บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ซึ่งได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น โดย สุวรรณา นพพรพันธ์ (2538) โดยวิธีฉายแสงอัลทร้าไวโอเลตร่วมกับเอน-เมธิล-เอน-ไนโตร-เอน-ไนโตรโซกัวนิดีน จากเชื้อตั้งต้น *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ซึ่งแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531) โดยมีจุดประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสปริมาณมากขึ้น และทำการศึกษาการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับถังหมักเบื้องต้น

1. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14

โดยเริ่มศึกษาจากการหาวัตถุดิบมาเป็นสับสเทรตที่เหมาะสม โดยเป็นที่ทราบกันแล้วว่าเดกซ์-แทรนทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนเนส ในสูตรอาหารดังหลายๆ รายงาน เช่น Fukumoto และคณะ (1970); Simonson และ Liberta (1975); Hattori และ Ishibashi (1981); Koenig และ Day (1988) ได้เลือกใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย จึงเป็นวัตถุดิบที่โรงงานน้ำตาลมีสนับสนุนตลอด ไม่จำเป็นต้องซื้อและเพิ่มต้นทุน จากตัวอย่างกากน้ำตาลที่เก็บมาทดสอบพบว่าแต่ละตัวอย่างมีลักษณะความหนืดแตกต่างๆกันไป แต่ทุกตัวอย่างมีความหนืดมากไม่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยตรงหากไม่ทำการเจือจางเสียก่อน โดยจากตัวอย่างกากน้ำตาลจังหวัดกาญจนบุรีที่เลือกใช้ มีปริมาณเดกซ์แทรนเจือปนอยู่ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มากแต่ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง ต้องมีการเจือจางเป็นร้อยละ 1.5 โดยปริมาตรด้วยน้ำกรอง แล้วจึงนำมาใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อ ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเดกซ์แทรน 0.60 กรัมต่อลิตร จากข้อมูลเดิมว่าปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมคือร้อยละ 1.0 (โดยน้ำหนัก) ต้องเติมเพิ่มด้วยด้วยเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมปริมาณ 0.94 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ดังเห็นได้ว่าสามารถประหยัดเดกซ์แทรนลงได้ร้อยละ 6 แต่เมื่อพิจารณาถึงราคาเดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ขายในเชิงพาณิชย์ (1,000 กรัมต่อ 10,000 บาท, บริษัท Sigma) พบว่าสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้ 6 บาทต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ซึ่งจะคุ้มทุนมากขึ้นถ้าผลิตในปริมาณที่มากถึงระดับอุตสาหกรรม และเมื่อพิจารณาถึงแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิมพบว่าให้ค่ามากกว่าถึงร้อยละ 43 แสดงให้เห็นว่าแม้จะมีปริมาณเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย แต่มีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้เชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 สามารถผลิต

เดกซ์แทรนเนสออกมาได้มาก ซึ่งอาจเป็นเพราะในกากน้ำตาลของอ้อยนั้นมีวิตามิน เกลือแร่ และปัจจัยเร่งการเจริญเติบโตสูงดังแสดงในตารางที่ 2.5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bae และ Shoda ,2005; Rao และ Panda, 1993; Doelle และ Doelle, 1990 ซึ่งนอกจากการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว กากน้ำตาลยังเป็นวัตถุดิบราคาถูกซึ่งมีสารอาหาร วิตามิน เกลือแร่ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย และพบว่าปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเหมือนสูตรอาหารฟุกุโมะโตะที่ปรับปรุงโดยเอก แสงวิเชียร (2531) เพราะเมื่อเพิ่มปริมาณเดกซ์แทรนเป็นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลงเพราะมีความหนืดมากขึ้นส่งผลต่อปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยลง ตรงข้ามกับรายงานของ Addel-Naby และคณะที่พบว่าปริมาณเดกซ์แทรนที่เหมาะสมที่สุดสามารถมากถึงร้อยละ 3.5 (โดยน้ำหนัก)

ขั้นต่อไปคือการเลือกแหล่งไนโตรเจน พบว่าในกากน้ำตาลจากอ้อยมีแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เพียงพอต่อการให้ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเดกซ์แทรน-เนส เพราะแอคติวิตีเมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนใดๆน้อยกว่าเมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมประมาณ 10 เท่าเมื่อเทียบกับมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องทดลองหาแหล่งไนโตรเจน ทั้งที่อยู่ในรูปของไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์พบว่าสารสกัดจากยีสต์ และ โซเดียมไนเทรต ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสดีที่สุดเหมือนกับสูตรอาหารฟุกุโมะโตะที่ปรับปรุงโดยเอก แสงวิเชียร เนื่องจากเชื้อสามารถใช้สารทั้งสองได้เร็วและง่ายกว่าสารอื่นๆ ในขณะที่เกลือแอมโมเนียมและไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น พอลิเปปโทน และ ทริปโทน กลับให้แอคติวิตีลดลง รวมถึงเชื้อโดยทั่วไปจะใช้ไนโตรเจนอินทรีย์เร็วและง่ายกว่าอนินทรีย์ (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2535) จะเห็นได้ว่าราแต่ละชนิดจะมีลักษณะชอบแหล่งของไนโตรเจนต่างๆกันไปในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ดังเช่นรายงานของ Fukumoto และคณะ(1971) รายงานว่าโซเดียมไนเทรตและเปปโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของ *Aspergillus carneus* Tsuru และคณะ (1971) รายงานว่าสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เช่นเปปโทน และน้ำแช่ข้าวโพด เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของ *Penicillium luteum* ATCC 9644 นอกจากนี้ในการทดลองนี้ได้นำกากถั่วเหลืองป่นซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่หาง่ายราคาถูกมาเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณเดกซ์แทรนเนสได้ เมื่อทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารสกัดจากยีสต์และโซเดียมไนเทรตพบว่าเท่ากับ 75:25 ซึ่งแตกต่างจากสูตรอาหารฟุกุโมะโตะเดิมซึ่งใช้อัตราส่วนเท่ากัน (ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก) อาจเป็นเพราะเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตและสร้างเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น ทำให้มีการใช้สารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้ง่ายมากขึ้น รวมถึงสารสกัดจากยีสต์มีสารประกอบเกลือแร่ วิตามินที่ละลายน้ำได้ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรตและเปปไทด์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างเอนไซม์ (Sikyta,1983) ความต้องการของเชื้อจึงมากขึ้นกว่าเดิม

จากวิทยานิพนธ์ของเอก แสงวิเชียร (2531) พบว่าสารไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโปแทสเซียมคลอไรด์เป็นเกลือแร่สำคัญ ที่มีความจำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารสูตรฟุกุโมะโตะ เพื่อส่งเสริมการสร้างเดกซ์แทรนเนส เพราะหากไม่เติมจะทำให้ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 สร้างเดกซ์แทรนเนสมีแอคติวิตีลดลงต่ำจากปรกติมาก งานวิจัยนี้จึงใช้สารทั้งสองนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป สำหรับแมกนีเซียม (II) และ เหล็ก (II) อิออนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนส ซึ่งคาดว่าอาจมีในกากน้ำตาลอยู่แล้ว จึงทดลองหาปริมาณที่เหมาะสม โดยพบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักให้แอคติวิตีสูงสุดซึ่งเท่ากันกับสูตรอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุง โดยที่เฟอร์รัสซัลเฟตนั้นพบว่าเติมหรือไม่เติมนั้นให้ค่าแอคติวิตีที่ใกล้เคียงกันมาก จึงเลือกที่จะไม่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อความประหยัด อย่างไรก็ตามปัจจัยหลักที่สำคัญสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อรา มักจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนอันได้แก่เดกซ์-แทรน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมมากกว่า Tsuru และคณะ (1971); Fukumoto และคณะ(1971)

2. การปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

สำหรับการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ในระดับขวดเขย่านั้น พบว่าเชื้อรามีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่างกัน โดยความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 อยู่ที่ 4.0 ซึ่งอยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อราโดยทั่วไป ต่างจากรายงานของผู้วิจัยอื่นเช่น Fukumoto และคณะ (1971) และ Madhu และ Prabhu (1984) ซึ่งรายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.0 และ Simonson และคณะ (1975) รายงานไว้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 เหมาะสมสำหรับเจริญเติบโตและสร้างเดกซ์แทรนเนสของ *Fusarium moniliforme*

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อทั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนส ซึ่งการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิคงที่ 30 องศาเซลเซียสให้ค่าแอคติวิตีไม่แตกต่างกันนัก และเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและสร้างเดกซ์แทรนเนสของเชื้อสายพันธุ์นี้ แต่เนื่องจากจำเป็นต้องศึกษาต่อในระดับถังหมักจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับการทดลองต่อไป โดยเมื่ออุณหภูมิขึ้นไปถึง 35 องศาเซลเซียสอัตราการสร้างเดกซ์-แทรนเนสจะลงต่ำ หากถึง 40 องศาเซลเซียสพบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจะลดลงประมาณ 10 เท่า ทั้งนี้ราสายพันธุ์นี้จึงจัดเป็นพวกมีโซไฟล์ จึงไม่สามารถเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูงได้ เช่นเดียวกับ

เชื้อราอื่นๆที่เคยมีรายงานไว้ว่าผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมินี้หรือใกล้เคียง (Webb และ Spencer-Martins, 1983; Tsuru และคณะ 1971; Fukumoto และคณะ, 1971; Joshi และ Tamhane, 1975; Simon และ Liberta, 1975; Madhu และ Prabhu (1984); Kosaric และคณะ, 1973)

ค่าความเร็วรอบในการเขย่าขวดเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างในการเจริญเติบโต และการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อรา เนื่องจากในขวดเพาะเลี้ยงไม่มีให้อากาศโดยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ใดๆลงไป จึงอาศัยการเขย่าเพื่อให้อากาศได้เข้าผ่านเข้ามาทางจุกสำลี (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2535) และมีการกระจายตัวอย่างทั่วถึงในน้ำหมัก โดยพบว่าที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 และ 250 รอบต่อนาที เชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุดเพราะมีออกซิเจนในน้ำหมักกระจายตัวอย่างทั่วถึงเพราะมีแรงเขย่ามากเพียงพอ เนื่องจากแอคติวิตีออกมาใกล้เคียงกันสำหรับการทดลองต่อไปจึงเลือกความเร็วรอบในการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเพื่อความสะดวก พบว่าเมื่ออัตราการเขย่าต่ำลงทำให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลงตามระดับเนื่องเพราะมีออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยลง ซึ่งตรงกันกับที่มีรายงานอื่นๆ เช่น Tsuru และคณะ 1971; Fukumoto และคณะ, 1971 ที่ใช้อัตราความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาทีหรือใกล้เคียง แต่ตรงกันข้ามกับ Abdel-Naby และคณะ (1998) ซึ่งเลี้ยงเชื้อ *Penicillium funiculosum* 258 ที่ภาวะนิ่ง (Static cultivation) แต่ให้แอคติวิตีสูงกว่าเมื่อทำการเขย่า

จากการศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตเดกซ์แทรนเนสของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ สามารถให้การเจริญเติบโตสูงสุดที่ 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นแล้วการเจริญเติบโตของเชื้อจะเริ่มคงที่จนเริ่มลดลงในวันท้ายของการเลี้ยงเชื้อคือวันที่ 7 ในขณะที่ปริมาณเดกซ์แทรนเนสจะเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ 6 และคงที่ต่อเนื่องถึงวันที่ 7 หลังจากนั้นแล้วแอคติวิตีจะเริ่มลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่เอก แสงวิเชียร (2531) ได้เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่ามีการลดลงควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตเนื่องจากมีการใช้โปรตีน แต่ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้ทีเพียงเดกซ์แทรนเนสเท่านั้น ยังมีสารประกอบโปรตีนอื่นๆจากเซลล์ในกรณีที่เซลล์มีการแตก และยังรวมถึงปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในกากน้ำตาลจากอ้อยด้วย สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลองพบว่าเพิ่มจากเริ่มต้นที่ 4.0 และเพิ่มเป็น 5.5 ในวันที่สามของการเพาะเลี้ยงก่อนปรับขึ้นเป็นประมาณ 6.0 ในวันที่หกและเจ็ดซึ่งเป็นวันท้ายของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ของการเจริญ (ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง) และการสร้างเดกซ์-แทรนเนสของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 แล้วพบว่าการสร้างเดกซ์แทรนเนสสูงสุดมิได้

เกิดขึ้นในช่วงเดียวกันกับการเจริญเติบโตสูงสุด โดยพบว่าช่วงที่มีเอนไซม์สูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อ จะเป็นช่วงหลังของการเจริญเติบโตซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก การสลายตัวของเซลล์ในช่วงปลาย Stationary หรือช่วง death phase ทำให้เอนไซม์บางส่วนถูกปลดปล่อยออกมา จึงตรวจพบเดกซ์-แทรนเนสออกมาสูงสุดที่วันที่ 6 อาจมีประเด็นอื่นเช่นพบเดกซ์แทรนเนสที่อาจอยู่ในรูป cell bound ดังรายงานของ Zevenhuizen (1968) เมื่อเกิดการแตกของเซลล์ เดกซ์แทรนเนสจึงถูกปลดปล่อยออกมาด้วยเหตุผลดังกล่าว ทำให้สามารถตรวจพบปริมาณเดกซ์แทรนเนสสูงในช่วงหลังของการเจริญเติบโต สำหรับระยะเวลาที่เชื้อราในรายงานต่างๆใช้ผลิตเดกซ์แทรนเนสสูงสุด แสดงไว้ในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตเดกซ์แทรนเนสเมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	รายการอ้างอิง	ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาที่ใช้ (วัน)
Aspergillus carneus	Fukumoto และคณะ (1971)	8.5	28 ในสองวันแรกและปรับเป็น 25	6-7
Aspergillus luchvansis	Joshi และ Tamhane (1975)	6.0	28	4
Fusarium moniliforme	Simonson และ Liberta (1975)	8.0	30	14
Penicillium funiculosum	Kosaric และคณะ (1973)	6.0	25-28	5
Penicillium funiculosum 258	Abdel-Naby และคณะ (1998)	6.0	30	7
Penicillium luteum	Tsuru และคณะ (1971)	6.0	30	5
Penicillium sp. สายพันธุ์ 61	เอก แสงวิเชียร (2531)	6.0	30	6
Penicillium aculeatum	Madhu และ Prabhu (1984)	6.5	30	5-6
Lipomyces starkeyi	Webb และ Spencer-Martins (1983)	2.5–4.0	25-30	70 – 100 ชั่วโมง
Penicillium sp. สายพันธุ์ SMCU3-14	งานวิจัยนี้	4.0	30	6

จากการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 พบว่าจากรูปแบบการเจริญเชื้อมีการเจริญเติบโตช่วงทวีคูณในระหว่างชั่วโมงที่ 24-48 โดยมีค่าจำเพาะของการเจริญเติบโต (μ) ในช่วงนี้เท่ากับ 0.0487 ต่อชั่วโมงซึ่งมากกว่าช่วงอื่นของการเจริญ โดยหลังจากชั่วโมงดังกล่าวเชื้อจึงมีการเจริญเติบโตลดลง ช่วงนี้จึงเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุด เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากถังหมักในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้เชื้อในชั่วโมงที่ 36 (1.5 วัน)

3. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับขยายขนาดในถังหมัก

ตามปรกติแล้วลักษณะการเจริญทางกายภาพของเชื้อในระดับถังหมัก ควรมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า แต่มีปัจจัยบางประการที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่จะใช้เลี้ยงในถังหมักว่าควรเป็นระบบค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น หรือคงที่ตลอดการทดลอง เพราะเกี่ยวเนื่องกับระบบการควบคุมซึ่งต้องเพิ่มต้นทุนในการผลิต รวมไปถึงปริมาณการให้อากาศ และการปั่นกวนที่เหมาะสมในถังหมักเนื่องจากลักษณะการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าไม่เหมือนกับในระดับถังหมัก

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาปัจจัยทางกายภาพของถังหมักที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสออกมามีแอคติวิตีสูงที่สุด โดยใช้ถังหมักขนาดห้องปฏิบัติการขนาด 1 ลิตร มีปริมาตรน้ำหมัก 500 มิลลิลิตร ใช้ใบพัดกวนแบบ Disc turbine ต่อท่อให้อากาศลงสู่ใต้ใบพัดกวน เพื่อเป็นต้นแบบในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ใช้กล้าเชื้อตั้งต้นโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับปรุง โดยขูดสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^7 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร ลงในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนนำมาถ่ายลงอาหารในถังหมัก โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 (โดยปริมาตร) (25 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ 475 มิลลิลิตร)

เริ่มต้นจากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำหมักสำหรับการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการควบคุมให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ตลอดการทดลองที่ 5.0 ให้แค่แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลองโดยมีแอคติวิตีประมาณ 240 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 4.0 และปล่อยอิสระจนจบกระบวนการหมักเชื้อจะให้แอคติวิตีในวันที่ 7 เท่ากับ 193.4

หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปได้ว่าภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา และการผลิตเดกซ์แทรนเนสอยู่ที่ 5.0 ซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ในกระบวนการผลิตระดับขวดเขย่า ตามรายงานของ Denison (2000) พบว่าความสำคัญของความเป็นกรด-ด่าง เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนหลายตัวในเชื้อรา ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.0 อาจเหมาะสมกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเดกซ์แทรนเนสมากกว่าการปล่อยให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักเปลี่ยนแปลงไปตามภาวะการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้ออาจมีการปลดปล่อยสารอินทรีย์ออกมาในระหว่างการเจริญ (สมใจ ศิริโภค, 2537) ซึ่งทำให้ความเป็นกรด-ด่างในน้ำหมักไม่ใช่ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

Sangeetha และคณะ (2005) เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในการผลิตฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับขวดเขย่ามีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.5 แต่ในระดับถังหมักใช้การควบคุมให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างคงที่ที่ 5.0 โดยค่า $Y_{P/S}$ (ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อคิดจากฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นต่อซูโครสที่ใช้ไป) คือ 1.5016 ซึ่งหมายความว่าซูโครส 1 โมล สามารถผลิต ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ ได้ 1.5016 โมล ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบในการทดลองที่มีการคงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยซูโครสปริมาณเท่ากัน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้ เชื้อนำไปใช้ในการเป็นสารชักนำการเกิดฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ได้เร็วที่สุด

Bull และ Bushell (1976) รายงานเกี่ยวกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารเมแทบบอไลต์ของเชื้อราที่สร้างที่สร้างสายใย ถึงแม้การควบคุมอุณหภูมิจะเป็นสิ่งที่ทำได้ง่ายมากที่สุดในกระบวนการหมัก แต่การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในการหมักอาจส่งผลทำให้ภาวะต่างๆในการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนตามได้ด้วย เช่นการเพิ่มของอุณหภูมิในภาวะที่เชื้อราสามารถเจริญได้ เป็นการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและค่า Q_{10} (ค่าที่เกิดขึ้นเมื่อมีอัตราการตายของเซลล์หากมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส) ให้มากขึ้น ค่าออกซิเจนละลายน้ำก็ลดลงด้วยหากมีการเพิ่มอุณหภูมิ รวมไปถึงสารอาหารและค่าความเป็นกรด-ด่าง เชื้อราแต่ละชนิดจึงมีภาวะที่เหมาะสมต่างกันไปในการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

จากการวิจัยพบว่าที่อุณหภูมิตลอดการทดลอง 25 องศาเซลเซียส เชื้อมีอัตราการเจริญน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.1460 และ 0.1620 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งสอดคลองกับการผลิตในระดับขวดเขย่าของงานวิจัยนี้ และงานวิจัยของเอกแสงวิเชียร (2531); สุวรรณา นพพรพันธ์ (2538) ซึ่งรายงานว่าเชื้อรา *Penicillium* sp. สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเมื่อมีอุณหภูมิลดลงกว่านี้ แอคติวิตีและการเจริญจะลดลง ในขณะที่เมื่อทำการทดลอง ณ อุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 35 องศาเซลเซียสกลับทำให้อัตราการเจริญและการสร้าง

เดกซ์แทรนเนสลดลงอย่างมาก โดยมีค่าจำเพาะของการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.1111 ต่อชั่วโมง และในวันสุดท้ายของการหมักผลิตเดกซ์แทรนเนสได้เพียง 85.1 หน่วยต่อมิลลิลิตรเท่านั้น เทียบกับที่ 30 องศาเซลเซียสเชื้อสร้างเดกซ์แทรนเนสได้ 245.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร

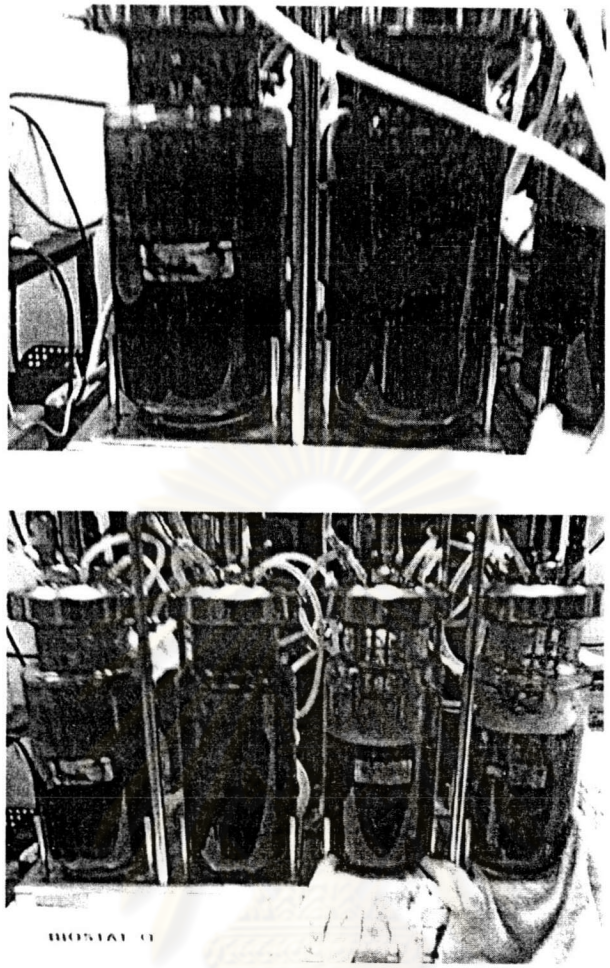
การศึกษาความเหมาะสมของปริมาณอากาศที่เข้าสู่ถังหมักที่เหมาะสม โดยปรกติแล้วออกซิเจนถือเป็นปัจจัยหลักในกระบวนการหมักที่สามารถจำกัดประสิทธิภาพของการหมักได้ หากไม่สามารถทำให้ออกซิเจนละลายอยู่ในน้ำหมัก และมีการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ได้อย่างเพียงพอ ในระหว่างการหมัก ซึ่งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำนี้สามารถส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์จากเซลล์ การแตกของเซลล์ สัณฐานของเซลล์ และอื่นๆ (Cui และคณะ, 1998a,b) จากการทดลองพบว่าปริมาณอากาศที่ให้เข้าสู่ถังหมัก 2 vvm ซึ่งมากที่สุดที่ถังหมักรุ่น Biostat Q สามารถให้ได้ ทำให้ได้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในวันที่ 7 ของการทดลองเท่ากับ 253.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการทดลองที่ให้ออกซิเจนน้อยกว่านี้ โดยพบว่ายิ่งให้ออกซิเจนน้อยลง การผลิตเดกซ์แทรนเนสของเซลล์ก็น้อยลงด้วย แสดงให้เห็นว่า ออกซิเจนถือเป็นปัจจัยหลักควบคุมการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 หากพิจารณาถึงปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำหมักพบว่า ทุกการทดลองในช่วงวันที่ 0-1 จะมีปริมาณออกซิเจนในน้ำหมักอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และค่าจำเพาะของการเจริญเมื่อมีการให้อากาศ 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 vvm ได้แก่ 0.1504, 0.1572, 0.1580 และ 0.1538 ต่อชั่วโมง ตามลำดับในวันแรกของการหมัก ซึ่งถือว่าไม่มีความแตกต่าง แต่เมื่อมีการเจริญของเซลล์ในวันที่ 2 ขึ้นไป เมื่อเซลล์เจริญขึ้นแต่มีปริมาณอากาศในน้ำหมักไม่เพียงพอ พบว่าออกซิเจนมีผลอย่างชัดเจนทำให้มีการเจริญและการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นได้ การทดลองที่ให้อากาศ 0.25 vvm เข้าสู่ถังหมัก ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพียง 117.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่านั้น โดยปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10 อย่างรวดเร็วเมื่อขึ้นชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ซึ่งถึงแม้ให้อากาศมากที่สุดแล้วแต่ก็พบว่าแอคติวิตีที่ได้สูงสุดมีแค่ 253.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งในวันที่ 5 ของการหมักมีปริมาณออกซิเจนเหลืออยู่เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ซึ่งความต้องการออกซิเจนของราสายพันธุ์นี้อาจมากกว่านี้ จากรายงานของ Wongwicharn และคณะ (1999); Rothberg และคณะ (1999); Kreiner และคณะ (2000) พบว่าออกซิเจนเป็นแหล่งให้พลังงานกับเชื้อจุลินทรีย์ และสามารถทำให้เกิดการเจริญเติบโตและผลิตโปรตีนต่างๆของเซลล์ลดลงได้ หากมีออกซิเจนไม่เพียงพอ Bai และคณะ (2004) พบว่าการให้ออกซิเจนที่มากเพียงพอจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน respiratory pathway และส่งผลทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนมากขึ้น แต่ถังหมักและอุปกรณ์ที่ใช้อยู่ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถให้อากาศได้มากกว่านี้ เพราะหากกำหนดค่าคงที่ที่ต้องการ (set point) ของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำลงไป ส่วนควบคุมของเครื่องจะพยายามเพิ่มความเร็วของ

อัตราใบพัดกวนโดยอัตโนมัติเพื่อให้ค่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำขึ้นไปอยู่ ณ จุดที่ต้องการ ทำให้เกิดการปั่นอย่างรุนแรงมาก เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้

น้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้ของเชื้อในการทดลองต่างๆ ในช่วงแรกเริ่มต้นของการหมักเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดในทุกการทดลอง แต่ในช่วงกลางของการหมักเป็นต้นไป พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งกลับค่อนข้างจะคงที่โดยมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งปัญหาที่เกิดขึ้นในถังหมักคือเกิดการเจริญของเชื้อราข้างถังหมักปริมาณมาก (wall growth) โดยมีการเจริญสะสมขึ้นตลอดทุกวันของการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองนั้นเห็นได้ชัดว่าปริมาณเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลไมรีดิวซ์ซึ่งแทนปริมาณเดกซ์แทรนก็ลดลง แสดงว่ามีการเจริญเกิดขึ้นจริงในถังหมัก แต่ไม่สามารถวัดออกมาได้อย่างถูกต้อง เพราะการเจริญที่เกิดขึ้นนั้นเกาะรอบถังหมัก ทั้งในส่วนที่เหนือน้ำหมักและใต้พื้นผิวน้ำหมัก รวมไปถึงมีการเกาะรอบอุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และวัดปริมาณออกซิเจนละลายน้ำด้วย (รูปที่ 5.1) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ถูกเก็บมาตรวจสอบนั้นมาจากน้ำหมักเท่านั้น ไม่ได้มาจากเซลล์ที่เจริญบริเวณอื่น ทำให้ที่วัดออกมามีความคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง นอกจากนี้แล้วยังพบว่าสายใยเชื้อราบางส่วนได้มีการเจริญรอบท่อส่งอากาศ (Air sparger) ด้วย และการเกาะของเซลล์หนารอบถังหมัก ทำให้เกิดปัญหาด้านการถ่ายเทมวลสาร เดกซ์แทรน และออกซิเจน ทำให้ราที่เกาะสะสมนั้นไม่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้อีกต่อไป

ในการเลี้ยงรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ในระดับขวดเขย่านั้นพบว่าเกิดการเจริญรอบขวดเป็นเส้นวงกลมเช่นกัน แต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ไม่กระทบต่อเซลล์ส่วนใหญ่ซึ่งอยู่ในน้ำหมัก (รูปที่ 5.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



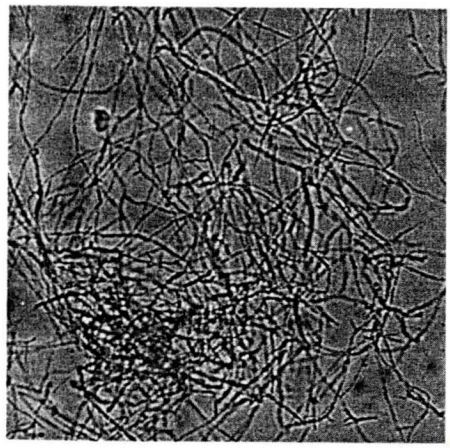
รูปที่ 5.1 การเจริญการเจริญรอบข้างถังหมักของรา (Wall growth) ในขณะผลิตเดกซ์แทรนเนส (ถังหมักรุ่น Biostat Q, B Braun, เยอรมันนี)

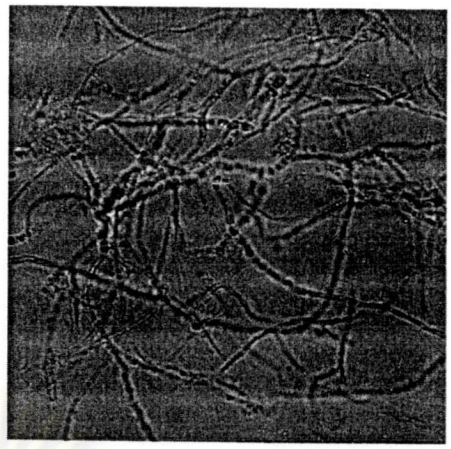
รูปที่ 5.2 การเจริญการเจริญรอบข้างขวดเพาะเลี้ยงของรา (Wall growth) ในขณะผลิตเดกซ์แทรนเนส

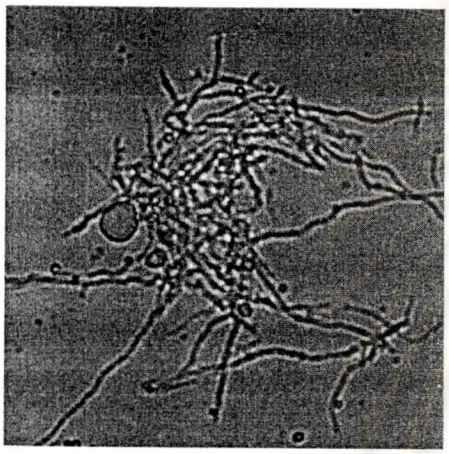
ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักจะมีมากขึ้นกว่านี้ได้ หากมีการใช้แก๊สออกซิเจนบริสุทธิ์เป็นแหล่งออกซิเจนโดยตรง แต่วิธีการนี้ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระดับขยายขนาดอุตสาหกรรมจริงได้ เนื่องจากมีต้นทุนที่สูงมาก

หลังจากที่พบว่าปริมาณอากาศที่ให้เข้าสู่ถังหมักมากที่สุดคือ 1 vvm ไม่สามารถทำให้ได้เดกซ์แทรนเนสมากกว่านี้ จึงทำการทดลองหาอัตราการปั่นกวนของใบพัดที่เหมาะสมต่อไป เนื่องจากการปั่นกวนสามารถทำให้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักมีขนาดอนุภาคที่เล็กลงและสามารถแทรกซึมเข้าไปได้ทั่วถึงมากกว่าในน้ำหมัก การปั่นกวนที่มากขึ้นจะทำให้ส่งผลทั้งสัณฐานของรา (Amanullah และคณะ, 1999, 2000; Cui และคณะ 1998a,b) และการถ่ายเทมวลสารในถังหมัก (mass transfer) (Badino และคณะ 2000; Li และคณะ, 2002) ในการหมักเชื้อรานั้น อัตราการปั่นกวนที่เหมาะสมและเพียงพอมีความจำเป็นต่อการผสมกันของเชื้อรา อากาศและอาหาร ให้เข้ากันได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อรามีการเจริญในอาหารที่มีความหนืดสูงและเป็นแบบนอนนิวโตเนียน อย่างไรก็ตามแรงกลที่เกิดขึ้นในถังหมัก คือแรงเฉือนที่เกิดจากใบพัดกวนอาจทำให้สายใยของราถูกทำลายลงได้ ทำให้อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ลดลงลดลง

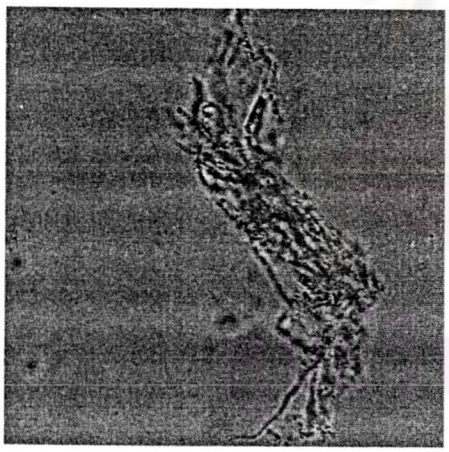
จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพิ่มความเร็วรอบของอัตราการปั่นกวนของใบพัดจาก 200 ไปจนเป็น 300, 400 และ 500 รอบต่อนาทีทำให้ค่าจำเพาะการเจริญเติบโตในช่วงแรกของการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0.1541 เป็น 0.1587, 0.1709 และ 0.1745 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งตรงตามสมมติฐานที่ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนของใบพัดจะทำให้เกิดการกระจายตัวของออกซิเจนในน้ำหมักมากขึ้น โดยดูได้จากร้อยละปริมาณออกซิเจนละลายน้ำที่มีในน้ำหมัก ทำให้เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้มากขึ้น โดยพบว่าการผลิตเดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ก็เพิ่มขึ้นตามออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่อัตราการปั่นกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที สามารถให้เดกซ์แทรนเนสได้มากที่สุดเท่ากับ 296.6 รอบต่อนาที ในขณะที่เมื่อความเร็วรอบขึ้นไปเป็น 500 รอบต่อนาทีกลับทำให้เดกซ์แทรนเนสถูกผลิตออกมาน้อยลงเหลือแค่ 229.6 หน่วยต่อนาทีเท่านั้น


(1)


(2)


(3)

(4)


(5)

รูปที่ 5.3 ลักษณะสัณฐานของรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เมื่อทำการหมักที่อัตราความเร็วรอบใบพัดกวนต่างกัน ในวันที่ 5 ของการหมัก (ขยายขนาด 400 เท่า)

(1) ลักษณะเส้นใยของราเมื่อเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

(2) ลักษณะเส้นใยของราเมื่อเลี้ยงในถังหมัก ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

(3) ลักษณะเส้นใยของราเมื่อเลี้ยงในถังหมัก ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

(4) ลักษณะเส้นใยของราเมื่อเลี้ยงในถังหมัก ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที

(5) ลักษณะเส้นใยของราเมื่อเลี้ยงในถังหมัก ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที

ตามที่แสดงในรูปที่ 5.3 พบว่าเมื่อเลี้ยงราในระดับขวดเขย่า มีการปั่นกวนโดยการเขย่าขวดไม่มีอุปกรณ์ใดๆในน้ำหมัก ลักษณะสายใยจะยาวยืดออกไป โดยไม่หักเป็นช่วงๆ และให้แอคติวิตีสูงถึงประมาณ 640 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อนำมาผลิตในถังหมักแล้ว ลักษณะสายใยจะสั้นลงเมื่อมีการเพิ่มอัตรากวนของใบพัดกวนขึ้น โดยแม้ที่ 200 รอบต่อนาทีสายใยยังกระจายอยู่แต่แอคติวิตีกลับตกลงเหลือเพียง 260 หน่วยต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเร็วมากขึ้นสายใยมีแนวโน้มจับกันเป็นกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มากขึ้น และสายใยมีความยาวลดลง โดยให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพิ่มมากสุดที่ 400 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดเพราะที่ 500 รอบต่อนาที สายใยมีการขาดเป็นเส้นสั้นและแอคติวิตีลดลง แสดงว่าแม้ว่าออกซิเจนจะเพิ่มมากขึ้นแต่เมื่อสายใยมีการเปลี่ยนแปลงไปก็สามารถลดการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้

จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่ารา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ดีเมื่อมีอากาศเพียงพอและสายใยของรามีความยาว (ในระดับขวดเขย่า) เมื่อสายใยของราสั้นลง และถูกจำกัดด้วยปริมาณออกซิเจน จะทำให้มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสลดลง Vecht-Lifshitz และคณะ (1990) กล่าวว่า ในการผลิตสารแมทาบอไลต์จากรา ผลิตภัณฑ์แต่ละอย่างต้องการสัณฐานของราที่ต่างกัน เช่น ในการผลิตเพนิซิลลินจาก *Penicillium chrysogenum* นั้นต้องการสายในยาว แต่การผลิตกรดซิทริกจาก *Aspergillus niger* ต้องใช้ราในรูป pellet เป็นต้น จากการทดลองอาจจะแสดงให้เห็นว่ารา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ต้องใช้สายใยยาวในการผลิตเดกซ์แทรนเนส อย่างไรก็น้ำในน้ำหมักที่การเจริญของเชื้อที่มีสายใยยาวจะมีความหนืดของน้ำหมักสูงและมีการไหลแบบนอนนิวโตเนียน (Harvey และ McNeil, 1994) ฉะนั้นเพื่อลดปัญหาการเกิดการรบกวนการเจริญของสายใยในถังหมัก และปัญหาการกระจายตัวของออกซิเจนไม่เพียงพอในถังหมัก การวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ถังหมักชนิดอื่น เช่น ถังหมักแบบแอร์ลิฟต์ (Air-lift fermentor) (Moo-Young และคณะ, 1987)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย