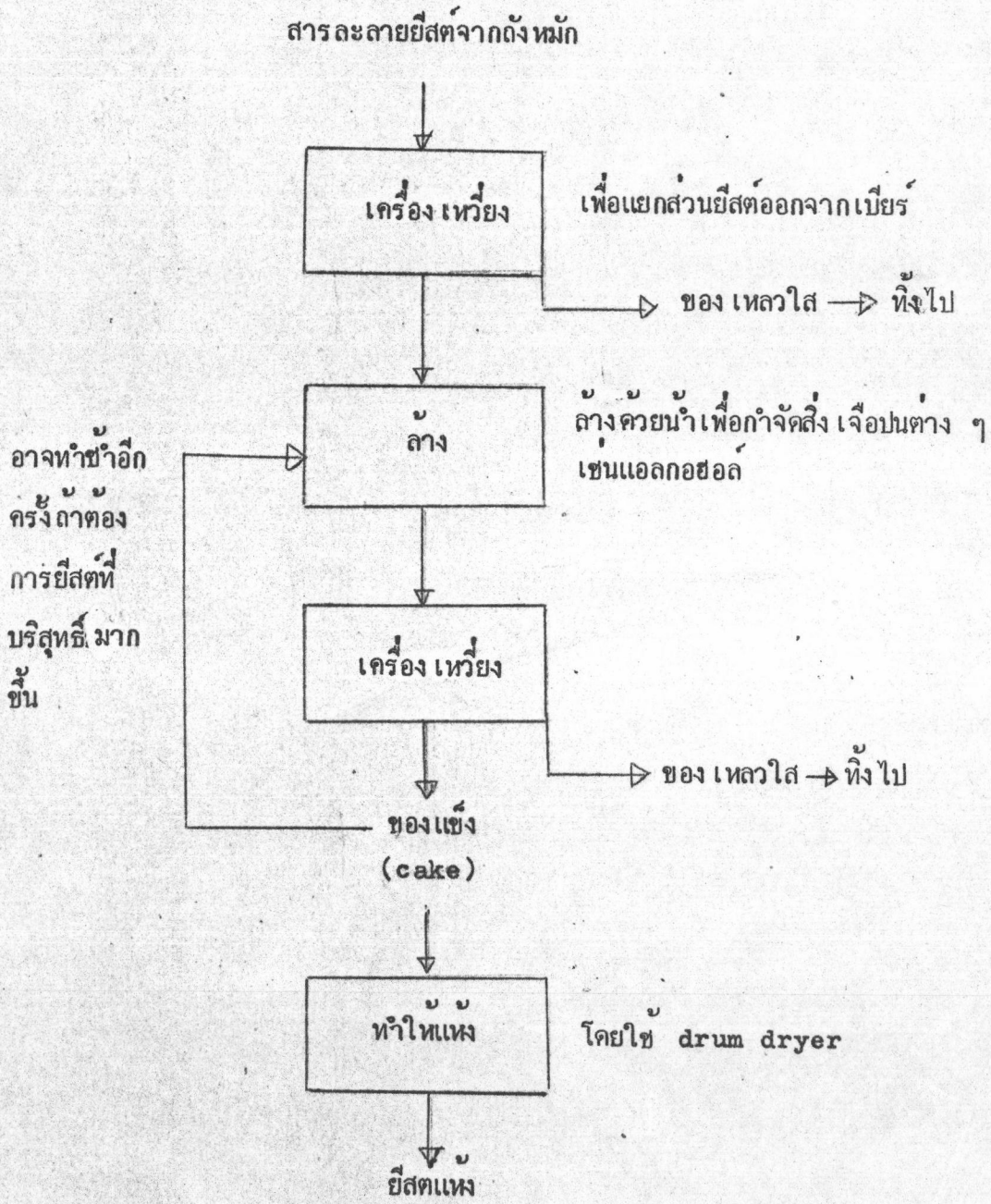
3.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมัน ยีสต์แห้ง K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ และ $FeSO_4$ ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ในการศึกษาอิทธิพลของอาหารเสริม และปริมาณที่ใช้ และการศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร และเพิ่มปริมาตรเป็น 2 ลิตร เมื่อศึกษาถึงสภาวะแวดล้อมในการผลิตเอนไซม์โดยใช้เครื่องหมัก อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ จะทำการปรับ pH ด้วย 0.1 N HCL จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที สำหรับกรณีแรก และ 30 นาทีในกรณีหลัง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมเชื้อลงไปให้ได้ปริมาตรหัวเชื้อเท่ากับ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก

3.2.3 การปลูกเชื้อ เชื้อราที่ใช้คือ **Aspergillus oryzae No.241** ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (1) เป็นเชื้อที่แยกมาจากโคจิ ในโรงงานซีอิ้ว เซงหลีหว่อ เชื้อรานี้มี α-amylase activity สูง (1) เจริญได้ดีใน **Czapek's solution agar** โดยมีโคโลนี สีเขียวปนเหลือง (**yellowish green**) แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (**yellowish citrine**) เมื่อมีอายุมากขึ้น

การปลูกเชื้อจะทำเป็นรูป **suspension** โดยเลี้ยงเชื้อราในหลอดอาหารที่มีปริมาตรเท่า ๆ กัน และวางเอียงให้มีพื้นที่ผิวเท่ากัน โดยใช้ **Czapek's solution agar** เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เตรียม **suspension** ของเชื้อโดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเกลี่ยเชื้อให้กระจาย แล้วเติมลงในอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความถี่ 240 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน

3.3 การศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ในการผลิตเอนไซม์

3.3.1 อิทธิพลของอาหารเสริมและปริมาณที่ใช้ โดยใช้อาหารเสริมคือ K_2HPO_4, KH_2PO_4



รูปที่ 10 แผนผังแสดงการเตรียมยีสต์แห้ง

และ $MgSO_4.7H_2O$ โดยแปรค่า K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 จาก 0.025 ถึง 0.1% (w/v)
ส่วน $MgSO_4.7H_2O$ แปรค่าจาก 0.025-0.05% (w/v)

ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่ คือ

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ แป้ง : ยีสต์แห้ง 2 :1 (นน. เปียก)

ปริมาณ $FeSO_4$ 0.001% (w/v)

อุณหภูมิที่ใช้ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

ปริมาตรหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

วิธีปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างตามสูตรที่ต้องการ ปรับ pH ให้ได้ pH 5 ด้วย 0.1 N HCl จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมเชื้อราที่อยู่ในรูป suspension โดยให้ปริมาตรหัวเชื้อเป็น 5% ของปริมาตรน้ำหมัก นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 240 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งนำตัวอย่างออกมาหา α-amylase activity ทุกวัน

วิธีติดตามผล

วิเคราะห์หาปริมาณ α-amylase activity ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 5 วัน ติดต่อกัน โดยดึงตัวอย่างมาครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (whattman No.1) แล้วเอาสารละลายใสไปหา α-amylase activity (ดังภาคผนวก ก และ ข)

3.3.2 เปรียบเทียบแหล่งของไนโตรเจนระหว่างยีสต์สกัดกับยีสต์แห้ง ในการทดลองจะใช้ยีสต์สกัดกับยีสต์แห้งที่เตรียมไว้ในปริมาณที่เท่ากัน แต่ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่คือ

ปริมาณ	K_2HPO_4	0.1% (w/v)
	KH_2PO_4	0.1% (w/v)
	$MgSO_4.7H_2O$	0.05%(w/v)

$FeSO_4$ 0.001 %

แป้งมันสำปะหลัง 2 % (นน. เปียก)

อุณหภูมิที่ใช้ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

ปริมาตรหัวเชื้อ 5 % ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

วิธีปฏิบัติการ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

วิธีติดตามผล

1. วิเคราะห์หาปริมาณ α-amylase activity ทุกวัน
2. ปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด ในยีสต์สกัดและยีสต์แห้ง
3. ปริมาณ soluble protein ในยีสต์สกัดและยีสต์แห้ง

3.3.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยจะเปรค่าปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 2-28% (ต่อนน. เปียก) โดยจะเพิ่มทีละ 2 หน่วย

ตัวแปรอื่น ๆ กำหนดให้คงที่คือ

ปริมาณของยีสต์แห้ง 4% (นน. เปียก)

ปริมาณ K_2HPO_4 0.1% (w/v)

KH_2PO_4 0.1% (w/v)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% (w/v)

อุณหภูมิที่ใช้ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

ปริมาตรหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

วิธีปฏิบัติการและวิธีติดตามผล

ทำเช่นเดียวกับ 3.3.1

3.4 การศึกษาอิทธิพลของสภาวะแวดล้อม (Environmental conditions) ในการผลิตเอนไซม์

3.4.1 ระยะเวลาการหมักที่ให้ α -amylase activity ดีที่สุด โดยจะทำการตรวจสอบทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ 48-72 ชั่วโมง ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่คือ

ความเร็วของเครื่องกวน 700 รอบ/นาที

อุณหภูมิในการทดลอง 35 องศาเซลเซียส

อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรของอากาศ/ปริมาตรของน้ำหมัก/นาที (VVM)

pH 5.0

ปริมาตรหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

วิธีการปฏิบัติ

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่า α -amylase activity สูง (จากข้อ 3.3.3) ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง 20% ยีสต์แห้ง 4% K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% และ $FeSO_4$ 0.001% มาหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเหล่านี้ให้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 2 ลิตร เทใส่อ่างแก้วขนาด 5 ลิตร แล้วปิดท่อต่าง ๆ ด้วย aluminium foil พร้อมทั้งปิดท่ออากาศที่มีใยแก้วใส่แล้วด้วย จากนั้นนำไปใส่ตะแกรงเพื่อป้องกันการกระทบกระแทกของแก้วกับ autoclave แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 30 นาที ปล่อยให้เย็นภายในหม้อนึ่ง นำมาติดตั้งเข้ากับเครื่องหมักพร้อมทั้งติดตั้งสายยาง และท่อต่าง ๆ ให้เรียบร้อย ทำการปรับ pH= 5 โดยใช้ 0.1 N HCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งสังเกตได้โดยเครื่องควบคุม pH รักษาอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ ความเร็วของเครื่องกวนให้ได้ตามที่ต้องการ หลังจากนั้นจึงเติม suspension ของเชื้อลงไป โดยเชื้อที่ใส่จะทำการนับทุกครั้งด้วย Haematocytometer ปริมาตรของเชื้อที่ใช้จะเท่ากับ 5% ของปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด ซึ่งมี

สปอร์ของเชื้อราเป็น 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม. ตลอดการทดลองต้องรักษาอัตราการให้อากาศ การกวน อุณหภูมิ และ pH คงที่ตลอด

วิธีติดตามผล

ทำการตรวจสอบ α-amylase activity โดยการดึงตัวอย่างมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไปกรอง และเอาสารละลายใสมาหา α-amylase activity โดยจะตรวจสอบตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ระหว่าง 48-72 ชั่วโมง

3.4.2 อิทธิพลของการกวน โดยใช้ความเร็วของเครื่องกวน (Agitator speed) 600, 650, 675, 700 และ 750 รอบ/นาที

ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่คือ

อุณหภูมิในการทดลอง 35 องศาเซลเซียส

อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM

pH = 5.0

ปริมาตรหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีปฏิบัติ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 แต่ตรวจสอบ activity เมื่อ 24,48,68,96 ชั่วโมง

วิธีติดตามผล

หา α-amylase activity โดยการดึงตัวอย่างมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไปกรองและเอาสารสะลายใสไปหา activity โดยจะตรวจสอบที่ 24,48,68,96 ชั่วโมง

3.4.3 อิทธิพลของอุณหภูมิ

โดยจะแปรค่าดังนี้คือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส

ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่คือ

ความเร็วของเครื่องกวน 600 รอบ/นาที

อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM

pH 5.0

ปริมาตรของหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีปฏิบัติ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีติดตามผล

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

3.4.4 อิทธิพลของอัตราการให้อากาศ (Aeration)

จะแปรค่าดังนี้คือ 0.75, 1.0, 1.25 และ 1.50 VVM

ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่ คือ

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ความเร็วของเครื่องกวน 700 รอบ/นาที

pH 5.0

ปริมาตรของหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม.

อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีปฏิบัติ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีติดตามผล

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

3.4.5 อิทธิพลของปริมาตรหัวเชื้อที่ใช้

จะแปรค่าดังนี้คือ 2.5, และ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ตัวแปรอื่น ๆ จะกำหนดให้คงที่คือ

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ความเร็วของเครื่องกวน 700 รอบ/นาที

อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM

pH 5.0

อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีปฏิบัติ

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

วิธีติดตามผล

ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2

3.5 การศึกษาการเตรียมเอนไซม์ที่ผลิตได้

3.5.1 เอนไซม์เข้มข้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรดังนี้คือ แป้งมันสำปะหลัง 20% ยีสต์แห้ง 4% K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% และ $FeSO_4$ 0.001% มาทำการผลิตเอนไซม์โดยใช้ปริมาตรหัวเชื้อ 5% ของปริมาตรน้ำหมัก ซึ่งมีปริมาณสปอร์ของเชื้อรา 14×10^6 ตัว/ลบ.ซม. สภาวะที่ใช้มีดังนี้คือ ความเร็วของเครื่องกวน 700 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1.0 VVM อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการหมักจน α-amylase activity มีค่าสูงสุด คือที่เวลา 68 ชั่วโมง แล้วนำเอนไซม์ที่ได้มาเข้าเครื่องเหวี่ยง โดยใช้ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกเอากากเส้นใยราออก สารละลายเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใสมีสีเหลืองอ่อน มีความเข้มข้น 8 องศาบริกซ์ จากนั้นจึงนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5.1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิในการระเหย

ตัวแปรคือ อุณหภูมิ 50, 50 และ 70 องศาเซลเซียส

วิธีการปฏิบัติ

นำสารละลายของเอนไซม์จากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาทำให้เข้มข้น ที่อุณหภูมิ 50, 60, 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ vacuum evaporator ภายใต้สภาพสูญญากาศ จนกระทั่งมีความเข้มข้น 35 องศาบริกซ์ ซึ่งจะมีปริมาตร 45 มิลลิลิตร

วิธีติดตามผล

ทำการตรวจสอบ α-amylase activity ของเอนไซม์เข้มข้นที่เตรียมได้

3.5.1.2 เสถียรภาพของเอนไซม์เข้มข้นที่อุณหภูมิตู้เย็น

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.5.1 มาทำให้เข้มข้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ vacuum evaporator ภายใต้สภาพสูญญากาศ จนได้สารละลายมีความเข้มข้น 35 องศาบริกซ์ ซึ่งมีลักษณะดังนี้คือ เป็นของเหลวข้นสีน้ำตาลอ่อน ไม่จับกันเป็นก้อน และไม่มีตะกอนตกลงมา มีกลิ่นเล็กน้อย นำเอนไซม์เข้มข้นนี้มาเติมโปแตสเซี่ยมซอร์เบท (potassium sorbate) ซึ่งเป็นสารกันเสีย และ stabilizer ปริมาณ 10 ppm คนให้ละลาย เก็บเอนไซม์นี้ไว้ในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วพร้อมจุก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

วิธีติดตามผล

ทำการตรวจสอบ α-amylase activity ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน และตรวจสอบอีกครั้งหนึ่งเมื่อครบ 90 วัน นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด ค่า specific activity สมมูลย์เด็กซ์โตรส ปริมาณความชื้น โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์เข้มข้น ของบริษัท NOVO Industri A/S, Enzyme Division,Denmark.

3.5.2 เอนไซม์ผง นำเอนไซม์เข้มข้น 35 องศาบริกซ์ที่ได้จากการระเหยน้ำที่ 60 องศาเซลเซียส ในหัวข้อ 3.5.1.1 มาทำให้เป็นผง โดยใช้เครื่อง spray dryer สภาวะการทำให้แห้งมีดังนี้คือ Inlet temperature 185 องศาเซลเซียส อัตราการหยดของตัวอย่าง (feed

rate) 13-15 หยด/นาที Outlet temperature 80 องศาเซลเซียส ความดันอากาศ 50 ปอนด์/ตร.นิ้ว ซึ่งสภาวะนี้ได้มาจากการทำวิจัยเรื่องมะนาวผงของ นางสาวปราณี ประกิตเตชะกุล (4) โดยจะสเปรย์ในสภาพที่ไม่เติมเด็กซ์ทริน และเติมเด็กซ์ทริน ลงไปเป็นdrying aid ซึ่งในกรณีหลังจะใส่เด็กซ์ทรินลงไปจนกระทั่งสารละลายมีความเข้มข้น 40 องศาบริกซ์ เอนไซม์ผงที่ได้จะเก็บในถุงอะลูมิเนียม

การตรวจสอบ

ทำการตรวจสอบα-amylase activity และลักษณะทางกายภาพ คือกลิ่น สี และเนื้อสัมผัสของเอนไซม์ผงที่เตรียมได้โดยใช้สภาวะต่าง ๆ รวมทั้งตัวอย่างเอนไซม์ผงที่เก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมเป็นเวลา 2 เดือน นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ค่า specific activity ปริมาณความชื้น และสมมูลย์เด็กซ์โตรส โดยทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ผงของ NOVO Industri A/S,Enzyme Division,Denmark.

3.6 วิธีการวิเคราะห์

3.6.1 ปริมาณเชื้อ โดยใช้ Haematocytometer ซึ่งเป็นสไลด์ที่ทำพิเศษ ตีเป็นช่อง ๆ ประกอบด้วย 25 ช่องใหญ่ แต่ละช่องประกอบด้วย 16 ช่องเล็ก โดยการดูดตัวอย่างมาทำ dilution แล้วหยดลงบนสไลด์ปิดด้วย cover glass นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับเชื้อราที่เห็น โดยการนับในแนวทะแยงมุม เพราะเป็นการสุ่มตัวอย่างที่ให้ค่าเฉลี่ยดีที่สุด (ดังภาคผนวก ข)

3.6.2 α-amylase activity โดยใช้ soluble starch เป็น substrate ที่ pH 5.0 โดย 1 หน่วยของα-amylase activity คือปริมาณเอนไซม์ที่จะทำให้เกิดน้ำตาลมอลโตส 1 มิลลิกรัมในตัวอย่างที่มี soluble starch 1% ในเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ดังภาคผนวก ข)

3.6.3 ปริมาณ soluble protein โดยวิธี Lowry et al.(29)ซึ่งจะหาปริมาณโปรตีนได้โดยใช้ standard curve ของ Bovine Serum Albumun (BSA) ต่อมิลลิลิตร

3.6.4 ค่าสมมูลย์เด็กซ์โตรส วิเคราะห์ตามวิธีของ Lane และ Eynon (6,24)

3.6.5 ปริมาณโปรตีนทั้งหมด วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. ปี 1980 (10)

3.6.6 ปริมาณไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. ปี 1980 (10)

3.6.7 ปริมาณเส้นใย วิเคราะห์ตามวิธีของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปี 2516 (7)

3.6.8 ปริมาณเถ้า วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. ปี 1980 (10)

3.6.9 ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. ปี 1980 (10)

3.6.10 ปริมาณของแข็งทั้งหมด วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. ปี 1980 (10)