บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส

เนื่องจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของดี-กลูโคส จึงมีการศึกษาเพื่อนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เลี้ยงจุลชีพให้เป็นแหล่งคาร์บอนผลิตสารต่างๆ เช่น แอลกอฮอลล์ กรดอะซีติก กรดอินทรีย์ต่างๆ (Mes-Hartree และ Hogan,1983 ; Land,1989 ; Paturua,1989) ตลอดจนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (กนก,2528) ปัญหาที่ผู้วิจัยมักประสบ มีผลสืบเนื่องจากการที่เซลลูโลสที่พบในวัสดุการเกษตรมักไม่อยู่ในรูปอิสระ แต่อยู่ร่วมกับโพลิเมอร์อื่นๆ เช่น เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน กอปรกับมีโครงสร้าง ที่ยากต่อการเข้าถึงสำหรับการย่อยโดยเอนไซม์ ดังที่กล่าวแล้วในบทนำ ดังนั้นจึงต้องทำการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเหล่านี้เพื่อให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมสำหรับการย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสก่อน

Kim และคณะ (1988) พบว่า ขนาดของวัสดุทางการเกษตรมีผลต่อการย่อย ดังนั้นจึงทำการปรับสภาพเบื้องต้นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว โดยการบดด้วยเครื่องบดชนิดแฮมเมอร์มิลล์ (hammer milled) และร่อนคัดขนาดประมาณ 50 เมช หรือ 300 ไมครอน (μ) ก่อนการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี และ/หรือ ทางกายภาพต่อไป นอกจากนี้ Kelsey และ Shafizadeh (1980) ยังพบอีกว่า การบดวัสดุทั้งเซลลูโลสชนิดบริสุทธิ์ (Whatman CF-11),กระดาษหนังสือพิมพ์, ลิกโนเซลลูโลส และเซลลูโลสจากไม้แบบ ball milling ด้วยวัสดุ เช่น ทราย ลูกแก้ว หรือ สเตนเลส ให้มีขนาด 60 เมช (mesh) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสโดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าวัสดุที่ไม่ผ่านการบดถึง 10 เท่า

จากการทดลองเพื่อคัดเลือกวิธีการปรับสภาพ (pretreat) ชานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว ด้วยวิธีต่างๆ อันได้แก่ ก) การใช้กรด H_2SO_4 ที่ความเข้มข้น 1-5 % ที่อุณหภูมิห้อง โดยแปรผันเวลาตั้งแต่ 10-120 นาที ข) การใช้ด่าง NaOH ที่ความเข้มข้น 1-10 % อุณหภูมิห้อง ซึ่งแปรผันเวลา 10-120 นาที และ 4 % NaOH ที่อุณหภูมิ 100° ซ. เวลา 10-120 นาที ค) การอบไอน้ำยายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, อุณหภูมิ 121°ซ. (autoclave) เวลา 15-60 นาที ง) การใช้ NaOH ที่ความเข้มข้น 1-10 % ร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน เป็นเวลา 15-60 นาที พบว่าการใช้ด่างร่วมกับการอบไอน้ำยายใต้ความดัน มีผลช่วยทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยชานอ้อย ฟางข้าว และ รำข้าว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับ เบตา-กลูโคสิเดสเพิ่มขึ้นมากที่สุด ซึ่งดีกว่าการใช้กรด H_2SO_4 หรือการใช้ด่าง NaOH หรือการอบไอน้ำยายใต้ความดันเพียงอย่างเดียว (ดังผลการทดลองในตารางที่ 4-8) ทั้งนี้เนื่องจาก การปรับสภาพด้วยกรดและ ด่างมีผลทำให้ลักษณะโครงสร้างของเซลล์พืชเปลี่ยนไปต่างกันโดย การปรับสภาพวัสดุด้วยกรด H_2SO_4 หรือการย่อยด้วยกรดในสภาวะความดันสูง (autohydrolysis) จะมีการกำจัดลิกนินออกไปเพียงเล็กน้อย โดยกรดอาจเข้าทำลาย (attack) โครงสร้างของลิกนินโดยตรงหรือโดยการย่อยพันธะระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับลิกนินก็ได้ ซึ่งจะทำให้สารประกอบของผนังเซลล์พืช เช่น เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสอสัณฐาน หลุดออก เกิดเป็นช่องขึ้นที่ผนังเซลล์ ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเข้าย่อยเซลลูโลสได้สะดวก แต่พบว่าการใช้กรดจะทำให้ดัชนีความเป็นผลึก (Crystallinity Index) และ อัตราส่วนระหว่างเซลโลไบโอสและกลูโคสสูง เมื่อย่อยด้วยเซลลูเลส และ เบตา-กลูโคสิเดส จึงให้น้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ ซึ่งต่างจากการปรับสภาพด้วยด่าง NaOH ซึ่งให้ช่องว่างที่โครงสร้างมากกว่า โดยการทำลายจะเข้าถึงส่วนเนื้อเยื่อชั้นใน และ เลือกทำลายเฉพาะเฮมิเซลลูโลส และพันธะระหว่างลิกนินกับคาร์โบไฮเดรต (Fox และคณะ,1987) โดยมีรายงานการทำลายลิกนินสูงถึง 80.7 % (Mononmani และ Sreekantiah,1987) นอกจากนี้ยังทำให้เส้นใยมีการอมน้ำ (swelling) และมีพื้นที่ผิวมากขึ้นด้วย สภาพหลังการปรับวัสดุเหล่านี้ด้วยด่าง จึงมีความเหมาะสมต่อเอนไซม์เซลลูเลสในการเข้าย่อยได้ง่ายกว่า ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยมากกว่าการใช้กรด นอกจากนี้การใช้กรด ยังก่อให้เกิดเฟอร์ฟูรัล ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์ จึงไม่นิยมใช้ ดังนั้น การใช้ด่างในการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจึงมีความเหมาะสมกว่า การทดลองนี้ยังพบว่าการใช้ด่างร่วมกับความร้อน จะ

สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับสภาพให้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ เช่น Mishra และคณะ (1983) พบว่า การปรับสภาพซานอ้อย และ เนื้อไม้เมสตา (Mesta wood) ด้วย 5 N.NaOH มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้กรด โดยจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลสที่ความเข้มข้น 2.5 หน่วย (FPU) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นน้ำตาล (% saccharification) ถึง 62 และ 33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ปราณี (2531) พบว่าวิธีการปรับสภาพผักตบชวาด้วยการใช้สารละลาย 4 % ของ NaOH ที่อุณหภูมิ 100° ซ. เป็นเวลา 30 นาที จะช่วยให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยด้วยเซลลูเลส 52 % เมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้กรดจะให้ผลในการปรับสภาพได้ดี ก็ต่อเมื่อปรับร่วมกับสภาวะการอบไอน้ำภายใต้ความดัน และอุณหภูมิสูงมาก (Autohydrolysis-steam Explosion) เช่น ที่ความดัน 2,200 kPa อุณหภูมิ 200° - 220° ซ. เท่านั้น (Fox และคณะ,1989 ; Dekker และ Wallis,1983)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าวิธีต่างๆ ทั้งการใช้กรด ด่าง การอบไอน้ำภายใต้ความดัน รวมถึงการใช้ด่างร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดันซึ่งใช้ได้ผลดีในการปรับสภาพซานอ้อย และฟางข้าว นั้นกลับไม่สามารถใช้ปรับสภาพแกลบ เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นได้เลย แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในการย่อยแกลบขึ้น (ดังตารางที่ 7) ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากแกลบมีองค์ประกอบซึ่งเป็นเถ้าถึง 21.1 % โดยองค์ประกอบในเถ้าส่วนใหญ่เป็นซิลิกาถึง 87-97 เปอร์เซนต์ และอยู่ในรูปของสารประกอบร่วมระหว่างเซลลูโลส-ซิลิกา ทำให้การย่อยเป็นไปได้ยาก (Grist,1975; Khane,1984)

5.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส

ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของ เอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma reesei* และ เบตา-กลูโคสิเดส จาก *Aspergillus niger* ของบริษัท Novo, Denmark พบว่า ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 มีการทำงานได้ดีที่สุด โดยให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยซานอ้อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองสูงสุด (รูปที่ 5) ดังนั้นที่ค่าความเป็นกรดด่างนี้ จึงเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง ซึ่งสอดคล้องกับเอกสารประกอบการใช้เอนไซม์เซลลูคลาส (ชื่อทางการค้าของเซลลูเลส) ของ

บริษัท Novo และ รายงานของ Manonmani และ Sreekantiah (1987)

จากผลการทดลองในรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่า ที่ความเป็นกรดด่างเดียวกัน ชนิดของบัฟเฟอร์ต่างกันจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองด้วย เมื่อทำการศึกษาผลของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ ซิเตรท อะซิเตท และซัคซิเนทบัฟเฟอร์ โดยปรับความเป็นกรดด่างเป็น 4.5 4.8 และ 5.0 ดังผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่า อะซีเตทบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 และซัคซิเนทบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 5.0 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากมีวัตถุประสงค์ที่จะนำไฮโดรไลเสทที่ได้นี้ไปใช้เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งจากการศึกษาของเอก (2532) พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีความเสถียรต่ออะซีเตทบัฟเฟอร์มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 สำหรับการทำงานของเซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดส

ปัจจัยอีกข้อหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ จากผลการทดลองในรูปที่ 7 พบว่า ที่อุณหภูมิ 40° ซ.จะเป็นอุณหภูมิที่เซลลูเลสและเบตา-กลูโคสิเดสทำงานได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับเอกสารประกอบการใช้เอนไซม์เซลลูคลาสของบริษัท Novo, Denmark แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 55° ซ. พบว่า เอนไซม์ทั้งสองจะสูญเสียการทำงาน เนื่องจากว่า เอนไซม์มีสมบัติเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ โดยเมื่อถูกความร้อนจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denature) ไป ทำให้ลดความสามารถในการทำงานลง (สุนันทา,2535)

ผลการศึกษาถึงปริมาณของเซลลูเลส และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยชานอ้อย พบว่า ที่ปริมาณ 80 หน่วยต่อกรัมชานอ้อย ในระบบ 1 กรัมชานอ้อยใน 0.05 M อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตรรวม 50 มล. เวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสม (รูปที่ 8, รูปที่ 9) โดยที่ปริมาณ และ เวลามากกว่านี้จะไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ เซลโลไบโอสจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเอง (Dwivedi และ Ghose, 1979 ; Bailey และ Ollis,1986)

Dekker และ Wallis (1983) รายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นน้ำตาล (% saccharification) ของชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธี Autohydrolysis-Exploded ได้ถึง 30 % เมื่อเพิ่มการย่อยด้วยการเติมเอนไซม์เบตา-

กลูโคสิเดส ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของเวลาในการเติมเอนไซม์นี้ โดยเปรียบเทียบเวลาในการเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส ปริมาณ 60 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย ระหว่าง ก)การเติมพร้อมกับเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 80 หน่วยต่อกรัมซานอ้อยให้ย่อยซานอ้อยร่วมกันเป็นเวลา 24 ช.ม. กับ ข) การให้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยซานอ้อยเป็นเวลา 24 ช.ม. ก่อนแล้วจึงเติมเบตา-กลูโคสิเดสย่อยซานอ้อยต่ออีก 6 ช.ม.จากผลการทดลองรูปที่ 10 พบว่าการย่อยซานอ้อยโดยการเติมเอนไซม์ทั้งสองพร้อมกัน จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า ในขณะที่การแยกเติมเบตา-กลูโคสิเดสภายหลังให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่า ทั้งนี้ คาดว่าผลนี้เกิดจากการที่ เซลโลไบโอส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้จากการย่อยซานอ้อย โดยเซลลูเลสจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเอง (Dwivedi และ Ghose,1979 ; Kluepfel และคณะ,1986 ; Bailey และ Ollis,1986) ดังนั้นเมื่อแยกเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส จึงทำให้มีเซลโลไบโอส สะสมอยู่ในระบบมากพอที่จะยับยั้งการทำงานของเซลลูเลส แต่ถ้าเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดสลงไปพร้อมกัน เอนไซม์นี้จะช่วยเปลี่ยนเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคสได้ทันที ปริมาณเซลโลไบโอสในสารละลาย จึงลดลงไม่เหลือมากพอที่จะเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอีก ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยหลังการย่อยจึงมากกว่า นอกจากนี้ Ferchak, Hagerdal และ Pye (1980) ได้รายงานว่า อาจเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยให้เพิ่มขึ้นได้ โดยการเติมเอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดส ลงในสารละลายขณะกำลังย่อย ทุกๆ 8 ช.ม.

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเบตา-กลูโคสิเดส (รูปที่ 11) จนกระทั่งปริมาณเอนไซม์สูงกว่า 120 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย ปริมาณน้ำตาลจึงเริ่มคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ คือน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมีปริมาณมาก จึงกลับมายับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอง (Bailey และ Ollis,1986) การใช้เอนไซม์เบตา-กลูโคสิเดสร่วมกับเซลลูเลสในปริมาณ 120 และ 80 หน่วยต่อกรัมซานอ้อย ตามลำดับ จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย 0.97 กรัมต่อกรัมซานอ้อย (รูปที่ 11) สูงกว่าการใช้เซลลูเลสเพียงอย่างเดียวซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลเพียง 0.52 กรัมต่อกรัมซานอ้อยเท่านั้น (รูปที่ 8)

เมื่อศึกษาผลของปริมาณของซานอ้อยต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่า เมื่อปริมาณของซานอ้อยเพิ่มสูงขึ้น จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์รวมที่ปลดปล่อยมากขึ้น (ตารางที่ 9) แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยต่อกรัมซานอ้อยจะลดลง (รูปที่ 12) ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองด้วยวิธี 2 กระบวนการ (Dekker และ Wallis,

1983) คือ

ก. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (end product) อันได้แก่ เซลโลไบโอส และ กลูโคส ตามลำดับ

ข. เนื่องจากปริมาณสับสเตรทที่มากเกินไป (substrate inhibition) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mandels และ Sternberg (1976), Manonmani และ Sreekantiah (1987),และ ปราณี (2532) จากผลการทดลองในตารางที่ 9 ได้เลือกใช้ปริมาณซานอ้อย ที่ 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเป็น 80 เปอร์เซนต์ ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อย เมื่อใช้ปริมาณซานอ้อยเริ่มต้นเป็น 1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทั้งนี้จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยถึง 27.7 มก.ต่อมล. มากกว่าเมื่อใช้ปริมาณซานอ้อยเริ่มต้นเป็น 1 % (ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยเพียง 8.48 มก.ต่อมล.) ถึง 3.3 เท่า

5.3 <u>การใช้ไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium sp.* สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส</u>

การคัดเลือกชนิดของไฮโดรไลเสทของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร อันได้แก่ ซานอ้อย ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส ในอัตราส่วน 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) ร่วมกับ 0.5 % เดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล 3-50 x 10^6) ในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก จากผลการทดลองในรูป 16 ค พบว่าเชื้อจะมีการเจริญสูงสุดประมาณ 4 มก.ต่อมล.ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยแหล่งคาร์บอนทุกชนิด ยกเว้นการเลี้ยงเชื้อราในไฮโดรไลเสทของแกลบ ซึ่งมีการเจริญสูงสุดเพียง 2 มก.ต่อมล. จากนั้นการเจริญจะเริ่มลดลง สำหรับเอนไซม์จะเริ่มสร้างขึ้นหลังชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังผลการทดลองในรูปที่ 16ก พบว่า การใช้ไฮโดรไลเสทของรำข้าว และ ฟางข้าวจะให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนส 25 และ 21 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในสภาวะควบคุม (20 หน่วยต่อมล.) เล็กน้อย ส่วนไฮโดรไลเสทของซานอ้อยให้ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (18 หน่วยต่อมล.) ต่ำกว่าสภาวะควบคุมเล็กน้อย ในขณะที่ถ้าเลี้ยงเชื้อในไฮโดรไลเสทของแกลบนั้นเชื้อจะไม่สามารถ

สร้างเดกซ์แทรนเนสได้เลย ทั้งนี้อาจเนื่องจากแกลบมีปริมาณซิลิกาสูงถึง 94 เปอร์เซนต์ของปริมาณเถ้าในแกลบ (Grist,ed.,1975) นอกจากนี้ยังมีโลหะหนัก เช่น K^+ Al^{3+} Ca^{2+} Mg^{2+} และ Fe^{3+} (Khane,ed,1984) จากรายงานของเอก (2532) พบว่า $FeCl_3$ $FeSO_4$ $HgCl_2$ Co^{2+} และ Ni^{2+} ที่ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อย รวมทั้ง $MgSO_4$ ที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองของ Kosoric และคณะ (1973); Joshi และ Tamhane (1975); Hattori, Ishibashi และ Minato (1981); Madhu และ Prabhu (1984); Koenig และ Day (1989) นอกจากนี้สารเหล่านี้ยังมีผลยับยั้งต่อเมตาบอลิซึมของเชื้อราด้วย จึงทำให้เชื้อรามีการเจริญต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในไฮโดรไลเสทของแหล่งคาร์บอนอื่นๆ

การเลี้ยงเชื้อราใน 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) ของไฮโดรไลเสทของวัสดุทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมี 0.5 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสรางเอนไซม์ ยังให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสและแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่า การเลี้ยงเชื้อราในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก ซึ่งมี 1.0 % เดกซ์แทรน เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและสารชักนำ (รูปที่ 16ก, 16ข) ซึ่งคาดว่าน่าจะมีผลมาจากเดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำการสร้าง (inducible enzyme) ด้วย โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเดกซ์แทรน จะมีผลในการเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์ด้วย (เอก,2532)

ระยะเวลาการเติมเดกซ์แทรนในการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) ของไฮโดรไลเสทของชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันเวลาในการเติม 1.0 % เดกซ์แทรนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 48 ของการเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาการเติมที่ต่างกันมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ โดยการเติมเดกซ์แทรนตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ จะให้ปริมาณของเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าการเติมที่เวลาอื่น (รูปที่ 17ก) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมเดกซ์แทรนลงในชั่วโมงที่ 72 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อมีการเจริญสูงสุดกลับไม่พบการสร้างเอนไซม์เลย (ไม่ได้แสดงผลในรูป) ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าเชื้ออยู่ในระยะเวลานั้นอ่อนแอใกล้จะสลาย (lysis) แล้วจึงไม่มีการสร้างเอนไซม์ ซึ่งตรงข้ามกับกรณีของแบคทีเรีย ตามรายงานของณฐินี สุวรรณสิงห์ (2533) ที่สามารถเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรียทนเค็มได้ เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย

Micrococcus sp. สายพันธุ์ Z-10 ด้วยกลูโคสจนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มที่เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ก่อน แล้วจึงเติม 0.25 % เดกซ์แทรนลงไป จะช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างเดกซ์แทรนเนสได้มากกว่าการเติมเดกซ์แทรนตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อพิจารณาแอคติวิตีจำเพาะ พบว่า แอคติวิตีจำเพาะในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก สูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะในสูตรอาหารดัดแปลง (รูปที่ 17ข) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ ในอาหารสูตรดัดแปลงมีแหล่งคาร์บอนมากกว่า ทำให้เชื้อมีการเจริญมากกว่า (รูปที่ 17ค) มีการนำสารอาหารต่างๆไปใช้ในการสร้างเซลล์ เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่จนกระทั่งลดลง จะเกิดการสลายของเซลล์ (cell lysis) จึงมีการปลดปล่อยโปรตีนภายในเซลล์ออกมาทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อจึงมีมากกว่า ดังนั้นจึงทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำ

เนื่องจากเดกซ์แทรน ทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และ สารชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในสูตรอาหารดังหลายๆ รายงาน เช่น Fukumoto (1971) ; Simonson และ Liberta (1975) ; Hattori Ishibashi (1981) ; สูตรอาหาร WW-DEX ของ Koenig และ Day (1988); เอก (2532) ทำให้การหาปริมาณของไฮโดรไลเสท (ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน) ที่ใช้ร่วมกับปริมาณของเดกซ์แทรนในอัตราส่วนที่เหมาะสมกระทำได้ยาก โดยมักมีผลกระทบต่อกัน ดังนั้นจึงทำการทดลองโดยใช้หลักการออกแบบทาง Complete Randomized Design แบบ Factorial Design (3x3) แปรผันปริมาณไฮโดรไลเสทของชานอ้อย ตั้งแต่ 0.1, 0.25, และ 0.5 % พร้อมกับแปรปริมาณเดกซ์แทรนเท่ากับ 0.5, 0.75, 1.0 % จากผลการทดลองในตารางที่ 10 พบว่าปริมาณไฮโดรไลเสทของชานอ้อย 0.1 % (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส)ร่วมกับปริมาณเดกซ์แทรน 1.0% เป็นอัตราส่วนที่ทำให้เชื้อราผลิตการสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด 30.22 หน่วย/มล.ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อปริมาณไฮโดรไลเสทสูงขึ้นจะมีการเจริญเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 12) แต่การสร้างเอนไซม์กลับลดลง (ตารางที่ 10) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสในไฮโดรไลเสทมากเกินไป ทำให้เกิด "แคแทบอไลท์รีเพรสชั่น (Catabolite Repression)" โดยกลูโคสจะไปกดการทำงานของจีน (gene) ส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ที่เรียกว่า "Glucose Effect" ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ หรือชะลอการสร้างเอนไซม์ (Bernlohr,1964; Doi,1973; Brock และ Madigan,eds.,1988; เกษม พงษ์มณี, 2536) และยังสอดคล้องกับผลการทดลองในรูป

ที่ 13 ซึ่งทำการทดลองโดยใช้กลูโคสบริสุทธิ์ เป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติมในสูตรอาหารของ Fukumoto ตามภาคผนวก ก พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 0.1 % จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้เช่นกัน

5.4 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

การคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างเดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ตามรูปที่ 18 ก พบว่าการใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเลี้ยงเชื้อ จะให้ปริมาณเดกซ์แทรนเนสประมาณ 33 หน่วย/มล. และแอคติวิตีจำเพาะ 42 หน่วยต่อกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าการใช้ไฮโดรไลเสทของกากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน ถึง 2 และ 3 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญไม่แตกต่างมากนัก (ประมาณ 6 มก./มล.ดังแสดงในรูปที่ 18 ค) ดังนั้นจึงเลือก $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งพบว่า $NaNO_3$ ปริมาณตั้งแต่ 0.05 - 0.3 % ไม่ทำให้เชื้อมีการเจริญที่แตกต่างกันนัก (รูปที่ 19 ค) แต่จะมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ และ แอคติวิตีจำเพาะ (รูปที่ 19ก,19ข) โดยถ้าปริมาณของ $NaNO_3$ เพิ่มขึ้น จะทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้น จนกระทั่งคงที่เมื่อปริมาณ $NaNO_3$ สูงเกินกว่า 0.2 % สำหรับแอคติวิตีจำเพาะก็เป็นไปในลักษณะเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของเอก แสงวิเชียร (2532) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อปริมาณ $NaNO_3$ สูงเกินกว่า 0.2 % จะทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนมากเกินไป จนกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ (Joroslav และคณะ, 1987)

5.5 ผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการสร้างเอนไซม์ จากรูปที่ 20 พบว่า การเติมสารสกัดจากยีสต์ จะมีผลเพิ่มการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส แอคติวิตีจำเพาะ และการเจริญของเซลล์เป็นอย่างมาก (รูปที่20ก, 20ข,20ค) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสารสกัดจากยีสต์มีสารประกอบเกลือแร่ วิตามินที่ละลายน้ำได้ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และเปปไทด์ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์ (Sikyta,1983) ซึ่ง

สอดคล้องกับการทดลองของ Aeschlimann และ Stockar (1990) ที่พบว่าการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์จะช่วยเพิ่มการผลิตกรดแลคติกจาก *Lactobacillus helveticus*

5.6 เปรียบเทียบการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ระหว่างการเลี้ยงในอาหารสูตร Fukumoto ตามภาคผนวก ก และการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง

สูตรอาหาร	เดกซ์แทรนเนส (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	น้ำหนักแห้งเซลล์ (มก./มล.)
Fukumoto	25 - 30	35	4.5
สูตรดัดแปลง	35 - 42	42	6.5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกวิธีการปรับสภาพวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรแต่ละชนิดได้แก่ ฟางข้าว แกลบ รำข้าวและชานอ้อย ซึ่งบด, ร่อน และคัดขนาด 50 เมช (mesh) ก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับ เบตา-กลูโคสิเดส พบว่า วิธีการที่เหมาะสำหรับการปรับสภาพฟางข้าว และ ชานอ้อย คือ การกระทำด้วย 1 % NaOH ร่วมกับการอบไอน้ำภายใต้ความดัน (autoclave ที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว,121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที สำหรับวิธีที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพแกลบ และรำข้าว คือ การกระทำด้วย 1 % NaOH ที่อุณหภูมิห้อง (30° - 35°ซ.) เป็นเวลา 30 และ 10 นาที ตามลำดับ
2. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสมแล้ว ด้วยเอนไซม์โดยเลือก ชานอ้อย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำตาล เป็นตัวแทนในการศึกษา พบว่า สภาวะที่เหมาะสมได้แก่ การใช้ เอนไซม์เซลลูเลส และเบตา-กลูโคสิเดส ที่ความเข้มข้น 40 และ 60 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งวัสดุ ตามลำดับ เพื่อย่อยสารละลาย 4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของวัสดุการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยวิธีที่เหมาะสมในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 4.8 ที่อุณหภูมิ 40° ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสถึง 22 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งชานอ้อย
3. การใช้วัสดุทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ ชานอ้อย ฟางข้าว รำข้าว และแกลบ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่าวัสดุแต่ละชนิดให้ผลไม่แตกต่างกันจึงเลือกใช้ชานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งและหาได้ง่ายในโรงงานน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอน
4. ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมคือ 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส)เป็นแหล่งคาร์บอน และ 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของเดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ โดยเติมเดกซ์แทรนตั้งแต่เริ่มการเลี้ยงเชื้อ
5. การใช้วัสดุทางการเกษตร ซึ่งได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย กากเมล็ดทานตะวัน กากถั่วเหลือง

เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ให้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่า การใช้ $NaNO_3$ ในสูตรอาหารของ Fukumoto ดังนั้น จึงเลือกใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

6. ปริมาณของ $NaNO_3$ ที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส คือ 0.2 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)
7. สารสกัดจากยีสต์มีผลอย่างมากต่อการสร้างเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสโดย *Penicillium* sp.สายพันธุ์ 61 โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ปริมาณ 0.2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าจะมีการสร้างเอนไซม์มากกว่าเมื่อไม่มีสารสกัดจากยีสต์
8. สูตรอาหารดัดแปลงที่ใช้ใน การผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ประกอบด้วย 0.1 % ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย (น้ำหนัก/ปริมาตร เมื่อเทียบกับกลูโคส)เป็นแหล่งคาร์บอน 1.0 % เดกซ์แทรนเป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ 0.2 % $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน, 0.2% K_2HPO_4, 0.05% KCl, 0.05 % $MgSO_4 . 7H_2O$, 0.0005% $FeSO_4$ และ 0.2 % สารสกัดจากยีสต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0
9. สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส คือ ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที