บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเพื่อรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ อาจทำในบริเวณที่คาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอยู่ ซึ่งในธรรมชาติ ป่านศรนารายณ์มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ 62 เปอร์เซ็นต์ (Lock, 1969) หรือ 78 เปอร์เซ็นต์ (FAO, 1974) มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเจริญอยู่บริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ โดยเชื้อราเหล่านั้นมีการใช้เซลลูโลสจากต้นป่านศรนารายณ์เป็นแหล่งอาหาร (McBeth, 1916 ; Lock, 1969) การศึกษาในครั้งนี้ จึงเลือกทำการเก็บตัวอย่างในบริเวณที่มีการปลูกป่านศรนารายณ์ และมีการนำเอาส่วนใบของป่านศรนารายณ์มาใช้ประโยชน์ คือในบริเวณอำเภอโนนสูง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างจากวัสดุต่างๆที่คาดว่าจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น ดินบริเวณใต้ต้นป่านศรนารายณ์ เศษต้น และใบป่านศรนารายณ์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทำเชือก เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาคัดแยกเชื้อรา ตามวิธีการของ Mandels และ Sternberg (1976) ด้วยอาหารเหลวสูตร Czapex's dox สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 99 สายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ และเชื้อราปนเปื้อนอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการคัดแยกในขั้นต่อไป เพื่อให้ได้เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้จริง เพื่อจะได้นำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ต่อไป การคัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้นี้ มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการของ Hazra, Box และ Guha (1958) คัดแยกเชื้อราโดยใช้เซลลูโลส และสีที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารละลาย ZnCl เป็นตัวตรวจสอบการเกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี หรือวิธีการของ Eggins และ Pugh (1962) คัดแยกเชื้อราโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ นำตัวอย่างดินใส่ลงไป ทิ้งไว้ 5 ถึง 7 วัน สังเกตการเกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี สำหรับการคัดแยกตามวิธีการของ Hankin และ Anagnostakis (1977) ซึ่งใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการคัดแยกโดยใช้อาหารแข็งสูตร CMC agar และใช้สี congo red เป็นตัวตรวจสอบการเกิดบริเวณวงใสรอบโคโลนี เนื่องจากใน CMC agar มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนอยู่ ซึ่งจะให้สีแดงเมื่อทำปฏิกริยากับสี congo red เชื้อที่สามารถใช้ CMC ได้ จะสร้างเอนไซม์เซลลูเลสออก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาย่อยสลาย ดังนั้นเมื่อตรวจสอบด้วยสี congo red จึงไม่ติดสี หรือเกิดเป็นบริเวณวงใสรอบโคโลนี โดยที่อัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อรา ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อราในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ถ้ามีอัตราส่วนสูง แสดงว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อที่ให้อัตราส่วนนี้ต่ำ จากขั้นตอนนี้ ทำให้คัดแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งสิ้น 52 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีการของ Punnapayak และ Emert (1986) โดยใช้อาหารเหลวสูตร production ทำให้คัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่ 88 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดในบรรดาเชื้อราที่คัดแยกได้ จากผลที่ได้จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการคัดแยกเชื้อรา ตามวิธีการของ Hankin และ Anagnostakis (1977) นั่นคือ เชื้อราที่ให้อัตราส่วนระหว่างบริเวณวงใสรอบโคโลนีกับโคโลนีของเชื้อราสูง การสร้างเอนไซม์ก็ย่อมสูงด้วย ซึ่งสายพันธุ์ที่ 88 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด โดยให้ค่า FPA เท่ากับ 0.274 U/ml ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้นำเชื้อราสายพันธุ์นี้ไปศึกษาต่อโดยมีการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา และศึกษาหาภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในขั้นต่อไป

ในการศึกษาถึงการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา ตามแนวของ Barnett และ Hunter (1972) และ Domsch และ Gams (1980) โดยใช้วิธี slide culture technique ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำให้ทราบว่า เส้นใยของเชื้อรามีสีน้ำตาล แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้นแบ่งเป็นเซลล์ๆ ไม่มีการสร้าง setae และ hyphopodia conidiophores สามารถเกิดได้ทั้งที่ส่วนปลาย และด้านข้างของเส้นใย มีการสร้างสปอร์สีน้ำตาล โดยจะสร้างเป็นสายยาว แต่ละสายประกอบด้วยจำนวนสปอร์ประมาณ 6 ถึง 11 สปอร์ แต่ละสปอร์มีลักษณะคล้ายวงแหวนหลายๆวงมาเรียงซ้อนกัน และยังมีการสร้าง phialides ที่มีลักษณะคล้ายกับรูปขวดแก้วก้นกลม จึงทำให้บ่งชี้ได้ชัดเจนว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 88 คือเชื้อ Acrophialophora sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ใน class Fungi Imperfecti order Moniliales family Moniliaceae genus Acrophialophora เชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถพบได้ทั้งในดิน อากาศ และพืชหลายชนิด เช่น หญ้า ฝ้าย ข้าวโพด ต้น Euphobia spp. Carica papaya เป็นต้น ในปี 1980 Domsch และ Gams รายงานถึงการค้นพบเชื้อนี้ ในประเทศเชคโกสโลวาเกีย สิงคโปร์ ปากีสถาน อินเดีย ไนจีเรีย แอฟริกาใต้ แคนาดา อียิปต์ คองโก และสหรัฐ

อเมริกา ในประเทศอินเดีย มีรายงานว่า สามารถคัดแยกได้จากเปลือกของต้น Dalbergia (Sandhu and Arora, 1985)

เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และการใช้อาหารเสริม

จากการศึกษาถึง pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 5.5 ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้ activity ของเอนไซม์จะลดลง ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Keskar (1992) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ P. jathinellum พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์คือ 4.5 ถึง 5.5 และยังสอดคล้องกับ Sandhu และ Arora (1985) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Acrophialophora sp. และ Thielavia sp. พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือ 5.5 การที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูง ในช่วง pH ดังกล่าว อาจเนื่องมาจากเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ ซึ่งจากการสังเกตการเจริญของเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆกัน พบว่า pH ในช่วง 4.5 ถึง 5.5 เชื้อมีการเจริญดีกว่า ที่ค่า pH เริ่มต้นอื่นๆ เมื่อเชื้อมีการเจริญดี การสร้างเอนไซม์ซึ่งมีความสัมพันธ์กันโดยตรงกับการเจริญ ก็ย่อมสูงด้วย (นฤมล เรืองฤทธินนท์, 2536 ; Schafner และ Toledo, 1992) เนื่องจากเชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า FPA สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ในขณะเดียวกันก็ยังให้ค่า CMCase สูงเช่นกัน เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นที่ 5.5 ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่า pH เริ่มต้นที่ 5.0 สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

จากการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงสุด เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C จากการสังเกตการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C เชื้อมีการเจริญดีกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ Domsch และ Gams (1980) ได้รายงานถึงคุณสมบัตินี้ของ Acrophialophora sp. ว่าสามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ

14 ^{o}C ถึง 50 ^{o}C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40 ^{o}C ดังนั้น activity ของเอนไซม์จึงสูงทำนองเดียวกับเชื้อ T. viridae QM 9414 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด ที่อุณหภูมิ 25 ถึง 28 ^{o}C ถ้าเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ การผลิตเอนไซม์จะลดลง ตามลำดับ (Mandels and Sternberg, 1976) นอกจากนี้ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 ^{o}C ซึ่งเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ activity ต่ำ อาจเนื่องมาจากความไม่คงตัวของเอนไซม์ ที่สร้างขึ้นมาในขณะที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 ^{o}C (นฤมล เรืองฤทธินนท์, 2526) จากการที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ให้ค่า activity สูง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง จึงน่าจะเป็นข้อดีในการนำเชื้อนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก เช่น การหมักเอทธานอลแบบ simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ซึ่งต้องทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C (Spindler, et al., 1988)

จากการศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงสุดเมื่อใช้ MCC เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับ Masaki และคณะ (1983) และ Lin และ Wilson (1987) ที่ได้รายงานว่าแหล่งคาร์บอนชนิดที่ไม่ละลายน้ำ จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ในการชักนำให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดที่ละลายน้ำได้ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการชักนำให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ได้ แต่ไม่ค่อยดีนัก จากการทดลองจะเห็นได้ว่า MCC กระดาษกรอง และสำลีเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดที่ไม่ละลายน้ำเช่นกัน แต่เมื่อสังเกตการเจริญของเชื้อ พบว่า เมื่อใช้กระดาษกรอง และสำลี เป็นแหล่งคาร์บอน การเจริญของเชื้อไม่ดี เมื่อเทียบกับการใช้ MCC เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะการใช้สำลี การเจริญของเชื้อในช่วงแรกจะน้อยมาก อาจเนื่องมาจากโครงสร้างทางกายภาพของสำลี มีส่วนที่เป็นเส้นใยดูดซับอยู่เป็นจำนวนมาก จึงทำให้การเคลื่อนที่ของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นน้อย การสัมผัสระหว่างเชื้อกับอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเกิดน้อย ดังนั้นการเจริญของเชื้อจึงน้อยด้วย ส่วน CMC นั้น เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดที่ละลายน้ำได้ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์จึงต่ำกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ Bastawde (1992) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ A. terreus พบว่า Avicel เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อเจริญ และสร้างเอนไซม์ให้ค่า activity สูงสุด แต่จากการศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์จาก Trichoderma sp. A-001 พบว่า กระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อเจริญ และสร้างเอนไซม์ให้ค่า activity สูงสุด สูงกว่าการใช้ CMC

Avicel และสาลี เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ (Gashe, 1992) แสดงให้เห็นว่า เชื้อต่างชนิดกัน แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ก็ย่อมต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่มี MCC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม สำหรับการสร้างเอนไซม์จากเชื้อ Acrophialophora sp. และเมื่อทำการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MCC ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงสุด เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี MCC ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity ใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ activity ของเอนไซม์เริ่มลดลง จากผลที่ได้จะเห็นได้ว่า การสร้างเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนด้วย โดยปริมาณที่เหมาะสมคือ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ จะไม่มีผลในการกระตุ้นให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด นอกจากจะเป็นการสิ้นเปลืองแล้ว ยังอาจทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลงอีกด้วย ซึ่งการลดลงของ activity ของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากการยับยั้งการสร้าง และการทำงานของเอนไซม์ โดยสารผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Desrochers, Jurasek, and Koller, 1980) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Steiner และคณะ (1988) ที่รายงานว่า activity ของเอนไซม์จะลดลง เมื่อความเข้มข้นของเซลลูโลสสูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่า การลดลงของ activity ของเอนไซม์ เกิดเนื่องมาจากการจับกันระหว่างเอนไซม์เซลลูเลสกับเซลลูโลสเกิดได้ไม่ดี นอกจากนี้ Shewale และ Sadana (1978) ได้เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสต่างๆกัน พบว่าที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อ Basidomycete sp. สร้างเอนไซม์ให้ activity สูงสุด และที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ activity เท่ากับที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับเชื้อที่ทำการศึกษา ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

จากการศึกษาถึงชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ทราบว่าเชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า FPA สูงสุดเมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase สูงสุดเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อราสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปอนุมูลไนเตรทได้ดีกว่าอนุมูลอื่นๆ ในการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า FPA สูงสุด และสามารถใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า CMCase สูงสุดได้ดีกว่าไนโตรเจนในรูปอื่น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Okeke และ Obi

(1993) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Anthrographis sp. พบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ activity สูง เมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสูงกว่าการใช้ $(NH_4)_2SO_4$ peptone และ urea ในขณะเดียวกันก็สอดคล้องกับ Gomes และคณะ (1989) ที่ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Gliocladium virens พบว่าการใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนช่วยให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์สูงขึ้น นอกจากนี้ พรทิพย์ ตัณฑ์เจริญรัตน์ (2528) ยังรายงานว่าใน peptone อาจจะมีสารอาหารอื่นๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการสร้างเอนไซม์ เนื่องจากการใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ให้ค่า FPA สูงสุด ในขณะเดียวกันก็ยังคงให้ค่า CMCase สูงใกล้เคียงกับการใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงเลือกใช้ NH_4NO_3 สำหรับการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม จากการศึกษาทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี NH_4NO_3 ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น activity ของเอนไซม์เริ่มลดลง จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ก็มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราเช่นกัน Cowling และ Merrill (1966) รายงานว่าไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการสังเคราะห์โปรตีน แต่ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไป อาจมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ได้ จากการสังเกตการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการเจริญดีกว่า NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ทำนองเดียวกับ Okeke และ Obi (1993) และ Sandhu และ Arora (1985) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ Arthrographis sp. และ Acrophialophora sp. พบว่า NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์สูงกว่า NH_4NO_3 ที่ความเข้มข้นสูง ๆ

จากการศึกษาถึงการใช้อาหารเสริม ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วย casein และ soybean meal โดยให้ค่า FPA สูงสุดเท่ากับ 0.394 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย casein ความเข้มข้น 0.100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าค่า FPA ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอาหารเสริมประมาณ 1.26 เท่า และให้ค่า CMCase สูงสุดเท่ากับ 23.186 U/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย casein ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ soybean meal ความเข้มข้น 0.050 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูง

กว่าค่า CMCase ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีอาหารเสริมประมาณ 1.76 เท่า แสดงให้เห็นว่า casein และ soybean meal มีผลในการกระตุ้นให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น ในทำนองเดียวกับ Ghosh และ Kundu (1980) ที่ได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสจากเชื้อ A. terreus พบว่าการเติมธาตุอาหารเสริมประเภทสารอินทรีย์คือ casein hydrolysate (ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์) ช่วยให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.4 เท่า เนื่องจากเชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า FPA สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเสริมด้วย casein ความเข้มข้น 0.100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันก็ยังคงให้ค่า CMCase สูงเช่นกัน เมื่อเทียบกับอาหารที่เสริมด้วย casein ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ soybean meal ความเข้มข้น 0.050 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารที่เสริมด้วย casein ความเข้มข้น 0.100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป

จากการศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำให้ทราบว่าการผลิตในภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH ทำให้เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงกว่าการผลิตในภาวะที่มีการควบคุม pH ให้เป็น 5.00 ตลอดการทดลอง โดยให้ค่า FPA และ CMCase สูงกว่าประมาณ 1.03 และ 1.10 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก pH 5.00 อาจเป็น pH ที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อรา มากกว่าการสร้างเอนไซม์ จากการสังเกตการเจริญของเชื้อรา พบว่าในภาวะที่มีการควบคุม pH ให้เป็น 5.00 เชื้อรามีการเจริญดี มีการสร้างสปอร์จำนวนมาก ซึ่งเชื้อราโดยส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดจากเส้นใยที่มีอายุน้อย และในระยะที่เป็นสปอร์จะไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเลย (Norkrans, 1967) ดังนั้นการสร้างเอนไซม์จึงต่ำ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Ghosh และ Kundu (1980) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลสจากเชื้อ A. terreus พบว่าการผลิตในภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงกว่าการผลิตในภาวะที่มีการควบคุม pH เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ ในถังหมักกับในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมเหมือนกัน พบว่าการผลิตเอนไซม์ในถังหมักโดยไม่มีการควบคุม pH เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า activity สูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ โดยให้ค่า FPA และ CMCase สูงกว่าประมาณ 1.01 และ 1.06 เท่า ตามลำดับ และยังพบว่า ในช่วงแรกของการหมัก activity ของเอนไซม์ สูงกว่าการผลิตในฟลาสก์มาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในสภาพของถังหมักพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศมีมาก รวมไปถึงมีการให้อากาศและมีการกวน จึงทำให้เชื้อได้สัมผัส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กับอากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น การเจริญและการสร้างเอนไซม์จึงสูงกว่า Duff, Cooper และคณะ (1987) รายงานว่าการให้อากาศ และการกวนเป็นสิ่งจำเป็นในระหว่างการหมัก เพราะนอกจากจะเป็นการรักษาสภาพการมีอากาศเอาไว้แล้ว ยังช่วยขจัดกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมาในระหว่างการหมัก ออกไปจากภาชนะที่ใช้หมัก ช่วยให้เชื้อมีการเจริญและมีการสร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้น ส่วนการผลิตเอนไซม์ในถังหมักที่มีการควบคุม pH ให้เป็น 5.00 เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าในช่วง 3 ถึง 9 วันแรกของการหมัก เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ที่ให้ค่า FPA และ CMCase สูงกว่าการผลิตในฟลาสก์ แต่หลังจากวันที่ 9 แล้ว activity ของเอนไซม์จะต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วง 3 ถึง 9 วันแรกของการหมัก การผลิตเอนไซม์ในถังหมักซึ่งมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศมากขึ้น รวมทั้งมีการให้อากาศและมีการกวน เชื้อจึงสัมผัสกับอากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น การเจริญและการสร้างเอนไซม์จึงสูง หลังจากนั้นเชื้อราเริ่มมีอายุมากขึ้น สังเกตจากเส้นใยของเชื้อรามีน้อยลง ขณะที่การสร้างสปอร์มีมากขึ้น Korkrans (1967) รายงานว่าในระยะที่เชื้อราสร้างสปอร์ จะไม่มีการผลิตเอนไซม์เลย ดังนั้น activity ของเอนไซม์จึงต่ำกว่าการผลิตในฟลาสก์

ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในทุกการทดลองมีการตรวจสอบดูสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ที่สำคัญได้แก่ ปริมาณของโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการทดลอง

จากการติดตามวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน ในระหว่างการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ทราบว่า การสร้างโปรตีน และการสร้างเอนไซม์มีความสัมพันธ์กัน เมื่อเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณที่สูง ปริมาณของโปรตีนก็ย่อมสูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Selby (1969) และ Ryu และ Mandels (1980) ที่ได้กล่าวว่าการสร้างโปรตีนและการสร้างเอนไซม์ มีความสัมพันธ์กันโดยตรง และจากผลที่ได้ยังสอดคล้องกับ Warzywoda และคณะ (1983) และ Kawamori และคณะ (1986) ที่ได้ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ T. reesei พบว่า ในสภาพที่เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้สูง ปริมาณของโปรตีนจะสูงด้วย และจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ทราบว่า เชื้อมีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดี เมื่อ pH ในระหว่างการผลิตอยู่ในช่วง 4.62 ถึง 4.92 ทำนองเดียวกับ T. reesei ที่มีรายงานว่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อ pH ของอาหารที่เลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 แต่

จะผลิตเอนไซม์ให้ค่า activity สูงสุด เมื่อ pH ในระหว่างการผลิตเป็น 3.5 (Schafner and Toledo, 1992) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการผลิต อาจเป็นผลมาจากการสร้างสารเมต้าโบไลต์บางอย่าง ที่มีสภาพเป็นกรดในระหว่างการเจริญของเชื้อ เช่น กรดอะซิติก (Suihko and Poutanen, 1986) เป็นต้น หรือในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น การศึกษาถึง pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ การศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ และการศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน การเปลี่ยนแปลงของ pH อาจเนื่องมาจากการใช้ NH^+_4 เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับ Deschamps และคณะ (1985) ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ T. harzianum พบว่าในระหว่างการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง เนื่องจากการใช้ NH^+_4 เพื่อการเจริญ

นอกจากการศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก Acrophialophora sp. แล้ว ยังได้มีการนำเชื้อนี้ไปใช้ในการหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสมด้วย เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในการหมักร่วมกับ S. cerevisiae โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 ^oC และ 40 ^oC มี MCC และเส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นวัสดุหมัก เปรียบเทียบกับ T. reesei ซึ่งมีรายงานถึงการนำไปใช้ร่วมกับ S. cerevisiae ในการหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสม (Hagerdal and Haggstrom, 1985)

จากการหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสม ทำให้ทราบว่า ที่ภาวะในการหมักเหมือนกันการใช้ T. reesei QM 9414 ร่วมกับ S. cerevisiae ผลิตเอทธานอลได้ดีกว่าการใช้ Acrophailophora sp. ร่วมกับ S. cerevisiae ทั้งนี้อาจเนื่องจาก T. reesei QM 9414 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่า Acrophialophora sp. โดยเฉพาะเอนไซม์ β-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการหมักเอทธานอลจากเซลลูโลส โดยจะทำหน้าที่เปลี่ยน cellobiose ที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส เพื่อให้ยีสต์นำไปเปลี่ยนเป็นเอทธานอลต่อ (Christakopoulos, et al., 1990) ดังนั้นปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก T. reesei QM 9414 จึงสูงกว่าปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก Acrophialophora sp. เมื่อยีสต์นำน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปเปลี่ยนเป็นเอทธานอล ปริมาณของเอทธานอลที่เกิดขึ้นจึงสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบถึงอุณหภูมิ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ

ที่ใช้ในการหมัก ทำให้ทราบว่า ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C การผลิตเอทธานอลเกิดดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการทำงานของเอนไซม์มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C Ryu และ Mandels (1980) รายงานว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะในการทำงานอยู่ในช่วง 40 ^{o}C ถึง 60 ^{o}C ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด ดังนั้นการย่อยสลาย MCC และเส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C จึงเกิดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจึงมากกว่า ส่งผลให้ปริมาณเอทธานอลที่เกิดขึ้นสูงกว่าด้วย นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลสไปใช้สำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ด้วย Hagerdal, Berner และ Skoog (1986) รายงานว่า S. cerevisiae สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 35 ^{o}C ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เชื้อก็สามารถเจริญได้ แต่อัตราการเจริญจะลดลง ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นอกจากจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลแล้ว ยังถูกนำไปใช้สำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ในปริมาณที่มากกว่าที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C ส่งผลให้การผลิตเอทธานอลต่ำกว่าเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบการใช้ MCC และเส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว เป็นวัสดุหมัก ทำให้ทราบว่า การใช้เส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว เป็นวัสดุหมัก การผลิตเอทธานอลสูงกว่าการใช้ MCC เป็นวัสดุหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปรับสภาพเส้นใยของป่านศรนารายณ์ มีผลทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจึงสูงกว่า การผลิตเอทธานอลจึงสูงกว่าด้วย Kuhad และ Singh (1993) รายงานว่า การปรับสภาพ นอกจากจะเป็นการกำจัดลิกนิน หรือทำให้การจับตัวกันระหว่างลิกนินกับเซลลูโลสแยกออกจากกันแล้ว ยังทำให้ส่วนที่เป็นกลุ่มผลึก หรือบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสอย่างแน่นหนา เกิดการจัดเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ทำให้ง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ ส่วนโมเลกุลของ MCC นั้น พบว่าประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นกลุ่มผลึกเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการย่อยสลายโดยเอนไซม์เซลลูเลสจึงเกิดได้ช้า ปริมาณของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจึงต่ำ การผลิตเอทธานอลจึงต่ำกว่าด้วย

ในการหมักเอทธานอลครั้งนี้ได้มีการตรวจสอบดูสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ที่สำคัญได้แก่ ปริมาณน้ำตาล จำนวนเซลล์ยีสต์ และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการหมัก

จากการติดตามวิเคราะห์ ทำให้ทราบว่า ที่ภาวะในการหมักเหมือนกัน การหมักโดยใช้ T. reesei QM 9414 ร่วมกับ S. cerevisiae ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลรี

ดิวส์ มีการเกิดขึ้นและมีการนำไปใช้ในการหมักเอทธานอลได้มากกว่าการใช้ Acrophialophora sp. ร่วมกับ S. cerevisiae และจากการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในระหว่างการหมัก ยังพบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์ในการหมักเอทธานอลโดยใช้ T. reesei QM 9414 ร่วมกับ S. cerevisiae ยังสูงกว่าการใช้ Acrophialophora sp. ร่วมกับ S. cerevisiae ดังนั้นจึงอาจส่งผลโดยตรงให้เกิดการหมักเอทธานอลได้สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ในวันแรกของการหมัก จำนวนเซลล์ยีสต์ลดลงอย่างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการขาดแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญในช่วงแรก โดยเฉพาะน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา ส่วนการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการหมัก ทำให้ทราบว่า ในภาวะที่มีการหมักเอทธานอลได้สูงสุด (การหมักโดยใช้ Acrophialophora sp. ร่วมกับ S. cerevisiae และการหมักโดยใช้ T. reesei QM 9414 ร่วมกับ S. cerevisiae หมักที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C มีเส้นใยของป่านศรนารายณ์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นวัสดุหมัก) pH จะอยู่ในช่วง 4.40 ถึง 4.63 และ 4.43 ถึง 4.63 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Christakopoulos และคณะ (1990) ที่ได้ศึกษาถึงกลไกในการเปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นเอทธานอลโดยเชื้อ Fusarium oxysporum โดยศึกษาถึงผลของเอนไซม์เซลลูเลส และ β-glucosidase พบว่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอทธานอลคือ pH 4.5 ซึ่งเป็น pH ที่อยู่ในช่วง pH ของเชื้อที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ และการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก อาจเนื่องมาจากการตายของเชื้อยีสต์ ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของของเสีย และของเสียเหล่านี้อาจเป็นตัวการทำให้ pH ลดลงได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากปริมาณของเอทธานอลที่เพิ่มขึ้น หรือผลิตผลอย่างอื่นที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก เช่น กรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่ง Hagerdal และคณะ (1986) ได้ศึกษาการหมักเอทธานอลจากน้ำตาลไซโลสด้วยเอนไซม์ glucose isomerase ร่วมกับเชื้อ S. cerevisiae พบว่าการเพิ่มขึ้นของเอทธานอลและกรดอะซิติก จะเป็นตัวการทำให้ pH ในระหว่างการหมักลดลง

จากการหมักเอทธานอลที่ได้แสดงให้เห็นว่า Acrophialophora sp. ซึ่งคัดแยกได้จากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ สามารถนำมาใช้ในการหมักเอทธานอลร่วมกับเชื้อยีสต์ได้โดยให้ปริมาณของเอทธานอลสูงพอสมควร เมื่อเทียบกับ T. reesei แต่เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงการนำเชื้อ Acrophialophora sp.ไปใช้ในการหมักเอทธานอลแบบเชื้อผสมร่วมกับเชื้อยีสต์ โดยยังไม่ได้มีการศึกษาถึงสภาวะแวดล้อม หรือปัจจัยอื่นๆ ที่จะมีผล

ต่อการหมักเอทธานอลมาก่อน ดังนั้นจึงน่าที่จะได้มีการนำเชื้อนี้ไปศึกษาถึงสิ่งเหล่านี้ เพื่อจะได้ช่วยปรับปรุงผลผลิตของเอทธานอลให้สูงขึ้น ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทธานอลต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย