บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองหาสภาพของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae พบว่าในปลายข้าวเจ้าผสมรำหยาบในอัตราส่วนอย่างหยาบได้ 4:1 และเมื่อทำสเกลให้ละเอียด อัตราส่วน 9:1 และปริมาณน้ำ 29 % มีการสร้างสปอร์มากที่สุดคือ 9.5×10^{12} สปอร์/มล. ดังแสดงในกราฟที่ 1 และการสร้างสปอร์จะลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยปลายข้าวเจ้าผสมรำข้าวสาลี และปริมาณน้ำ 23 % ปลายข้าวเจ้าผสมกากถั่วเหลือง ใส่น้ำ 26 % และปลายข้าวเจ้าใส่น้ำ 17 % ก่อสร้างสปอร์ 7.5×10^{12} 6.0×10^{12} และ 1.3×10^{12} สปอร์/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เนื่องจากในรำหยาบมีส่วนผสมของเปลือกข้าวปนอยู่ด้วย จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อโปร่งอากาศถ่ายเทได้ดี

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนโดยใช้โพลีเปปโตนและแอมโมเนียมทาร์เทรต พบว่าโพลีเปปโตนส่งเสริมการเจริญของ R. oryzae ได้มากกว่าแอมโมเนียมทาร์เทรต และแอมโมเนียมทาร์เทรตส่งเสริมการสร้างกลูโคอมิเลสของR.oryzae ได้สูงกว่าโพลีเปปโตน ดังแสดงในกราฟที่ 2 และ 12 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Borton และคณะ (1972) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยง Aspergillus niger ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ยีสต์ เอกซ์แทรก (yeast extract) ส่งเสริมการเจริญแต่มีการสร้างกลูโคอมิเลสน้อย แต่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ส่งเสริมการสร้างกลูโคอมิเลสได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์

สำหรับธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างกลูโคอมิเลสพบว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตส่งเสริมการสร้างกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้น ดังแสดงในกราฟที่ 3 4 13 และ 14 คอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัม/ลิตร ไม่มีผลต่อการสร้างกลูโคอมิเลส (กราฟที่ 6) เฟอร์ริกซัลเฟตทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงตั้งแต่ความเข้มข้น 0.2กรัม/ลิตร (กราฟที่ 5) แสดงว่าเฟอร์ริกซัลเฟตมีผลยับยั้งการสร้างกลูโคอมิเลสของราสายฟันฉุนี้

จากการทดลองเลี้ยง R. oryzae บนอาหารแข็งที่มีความชื้นของอาหารแตกต่างกัน พบว่าความชื้นของอาหารแข็งมีความสำคัญต่อการสร้างกลูโคอมิเลสโดยถ้าเติมน้ำลงในอาหารแข็ง

40 % จะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสสูง 107.5 หน่วย/กรัม อาหารเลี้ยงเชื้อในเวลา 48 ชม. แต่ถ้าเติมน้ำ 30 % และ 60 % การสร้างกลูโคอมิเลสจะต่ำมาก และถ้าเติมน้ำ 50 % จะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสเกิดขึ้นช้าต้องใช้เวลานาน 72 ชม. จึงจะได้กลูโคอมิเลสแอคติวิตีใกล้เคียงกับอาหารที่ใส่น้ำ 40 % ดังแสดงในกราฟที่ 5 Raimbault และ Alazard (1980) ได้อธิบายว่าปริมาณน้ำที่ใส่ลงในอาหารแข็งมีผลต่อการนำอาหารเข้าเซลและการถ่ายเทของอากาศในอาหารแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pichyangkura และคณะ (1981) ได้พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการสร้างอมิเลสบนอาหารแข็งที่ 40 %

การเลี้ยงราบนอาหารแข็งควรมีการถ่ายเทอากาศที่ดี (Raimbault and Alazard, 1980) จากการทดลองนี้ได้ใช้รำหยาบช่วยทำให้อาหารแข็งโปร่งและเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณรำหยาบ พบว่ารำหยาบ 2 ส่วนต่อข้าวเหนียว 5 ส่วน ข้าวเจ้า 5 ส่วน เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลส (กราฟที่ 8) สำหรับแหล่งคาร์บอนในการทดลองนี้ใช้ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว และข้าวเจ้าผสมข้าวเหนียว อัตราส่วนต่างกัน พบว่าข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสมากที่สุด ถ้าใช้ส่วนผสมของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวจะทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลง และถ้าใช้ส่วนข้าวเหนียวอย่างเดียวทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสต่ำสุด (กราฟที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pichyangkura และคณะ (1981)

ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลส พบว่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำที่ใส่ลงในอาหารแข็งเท่ากับ 4.0 ได้ปริมาณกลูโคอมิเลสสูงสุด และถ้าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเพิ่มขึ้น การสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลง (กราฟที่ 10) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Lineback และคณะ (1966) พบว่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของ A. niger ต่อมาในปี 1972 Borton และคณะได้ทดลองเลี้ยง A. niger ในอาหารเหลวที่มีความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่ 4.5 เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชม. แล้วปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้เป็น 2 ทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุด และถ้าปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้สูงกว่า 2 การสร้างกลูโคอมิเลสจะลดลงเป็นลำดับ Alazard และ Raimbault (1981) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการเลี้ยง A. niger เพื่อผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าระหว่างที่ราเจริญอยู่ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารแข็งจะลดลง แต่ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเหลวจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารแข็งต่อการสร้างกลูโคอมิเลสของราแต่ละสายพันธุ์จะมีความเฉพาะตัวของมันเอง

จากการศึกษาหาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ใส่ลงในอาหารแข็งซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างกลูโคอมิเลสพบว่า จำนวนสปอร์ $5x10^6$ และ $1x10^7$ สปอร์/มล. ทำให้ราสายพันธุ์นี้สร้างกลูโคอมิเลสสูง 229.4 และ 235.0 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลง (กราฟที่ 11)ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Raimbault และ Alazard (1980) พบว่าใช้จำนวนสปอร์ของ A. niger $4x10^6$ ถึง $4x10^7$ สปอร์/มล. ราจะเจริญดีและสปอร์งอกเป็นเส้นใยทั้งหมด แต่ถ้าใช้สปอร์เริ่มต้น $4x10^8$ สปอร์/มล. จะมีอัตราการเจริญสูงในระยะแรก และต่อมาอัตราการเจริญจะลดลงและมีสปอร์ที่ไม่งอกเหลืออยู่มาก

จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตกลูโคอมิเลสจาก R. oryzae มาก พบว่าการสร้างกลูโคอมิเลสสูงสุดคือ ให้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 283.7 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 36 ชม. ถ้าบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ ได้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 247.3 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ จะได้กลูโคอมิเลสแอคติวิตี 235.2 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อในเวลา 42 ชม. และจะไม่มีการสร้างกลูโคอมิเลสเลยถ้าบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 40°ซ ดังแสดงในกราฟที่ 10 จากรายงานของ Gandjar (1981). กล่าวว่า R. oryzae สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 42±2°ซ

การขยายสเกลการผลิตกลูโคอมิเลสในตู้บ่มเชื้อที่ออกแบบ (รูปที่ 1) ให้ควบคุมความชื้นของอากาศในตู้บ่มเชื้อได้โดยเป่าอากาศที่อิ่มตัวด้วยความชื้นนาน 3 ชม. อากาศในตู้บ่มเชื้อจะอิ่มตัวด้วยความชื้น อุณหภูมิเริ่มต้นในตู้บ่มเชื้อ 30°ซ เมื่อราเจริญจะเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น (กราฟที่ 16) ทำให้การสร้างกลูโคอมิเลสลดลงเหลือเพียง 270 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะที่เลี้ยง R. oryzae ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. สามารถสร้างกลูโคอมิเลสได้ 415 หน่วย/กรัมอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากตู้บ่มเชื้อนี้ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิในขณะที่เชื้อราเจริญให้คงที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Narahara และคณะ (1982) ได้ทดลองเลี้ยง A. oryzae บนอาหารแข็งในตู้บ่มเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 38°ซ นาน 30 ชม. แล้วปรับอุณหภูมิในตู้บ่มเชื้อให้เป็น 25 30 35 และ41°ซ จะทำให้การสร้างแอลฟาอมิเลสลดลงจากที่บ่มเชื้อไว้ที่ 38°ซ ตลอดเวลา

ผลจากการอบแป้งเชื้อให้แห้งที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าอบแป้งเชื้อที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50°ซ นาน 12 ชม. จะทำให้ความชื้นในแป้งเชื้อลดลงเหลือเพียง 6 ถึง 8 % โดยน้ำหนัก และกลูโคอมิเลสแอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่ากลูโคอมิเลสไม่เสียสภาพ (denature) แต่ถ้าอบที่อุณหภูมิ 55°ซ จะทำให้กลูโคอมิเลสแอคติวิตีลดลง ดังแสดงในกราฟที่ 17 การทำให้แป้งเชื้อแห้งจะหยุดการ

เจริญของเชื้อราและรักษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไว้ได้ระยะหนึ่ง

การทำกลูโคอมิเลสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80 % ทำให้ความบริสุทธิ์ของกลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้น 7.45 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด และเหลือกลูโคอมิเลส 71.67 % เมื่อผ่านกลูโคอมิเลสลงใน ซี.เอม.เซฟาเดกซ์ ซี-50 สามารถแยกกลูโคอมิเลสได้ 2 พีก ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.3 โมลาร์ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 82.63 และ 49.24 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด เหลือกลูโคอมิเลส 22.95 และ 19.28 % ตามลำดับ เมื่อนำกลูโคอมิเลสแต่ละพีกมาผ่านลงในเซฟาเดกซ์ จี-200 พบว่าพีกแรกจะได้กลูโคอมิเลส I ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 254.98 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด และเหลือกลูโคอมิเลส 10.34 % ส่วนพีกหลังได้กลูโคอมิเลส 2 ชนิดคือ กลูโคอมิเลส II และ III ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 204.14 และ 205.06 เท่าของเอนไซม์ที่เริ่มสกัด และเหลือกลูโคอมิเลส 5.94 และ 7.04 % ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และกราฟที่ 18 19 และ 20 เมื่อนำกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดลงในโพลีอคริลาไมด์ เจล อิเลกโตรโฟริซีส แล้วได้แถบโปรตีนแถบเดี่ยว และมีค่าอาร์เอฟแตกต่างกันคือ 0.378 0.388 และ 0.417 ตามลำดับ (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับแอคติวิตี แสดงว่า R. oryzae สร้างกลูโคอมิเลสได้ 3 ชนิดซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1978) พบว่า Rhizopus sp. สร้างกลูโคอมิเลสได้ 3 ชนิด จากการศึกษาของ Yoshino และ Hayashida (1978) พบว่าเชื้อราสามารถสร้างกลูโคอมิเลสได้หลายชนิด เนื่องจากการกระทำของโปรตีเอส (Protease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนจะย่อยเอาไกลโคเปปไตด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบบางส่วนของกลูโคอมิเลสออกไป ทำให้กลูโคอมิเลสแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน

ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อกลูโคอมิเลสแอคติวิตี กลูโคอมิเลส I II และ III มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่ 5.5 5.5 และ 4.5 ตามลำดับ (กราฟที่ 21) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Takahoshi และคณะ (1978) พบว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ Rhizopus sp. มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่ 4.5 ถึง 5.0 ส่วน Yoshino และ Hayashida (1978) พบว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ A. awamori var kawachi มีความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่ 3.8 3.8 และ4.0 ตามลำดับ

ผลของอุณหภูมิต่อกลูโค่อมิเลสแอคติวิตี กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 50°ซ (กราฟที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1978)

ความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างของกลูโคอมิเลส I II และIII ที่ความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5-6.0 4.0-5.5และ 4.0-4.5 ตามลำดับ (กราฟที่ 23) แตกต่างจากการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1978) รายงานว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ Rhizopus sp. มีความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0-8.0 ส่วน Yoshino และ Hayashida รายงานกลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ A. awamori var. kawachi มีความคงตัวต่อความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2-10, 2.5-8.5 และ 4-7 ตามลำดับ

กลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ R. oryzae มีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 50ซ (กราฟที่ 24) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Takahashi และคณะ (1978) รายงานว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ Rhizopus sp. มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50°ซ แต่ Yoshino และ Hayashida รายงานว่ากลูโคอมิเลสของ A. awamori var kawachi มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่60 40 และ 40°ซ ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อกลูโคอมิเลสแอคติวิตีแล้วนำมาหาค่าคงที่ จากกราฟของ ไลน์เวเวอร์-เบริค พบว่ากลูโคอมิเลส I II และIII มีค่าคงที่ เท่ากับ 0.37 3.33 และ 1.43 มก./มล. ตามลำดับ (กราฟที่25) แสดงว่ากลูโคอมิเลส I มีความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นได้ดีกว่ากลูโคอมิเลส III และ II ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Razzaque และ Ueda (1978) พบว่ากลูโคอมิเลสของ A. oryzae มีค่าคงที่ 2.5 2.7 และ 2.0 มก./มล.ตามลำดับ

กลูโคอมิเลสทั้งสามชนิดของ R. oryzae สามารถย่อยสลายแป้ง (soluble starch) ได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาต่างกันคือ 2 5 และ 4 ชม.ตามลำดับ (กราฟที่ 26) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Takahashi และคณะ (1978) รายงานว่ากลูโคอมิเลสทั้ง 3 ชนิดของ Rhizopus sp. สามารถย่อยสลายแป้งได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกัน

การแซคคาริฟิเคชั่นคือการเอาแป้งเชื้อที่เตรียมได้ (734 หน่วย/กรัมแป้งเชื้อ) มาย่อยแป้งในเมล็ดข้าวเหนียวให้ได้กลูโคสจากการทดลองพบว่าปริมาณความชื้นของข้าวเหนียวมีความสำคัญมาก ถ้าใส่น้ำตั้งแต่ 10 ถึง 30 %ของข้าวเหนียว จะได้กลูโคสต่ำมาก เนื่องจากการซึมละลายของกลูโคอมิเลสในแป้งเชื้อเข้าในเมล็ดข้าวเหนียวได้น้อย และความชื้นพอเหมาะต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราทำให้มีการเจริญของเชื้อรา แต่ถ้าใส่น้ำมากกว่า 50 % ของข้าวเหนียว ทำให้การแซคคาริฟิเคชั่นได้กลูโคสสูงมาก (กราฟที่27) การใช้ปริมาณแป้งเชื้อในการแซคคาริฟิเคชั่น ถ้า

ใช้แป้งเชื้อ 0.5 1.0 และ 2.0 % จะได้กลูโคสต่ำ ถ้าใช้แป้งเชื้อ 3 % ได้กลูโคส 16.17 กรัม ที่เวลา 60 ชม. แต่ถ้าใส่แป้งเชื้อ 5.0 % ใช้เวลาในการแซคคาริฟิเคชั่นเพียง 48 ชม. ได้กลูโคส 16.23 กรัม ซึ่งคิดเห็น 80 % ของข้าวเหนียว (กราฟที่ 28) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของสุกัญญา (2522) ได้รายงานว่าถ้าใช้กลูโคอมิเลสเพิ่มขึ้นจะทำให้การย่อยสลายแป้งเกิดเร็วขึ้น สำหรับอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 50°ซ ไม่มีผลต่อการแซคคาริฟิเคชั่นโดยใช้แป้งเชื้อ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ จะทำให้ได้กลูโคสลดลง (กราฟที่ 29) เนื่องจากกลูโคอมิเลสจะเสียสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°ซ (กราฟที่ 24)

การขยายสเกลการแซคคาริฟิเคชั่นให้ใหญ่ขึ้นโดยใช้ข้าวเหนียว 500 กรัมใส่ขวดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม. ใช้แป้งเชื้อ 5.0 % ใส่น้ำ 50 % สามารถย่อยสลายแป้งได้กลูโคส 80 % ของข้าวเหนียวในเวลา 48 ชม. เช่นเดียวกับการแซคคาริฟิเคชั่นในสเกลเล็ก ๆ (กราฟที่ 30) แสดงว่าการแซคคาริฟิเคชั่นสามารถขยายสเกลให้ใหญ่ขึ้นได้โดยผลการย่อยสลายแป้งได้กลูโคส 80 % ของข้าวเหนียว