รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
KASETSART UNIVERSITY RESEARCH REPORT

TP
416
T3
n271

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
KASETSART UNIVERSITY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

รายงานผลการวิจัยประจำปี 2532

โครงการวิจัยรหัส ท-ฉ 3.5.32(8)

การผลิตอาหารเสริมที่มี lysine สูง จากมันสำปะหลัง

High - lysine Feed supplement from Cassava

ผศ.ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช

ผศ. นภา โล่ห์ทอง

ผศ.ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง

ดร. เลอลักษณ์ จิตรดถิน

Vichien Kitpreechavanich

Napha Lotong

Savitree Limtiog

Lerluck Jitdon

ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of microbiology Kasetsart University

Abstract

Eleven strains of isolated Aspergillus and 3 strains of Rhizopus which were proved to have high potency in raw cassava starch hydrolysis were shown to be able to produce pectinase. Strain no. 26R which were previously identified to be Rhizopus sp. showed the highest efficiency in pectinase production in 2 days by solid state fermentation on the koji of wheat bran and rice husk (18:2) with 1 gram of raw cassava starch per 20 gram of the solid substrates. The enzyme production rates were constantly high even 6 days of incubation. The efficiency of pectinase production by Rhizopus 26R in 3-7 days were respectively 1.7 and 2.4 times higher on the koji of wheat bran and rice husk (18:2) with the addition of 1 g starch and 1 g pectin than that on the koji of only wheat bran and rice husk (18:2). So far, the most efficiency of pectinase production by this strain was shown when the mold was cultivated on the mixed substrates of wheat bran, rice bran and rice husk (9:9:2) by 7 times higher in 7 day cultivation.

บทคัดย่อ

เชื้อรา 11 สายพันธุ์ในสกุล Aspergillus และ 3 สายพันธุ์ ในสกุล Rhizopus ซึ่งมีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบบ้น มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสด้วย เชื้อราสกุล Rhizopus สายพันธุ์ 26R เป็นสายพันธุ์ที่พบว่ามีประสิทธิภาพสูงที่สุดสายพันธุ์หนึ่งในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสใน เวลา 2 วัน บนอาหารแข็ง (solid substrate) ที่ประกอบด้วยรำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 18:2 ที่เติมแป้งมันสำปะหลังดิบประมาณ 1 กรัมต่อสับสเตรต 20 กรัมข้างต้น และประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ได้สูงนี้ยังคงที่อยู่ถึง 6 วัน เชื้อรา Rhizopus สายพันธุ์ 26R จึงได้รับคัดเลือกเพื่อการศึกษาเอนไซม์เพคติเนสต่อไป ประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์เพคติเนสของเชื้อสายพันธุ์นี้ ปรากฏสูงขึ้น 1.7 ถึง 2.4 เท่า เมื่อเติมแป้ง 1 กรัม หรือ pectin 1 กรัม ลงในอาหารที่เป็นรำข้าวสาลีและแกลบ(18:2) ตามลำดับ และจะสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า และแกลบ ในอัตราส่วน 9:9:2 โดยสูงขึ้นถึง 7 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อไป 7 วัน

คำนำ

การแปรรูปมันสำปะหลังไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่ให้คุณค่าสูงกว่า เช่น อาหารเสริม หรือแอลกอฮอล์นั้น อาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การบด หรือ วิธีทางชีวเคมี เช่นการใช้กรด HCl 0.5 N ย่อยมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตามด้วยเอนไซม์ α- amylase และ glucoamylase หรือ pectin depolymerase (Lee et al., 1985; Ishihara et al.,1987) การใช้จุลินทรีย์มาช่วยย่อยสลายมันสำปะหลัง ก็เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง

ในการวิจัยในเบื้องต้น ได้แยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบไว้ได้จำนวนหนึ่ง ซึ่งคัดเลือกว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยอยสลาย (hydrolyse) แป้งได้ เพราะมีการผลิตเอนไซม์ glucoamylase (Lobeng et al.,1984) อย่างไรก็ตามในวัตถุประสงค์ที่ต้องการนำหัวมันสำปะหลังดิบทั้งหัวมาแปรรูปไปเป็นอาหารเสริมต่อไปนั้น เอนไซม์ประเภท macerating enzymes เช่น pectinase, cellulase และ xylanase เป็นต้น จะมีบทบาทที่สำคัญในการช่วยย่อย เนื่องจากองค์ประกอบของหัวมันสำปะหลังดิบ มีสารย่อยยากประเภท pectin, cellulose และ xylan รวมอยู่กับแป้งเพิ่มขึ้น

ในการทดลองเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์เพคติเนสที่ได้จากบริษัท NOVO Industri A/S (ประเทศไทย) รวมกับสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้าง glucoamylase สูง ปรากฏว่าให้ผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายหัวมันสำปะหลังดิบที่บ่นละเอียดได้ดีขึ้นกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว ฉะนั้นจึงได้พิจารณาทำการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้สูง จากสายพันธุ์ทั้งหมดที่มีศักยภาพในการย่อยแป้งดิบ และ ศึกษาปรับปรุงสภาวะแวดล้อมของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกว่าดี เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส

วัตถุประสงค์

1 คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้ดีที่สุด

2 ศึกษา ปรับปรุง สภาวะแวดล้อมในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้สูงในสภาพ solid state โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว

อุปกรณ์และวิธีการ

1 <u>เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง</u> : เชื้อราที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อราที่แยกได้จากธรรมชาติจำนวน 14 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 14 สายพันธุ์มีศักยภาพสูงในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง สายพันธุ์ทั้ง 14 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราในตระกูล <u>Aspergillus</u> จำนวน 11 สายพันธุ์ ซึ่งให้เบอร์สายพันธุ์ ดังนี้ คือ J1 J2 J3 J4 J7 J8 J9 J10 N1 N2 และ 102A และเป็นเชื้อราในตระกูล <u>Rhizopus</u> 3 สายพันธุ์ คือ N37 26R และ 102R ทั้ง 14 สายพันธุ์เป็นเชื้อราที่เคยคัดเลือกแล้วว่ามีศักยภาพสูงในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ดัง fig. 1

2 <u>การเพาะเลี้ยงเชื้อรา</u> :

2.1 เตรียมกล้าสปอร์เชื้อราแต่ละสายพันธุ์

เพาะเลี้ยงแต่ละสายพันธุ์บนอาหาร raw starch agar ซึ่งประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %, KH_2PO_4 0.05 %, yeast extract 0.3 % และวุ้น 1.5 % ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave แล้วปรับ pH ให้เป็น 3.5 ด้วยกรดซัลฟูริค 5 % ที่ปราศจากเชื้อเช่นกัน เติมแป้งมันสำปะหลังที่ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมม่า จาก โคบอล 60 ลงในสารอาหารข้างต้นจำนวน 0.5 % หลังจากนำเชื้อมาเพาะบนอาหารนี้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ให้เชื้อสร้างสปอร์ นำน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มล. ต่ออาหารแข็ง 5 มล. ใส่ลงในหลอดอาหารที่มีเชื้อเจริญแล้วขนาด 16X150 มม. เขี่ยสปอร์ให้หลุดจากเส้นใยโดยใช้เข็มเขี่ยด้วยวิธี Aseptic Technic จะได้ปริมาณสปอร์ในสารละลายเฉลี่ย $2.5X10^6$ สปอร์ต่อมิลลิเมตร

2.2 เพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัดเอนไซม์เพคติเนส

การเพาะเลี้ยงเชื้อราเหล่านี้เพื่อสกัดเอาเอนไซม์เพคติเนส เป็นการเพาะเลี้ยงในสภาพ solid state ในถุงพลาสติกชนิดถุงร้อนอย่างหนา ขนาด 9X13 นิ้ว ปากถุงครอบด้วยกระดาษแข็งรูปทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มม. เพื่อบังคับขนาดปากถุง ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีโดยสวมตรงบริเวณที่ครอบไว้ด้วยกระดาษแข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ สารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา ประกอบด้วย รำข้าวสาลี 18 กรัม แกลบ 2 กรัม น้ำ 32 มล. ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วยสารละลายของ 1 N HCl 60 มล. ในน้ำกลั่น 1000 มล. ฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมแป้งจากหัวมันสำปะหลังที่บดเป็นผง ปริมาณ 1 กรัม ซึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ใน Hot air oven เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติมกล้าสปอร์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ปริมาณ 1 มล. คลุกสปอร์และสาร

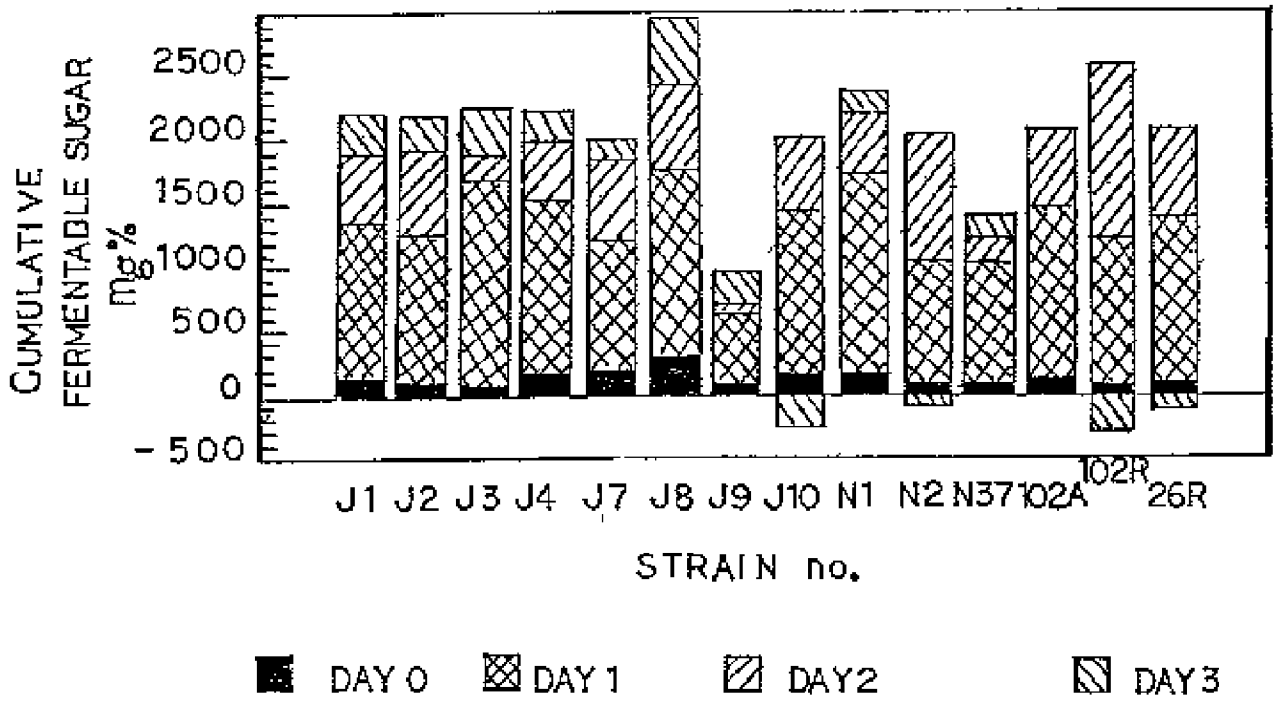

fig.1 : Time course of hydrolysis of raw cassava starch by koji extract of 14 potent strains.

อาหารให้ทั่วถึง โดยใช้วิธีขยำถุงพลาสติก ให้สารอาหารและสปอร์ภายในคลุกเคล้ากันไปมา บ่มเชื้อเป็นเวลา 2,3 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3 การสกัดเอนไซม์จากเชื้อรา

เติมสารละลาย Toluene 0.33 % (Toluene 0.5 มล. ในน้ำ 150 มล.) ปริมาตร 150 มล. ลงในถุงอาหารเพาะเชื้อราที่มีเชื้อราเจริญแล้วในข้อ 2.2 ขยำถุงเพื่อให้ของแข็งในถุงอาหารถูกสารละลาย Toluene ทั่วถึงกัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชม. แยกส่วนสารละลายในถุงออกโดยการบีบถุงพลาสติกให้น้ำออกทางปากถุง สารละลายที่ได้คือสารละลายที่มีเอนไซม์สกัด

4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนส กระทำโดยการวัดการลดลงของความหนืด (viscosity diminishing) ของสารละลายเพคติน 2 % ตามวิธีของ Roboz, Barratt และ Tatum (1952)

4.1 สับสเตรต (substrates)

สับเสตรตที่ใช้คือ สารละลายเพคติน 2 % ใน acetate buffer 0.1 M ที่มี pH 4.5

4.2 วิธีวิเคราะห์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเจือจางด้วย acetate buffer 0.1 M pH 4.5 นำมา 1 มล. ใส่ลงในสารละลายเพคติน 2 % ปริมาณ 4 มล. ที่อยู่ในเครื่องวัดความหนืด ostwald viscometer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อ่านค่าความหนืดของสารละลายเพคติน 2 % เมื่อมีและไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์การลดลงของความหนืด (% viscosity diminishing, A) ตามสูตร

$$A = \frac{Vo - Vt}{Vo - Vs} \times 100$$

เมื่อ Vo = เวลา(วินาที)ในการไหลของสารละลายเพคตินร่วมกับ inactive enzyme ซึ่งได้จากการต้มเอนไซม์ในน้ำเดือดนาน 20 นาที

Vt = เวลา(วินาที)ในการไหลของสารละลายเพคตินร่วมกับ active enzyme หลังจากบ่มไว้ 10 นาที

Vs = เวลา(วินาที)ในการไหลของตัวทำละลายคือ acetate buffer 0.1 M นำค่าเปอร์เซนต์การลดความหนืด (A) ไปคำนวณหาจำนวนเอนไซม์โดยกำหนดให้

1 unit ของเอนไซม์ คือ จำนวนเอนไซม์ที่ใช้ในการลดความหนืดของสารละลายเพคติน 2 % 1 มิลลิลิตร ลงไป 50 % ในเวลา 10 นาที

เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสที่เชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์สร้างขึ้นใน 2, 3 และ 4 วัน

5 <u>การหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส</u>

นำเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสในระหว่าง 14 สายพันธุ์ มาเลี้ยงเพื่อให้ผลิตเอนไซม์เพคติเนสในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ กัน

5.1 ในสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงวัสดุที่ใช้เป็นธาตุอาหาร

นำเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วโดยวิธีในข้อ 2, 3 และ 4 มาเลี้ยงบนวัสดุต่าง ๆ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ คือ

5.1.1 รำข้าวสาลี:รำข้าวเจ้า:แกลบ ในอัตราส่วน 18:0:2

5.1.2 รำข้าวสาลี:รำข้าวเจ้า:แกลบ ในอัตราส่วน 18:0:2 และเติม แป้งมันสำปะหลังดิบ 1 กรัม

5.1.3 รำข้าวสาลี:รำข้าวเจ้า:แกลบ ในอัตราส่วน 20:0:0

5.1.4 รำข้าวสาลี:รำข้าวเจ้า:แกลบ ในอัตราส่วน 9:9:2

5.1.5 รำข้าวสาลี:รำข้าวเจ้า:แกลบ ในอัตราส่วน 0:18:2

วิธีการเพาะเลี้ยง,การสกัดเอนไซม์ และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ กระทำเช่นเดียวกับ ข้อ 2, 3 และ 4 แต่สกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย Toluene 0.33 % เพียง 100 มล. เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการสกัดเอนไซม์ได้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับการใช้สารละลายปริมาตร 150 มล. สกัด (ดัง Table 1) เก็บตัวอย่างเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นทุก ๆ 24 ชม. เป็นเวลา 7 วัน ตั้งแต่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์บนวัสดุแต่ละตัวอย่าง

5.2 ในสภาพที่มีการเติม yeast extract และ pectin

นำเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วข้างต้น มาเลี้ยงบนวัสดุสารอาหารที่เตรียมตามวิธีในข้อ 2 ที่มีส่วนผสมของ รำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 18:2 หรือ รำข้าวสาลี,รำข้าวเจ้า และแกลบในอัตราส่วน 9:9:2 และเติม yeast extract 0.5 กรัม หรือ pectin 1 กรัม ต่ออาหารแข็ง 1 ถุง วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสที่เชื้อสร้างขึ้นบนอาหารดังกล่าว เปรียบเทียบกับที่เชื้อสร้างขึ้นบนอาหารที่ไม่ได้เติม yeast extract และ pectin

ผลการทดลอง

1 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส

จากผลใน Fig.2 พบว่า เชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นบนอาหาร solid substrate ที่เป็น รำข้าวสาลี : แกลบ ในอัตราส่วน 18:2 ทั้ง 4 กลุ่ม ได้แก่

1.1 สายพันธุ์ J7 N2 และ 26R มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 32-34 หน่วย/มล.

1.2 สายพันธุ์ J1 J2 J3 J10 และ 102A มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 20-25 หน่วย/มล.

1.3 สายพันธุ์ J4 J8 J9 N1 และ N37 มีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง 10-18 หน่วย/มล.

1.4 สายพันธุ์ 102R มีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ ต่ำกว่า 10 หน่วย/มล.

นอกจากนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 14 สายพันธุ์ต่อไป บนอาหารดังกล่าว พบว่า 10 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสจะลดลง เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 3 วัน และ 11 สายพันธุ์ ใน 14 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปเป็นเวลา 4 วัน มีเพียง 3 สายพันธุ์ที่ปรากฏกิจกรรมของเอนไซม์คงที่หรือแม้แต่สูงกว่าเดิมเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อถึง 4 วัน ได้แก่ สายพันธุ์ N1 102R และ 26R

อนึ่ง สายพันธุ์ J7 N2 และ 26R ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดนั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราไป 2,3 และ 4 วัน พบว่า สายพันธุ์ J7 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 32 , 4 และ 3 หน่วย/มล. สายพันธุ์ N2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 35, 17 และ 13 หน่วย/มล. และสายพันธุ์ 26R ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 33, 30 และ 38 หน่วย/มล. ตามลำดับ

2 ปริมาณของเอนไซม์เพคติเนสของเชื้อที่คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสของเชื้อรา 14 สายพันธุ์ ในข้อ 1 ปรากฏว่า สายพันธุ์ 26R ซึ่งได้ identify แล้ว ว่าเป็นเชื้อราในยีนัส Rhizopus เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ และ ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตยังคงสูงที่สุดแม้เลี้ยงเชื้อไป 4 วัน จึงคัดเลือกเชื้อ Rhizopus

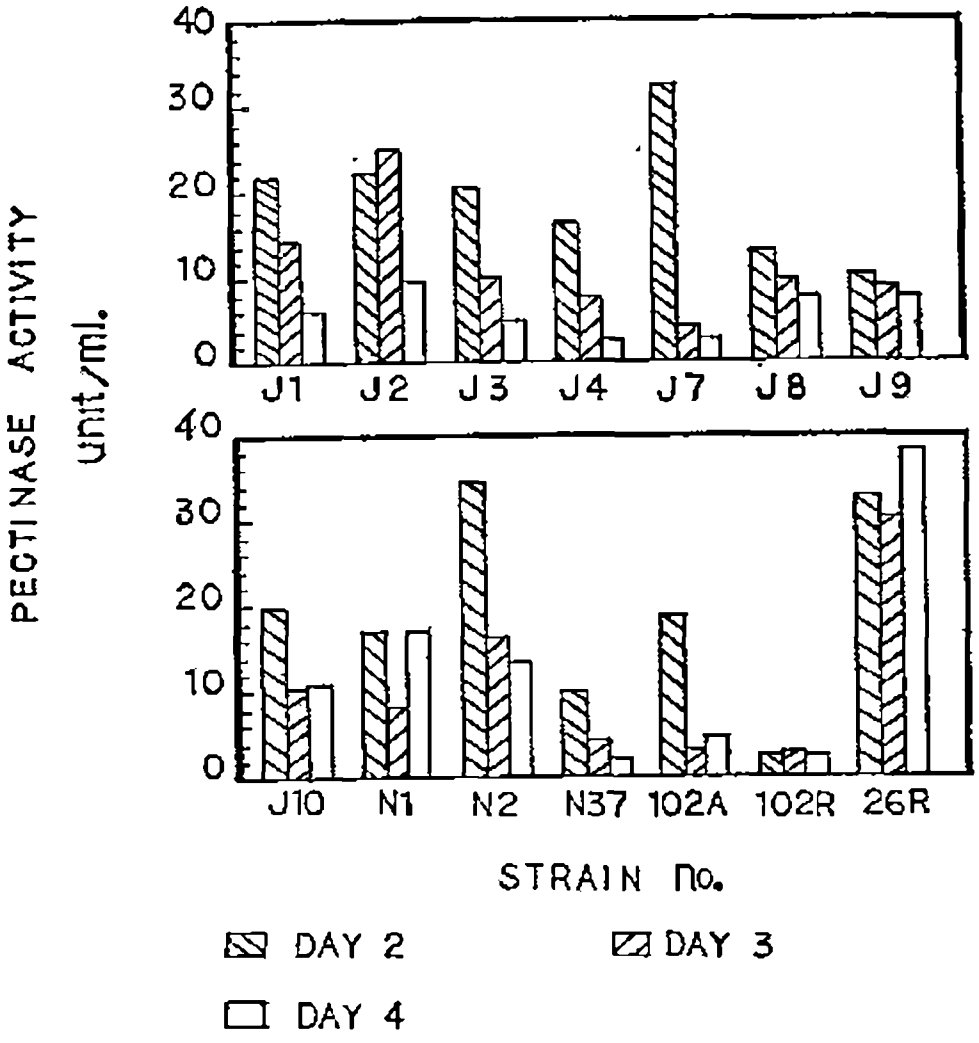

fig.2 : Pectinase activities (unit/ml) from koji extracts of 14 selected strains after cultivations for 2, 3 and 4 days on the solid substrates of wheat bran and rice husk (1:2) with 1 g raw cassava starch / 20 g koji.

สายพันธุ์ 26R เพื่อการทดลองขั้นต่อไป เชื้อนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของรำข้าวสาลีและแกลบ ในอัตราส่วน 18:2 ทุก ๆ 24 ชม. ในเวลา 1-7 วัน พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงและเฉลี่ยอยู่ในช่วง 38-47 หน่วย/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-6 วัน และกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลงเหลือ 19 หน่วย/มล. ในวันที่ 7 (ดัง fig.3) โดย pH ของอาหารแข็งสูงขึ้นจากเดิม (pH4.5) เป็น pH 5.0 ในวันที่ 1 และสูงขึ้นอีกเล็กน้อยในวันที่ 2 และจะคงที่อยู่ในช่วง pH เฉลี่ย = 6.18 จนถึงวันที่ 7

3 ผลการใช้สารละลาย Toluene 0.33 % ปริมาตรต่าง ๆ กันในการสกัดเอนไซม์จากอาหารแข็ง

Table 1 แสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสทั้งหมด (Total activity) เป็น unit ที่สกัดจากอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของรำข้าวสาลีกับแกลบ อัตราส่วน 18:2 ด้วยสารละลาย Toluene 0.33 % ปริมาตร 50 100 และ 150 มล. ปรากฏว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสทั้งหมดที่ได้เมื่อสกัดด้วยสารละลายปริมาตร 100 มล. มีค่าใกล้เคียงหรือมากกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เมื่อสกัดด้วยสารละลายปริมาตร 150 มล. แต่เมื่อสกัดด้วยสารละลายปริมาตร 50 มล. กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าน้อยกว่าทั้งสองค่าข้างต้น ฉะนั้น การใช้สารละลาย Toluene 0.33 % ปริมาตร 100 หรือ 150 มล. มีประสิทธิภาพที่จะสกัดเอนไซม์ได้เท่ากัน จึงเลือกใช้สารละลาย Toluene 0.33 % ปริมาตร 100 มล. เพื่อสกัดเอนไซม์ในขั้นต่อไป เพราะได้สารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นกว่า

4 การหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสโดยเชื้อรา Rhizopus สายพันธุ์ 26R

4.1 ในสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงวัสดุที่ใช้เป็นธาตุอาหาร

fig.4 แสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ Rhizopus สายพันธุ์ 26R ผลิตขึ้นบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบของวัสดุสารอาหารต่าง ๆ กันระหว่างส่วนผสมของ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า และแกลบ และเมื่อเติมหรือไม่เติมแป้งดิบ รวมทั้งแสดงถึงค่า pH ของอาหารแต่ละชนิดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1-7 วัน

4.2 ในสภาพที่มีการเติม yeast extract และ pectin

fig.5 แสดงถึง กิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ Rhizopus สายพันธุ์ 26R ผลิตขึ้นบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบของ รำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 18:2 ทั้งที่เติมและไม่เติม yeast extract, pectin หรือ แป้งมันสำปะหลังดิบ

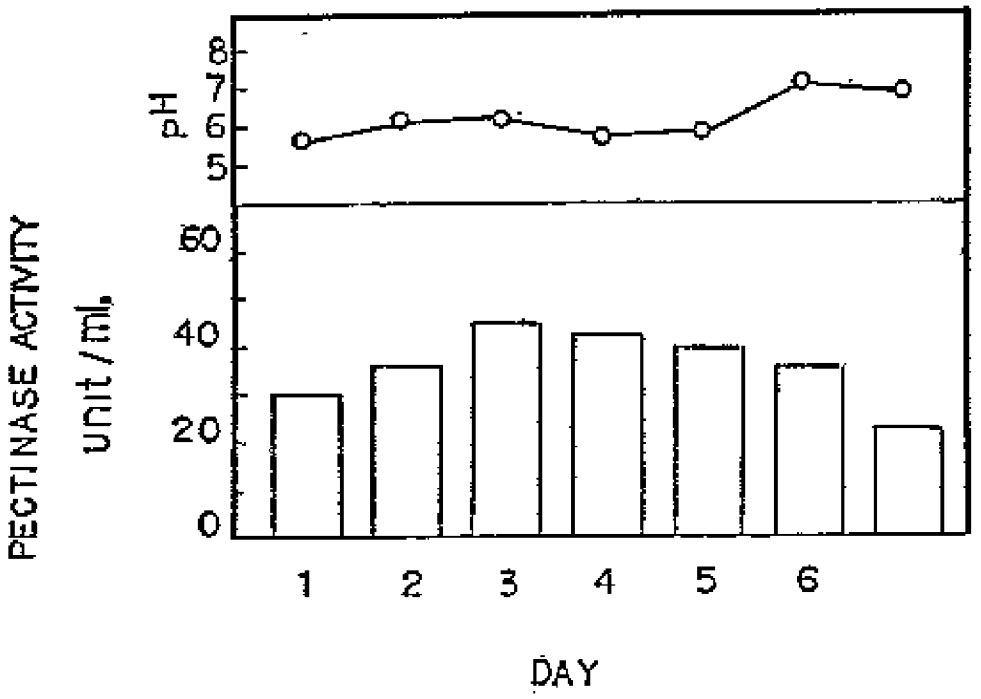

fig.3 : Time course of pectinase activities from koji extracts of Rhizopus 26R cultivated on wheat bran and rice husk (18:2) with 1 g raw cassava starch 20 g koji and pH of the koji extracts.

Table 1 : Total activities of pectinase in koji extract of Rhizopus 26R when different volumes of 0.33% Toluene solution were used in the enzyme extraction.

volume of 0.33% Toluene solution (ml.)	Total activity of Pectinase (unit)
50	2212.6
100	3055.5
150	2712.5

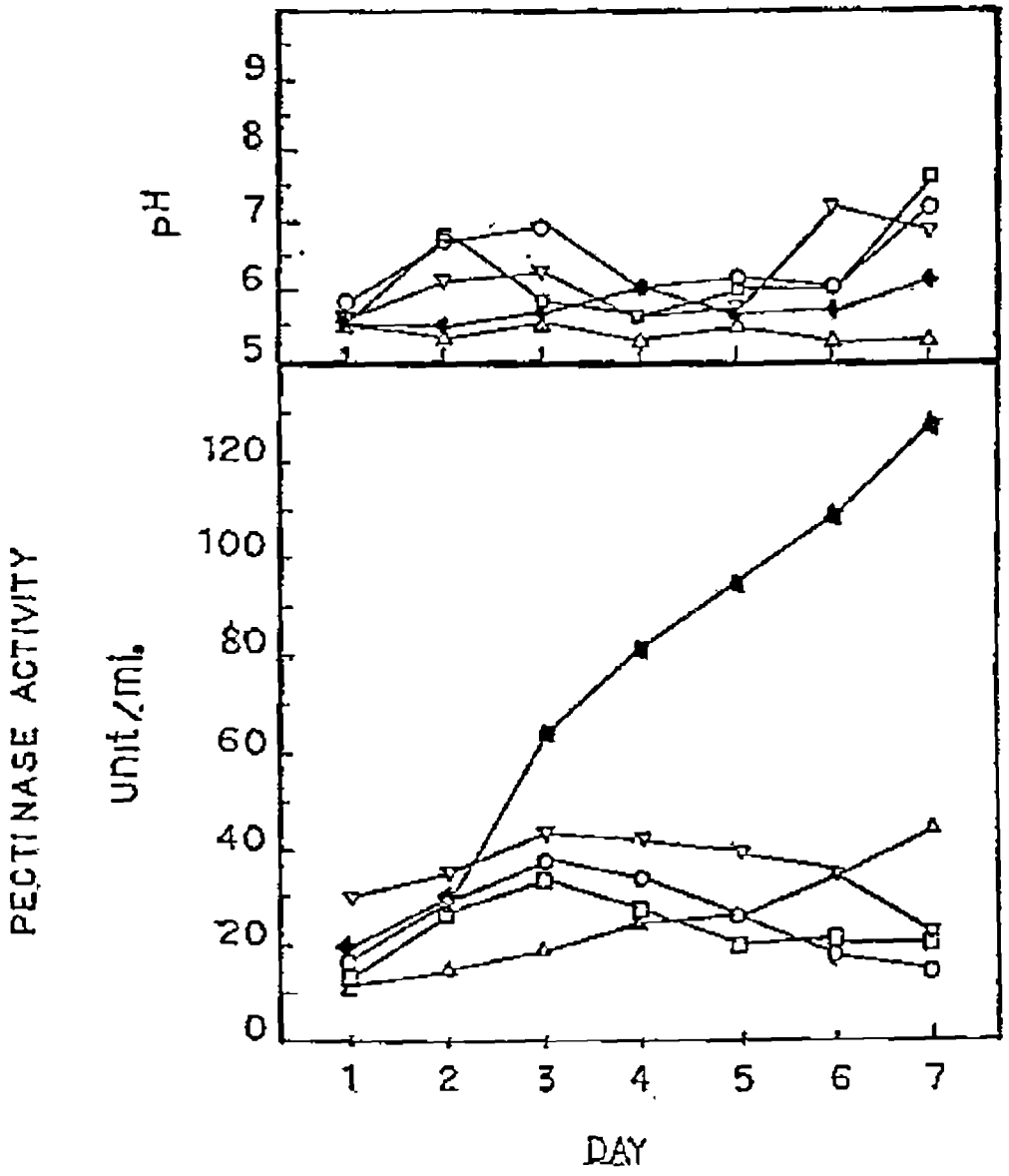

fig.4 : Time course of pectinase activities of Rhizopus 26R produced on the koji of different kinds of solid substrates and pH of the koji extracts.
(substrates = wheat bran:rice bran:rice husk ;
○ 20:0:0, □ 18:0:2, ◆ 9:9:2, △ 0:18:2, ▽ 18:0:2 + raw cassava starch 1 g)

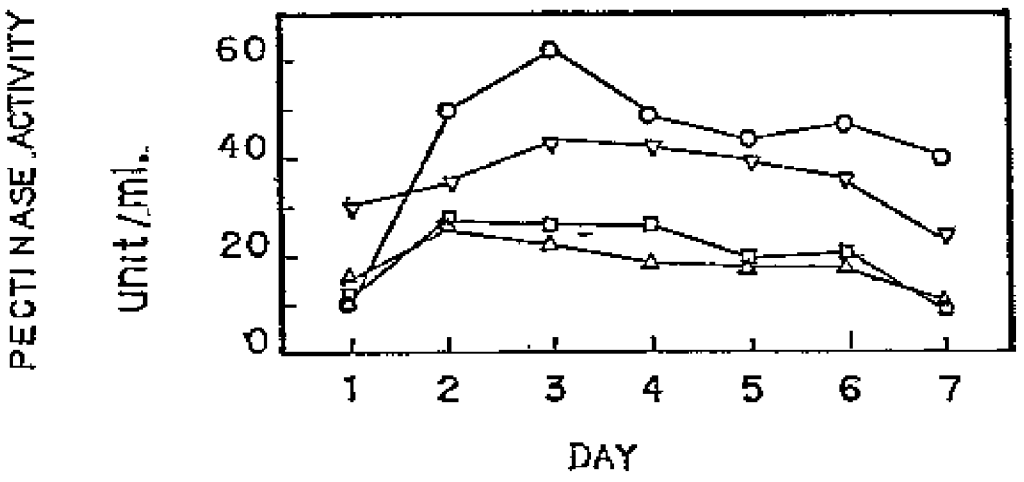

fig.5 : Time course of pectinase activities of Rhizopus 26R produced on the koji of wheat bran and rice husk (18:2) with and without the addition of yeast extract, pectin or raw cassava starch.
(wheat bran:rice husk ; □ 18:2, △ 18:2 + yeast extract 0.5 g, ○ 18:2 + pectin 1 g, ▽ 18:2 + raw cassava starch 1 g

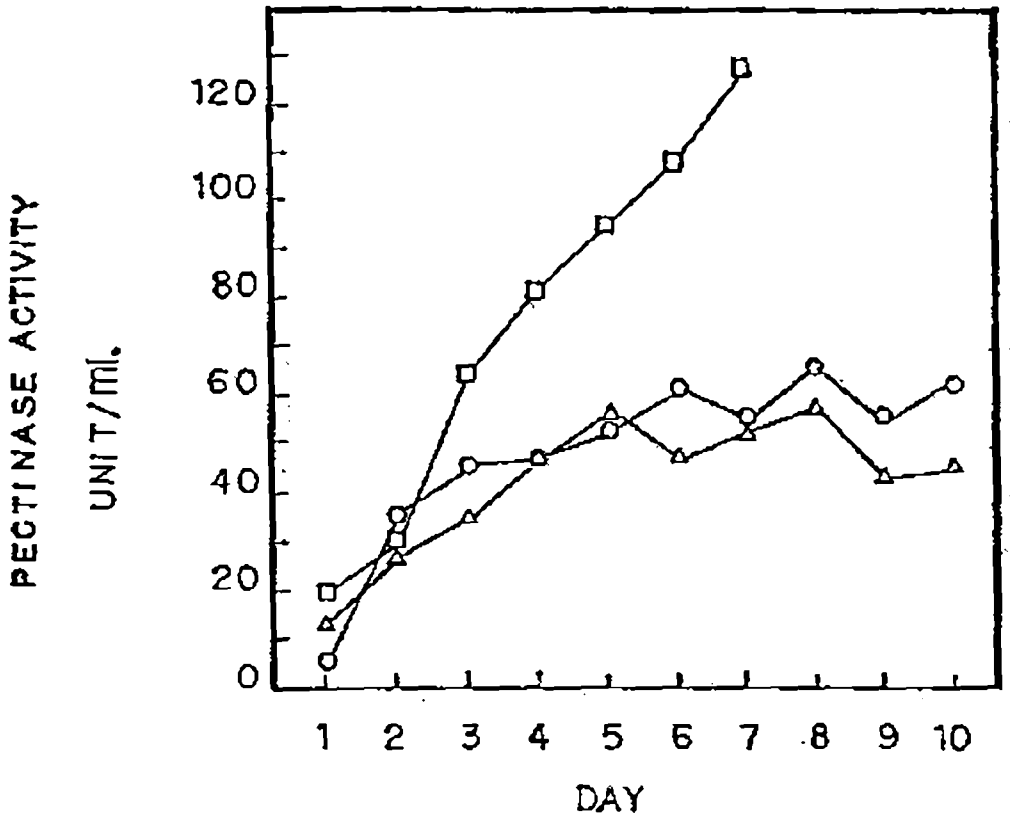

fig.6 ; Time course of pectinase activities of Rhizopus 26B produced on the koji of wheat bran, rice bran and rice husk (9:9:2) with and without the addition of yeast extract or pectin.

(wheat bran:rice bran:rice husk ; □ 9:9:2, △ 9:9:2 + yeast extract 0.5 g, ▽ 9:9:2 + pectin 1 g)

fig.6 แสดงถึง กิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อ Rhizopus สายพันธุ์ 26R ผลิตขึ้นบนอาหารแข็งที่มีองค์ประกอบของ รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า และกลบ ในอัตราส่วน 9:9:2 ทั้งที่เติมและไม่เติม yeast extract หรือ pectin

สรุปและวิจารณ์

จากเชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกว่ามีศักยภาพในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังดิบ ซึ่ง 11 สายพันธุ์เป็นเชื้อราในสกุล Aspergillus และอีก 3 สายพันธุ์เป็นเชื้อราในสกุล Rhizopus เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส พบว่า 14 สายพันธุ์ ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ มีงานวิจัยหลายงานที่แสดงถึงจุลินทรีย์ในสกุลต่าง ๆ กันที่สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้ และมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์เหล่านั้น รวมทั้งการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อีกด้วย ตัวอย่างเช่น เชื้อราในสกุล Aspergillus นั้น มีผู้ศึกษา Aspergillus sojae ผลิตเอนไซม์ pectin-trans-Eliminase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 32,000 ดาลตัน (Ishii and Yokotsuka,1972) Aspergillus japonicus ผลิตเอนไซม์ pectin lyase ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 32,000 ดาลตัน เช่นกัน (Ishii and Yokotsuka,1975) และ Aspergillus ficuum ผลิตเอนไซม์ทั้ง polygalacturonase และ pectin-trans-Eliminase (Espino et al.,1986) ส่วนเชื้อราสกุล Rhizopus นั้น ได้มีผู้รายงานว่า Rhizopus arrhizus ที่เจริญอยู่ใน rotted apricot มีการผลิตเอนไซม์ Endo-polygalacturonase ที่มี น้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 30,270 (Liu and Luh,1978) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราในสกุลอื่น ๆ ที่สร้างเอนไซม์ เช่น Sclerotinia fructigena ผลิตเพคติเนส 2 ชนิด ออกมานอกเซล คือ Endo-polygalacturonase และ α-L-Arabinofuranosidase (Fielding and Byrde,1969), Aureobasidium pullulans LV10 สร้างเอนไซม์ Pectin lyases 2 ชนิด คือ L1 และ L2 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 89,000±1000 ดาลตัน และ 55,000±1000 ดาลตัน ตามลำดับ (Parini et al.,1988) และยังพบเชื้อราในสกุล Mucor sp.ที่มีการผลิตเอนไซม์เพคติเนสเช่นกัน (Satiwihardja et al.1985)

ในรายงานวิจัยนี้ เชื้อราทั้ง 14 สายพันธุ์ที่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์เพคติเนสนั้น มีอยู่ 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ J7 N2 และ 26R มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 32-34 หน่วย/มล. เมื่อให้เชื้อเจริญ 2 วันบนอาหารแข็งที่เป็นส่วนผสมของข้าวสาลี และแกลบ (18:2) ที่มีการเติมแป้งมันสำปะหลังดิบ 1 กรัม/อาหารแข็ง 20 กรัม แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปถึง 3 และ 4 วัน ปริมาณของเอนไซม์เพคตินเนสที่เชื้อสายพันธุ์ J7 และ N2 สร้างขึ้นนั้นกลับลดลงมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะความไม่คงทนของเอนไซม์ของสายพันธุ์ J7 และ N2 อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ 26R แสดงประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้ดี แม้จะเลี้ยงไปเป็น

เวลานานถึง 7 วัน ฉะนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ 26R เพื่อใช้ในการศึกษาเอนไซม์เพคติเนสและการผลิตเอนไซม์ เพื่อประโยชน์ในการย่อยสลายหัวมันสำปะหลังดิบ ได้จำแนกเชื้อราสายพันธุ์ 26R ไว้แต่เดิมว่าเป็นเชื้อราในสกุล Rhizopus

ในการผลิตเอนไซม์เพคตินเนสโดยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์นั้น จำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุด Satiwihardja และคณะ (1985) ได้เคยผลิตเอนไซม์เพคติเนสโดยกระบวนการหมักแบบ solid state โดยใช้เชื้อราในสกุล Mucor โดยการใช้รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า peanut cake tofu cake เป็นสับเสตรต และมีการเติม ยูเรีย เพื่อเพิ่มแหล่งไนโตรเจน เขาพบว่า สำหรับการผลิตเพคติเนสจากเชื้อราสกุล Mucor นี้ การใช้รำข้าวเจ้าที่ผสม ยูเรีย 2% ทำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ภายใน 6 วัน คือประมาณ 159.1 หน่วยต่อกรัมของสับสเตรต เมื่อเทียบกับสารอาหารอื่น ๆ ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์เพียง 25.5-126.0 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต สำหรับการศึกษาปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Rhizopus 26R เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสให้สูงที่สุดนั้น ได้วางแผนทำการปรับปรุง ชนิดและอัตราส่วนผสมของวัสดุที่ใช้เป็นสารอาหารการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน, การเปลี่ยนแปลง pH และความชื้น เป็นต้น ในเบื้องต้น วัสดุสารอาหารที่ใช้เป็นสับสเตรต ได้แก่ วัสดุผสมระหว่าง รำข้าวสาลีและแกลบ ในอัตราส่วน 18:2 ที่ pH เริ่มต้น 4.5 และในระดับความชื้นหนึ่ง ในการทดลองได้ปรับปรุงวัสดุที่ใช้เป็นสารอาหาร เป็นวัสดุผสมของรำข้าวสาลี และ/หรือ รำข้าวเจ้า และ/หรือ แกลบ ในอัตราส่วนต่าง ๆ รวมทั้งการเติมแหล่ง คาร์บอนและไนโตรเจน ได้แก่ แป้งมันสำปะหลังดิบ หรือ pectin หรือ yeast extract Satiwihardja และคณะ (1985) แนะนำไว้ว่า pectin เป็น inducer และ ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับเชื้อราสกุล Mucor สำหรับเชื้อราสกุล Rhizopus 26R พบว่า การเพิ่ม pectin 1 กรัมลงในสับสเตรต 20 กรัม ของรำข้าวสาลี และแกลบ (18:2) ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ 2.4 เท่า คือจาก 26.4 หน่วยเอนไซม์/มล.ของ enzyme extract เพิ่มเป็น 62.5 หน่วย/มล. เมื่อเลี้ยงเชื้อไป 3 วัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์กลับลดลงเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อต่อไปในวันที่ 4-7 และเมื่อเติมแป้งมันสำปะหลังดิบ 1 กรัม ลงไปในสับสเตรต 20 กรัมข้างต้น กิจกรรมของเอนไซม์ เพิ่มขึ้น เช่นกัน ประมาณ 1.7 เท่า จากเดิม 26.4 หน่วย/มล. เป็น 44.3 หน่วย/มล. เมื่อสกัดเอนไซม์ในวันที่ 3 และกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 4-7 ก็ลดลงเช่นกัน แต่เมื่อเติม yeast extract ลงในสับสเตรต

กิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสไม่เพิ่มขึ้นเลย

นอกจากนี้เมื่อเปลี่ยนแปลงวัสดุอาหารจากส่วนผสมของรำข้าวสาลี และแกลบ ในอัตราส่วน 10:2 เป็น รำข้าวสาลีผสมกับรำข้าวเจ้าและ แกลบ ในอัตราส่วน 9:9:2 พบว่า การผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา Rhizopus 26R เพิ่มสูงขึ้นมาก เป็น 2,3,4.8,5 และ 7 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อไป 3,4,5,6 และ 7 วัน ตามลำดับ โดยเฉพาะในวันที่ 7 ปริมาณเอนไซม์ที่เชื่อผลิตบนอาหารชนิดนี้มีถึง 130 หน่วย/มล. อย่างไรก็ตาม การเติม pectin หรือ yeast extract ลงในอาหารผสมของรำข้าวสาลี รำข้าวเจ้าและแกลบ (9:9:2) ไม่ได้ช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ แต่กลับทำให้ลดลงด้วย

ฉะนั้นจากการทดลองนี้สรุปได้ว่า การใช้ รำข้าวสาลี ผสมกับรำข้าวเจ้าและแกลบ ในอัตราส่วน 9:9:2 เป็นสับสเตรตเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ Rhizopus สายพันธุ์ 26R ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะโครงสร้างของ สับสเตรตค่อนข้างอุ้มน้ำมากกว่าเดิม ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ความชื้นในถุงอาหารค่อนข้างสูง เชื้อรานี้เป็น strictly aerobe ฉะนั้น ความชื้นสูงอาจเป็นสาเหตุทำให้เชื้อเจริญได้ช้า และมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ จึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณความชื้นในถุงอาหารที่เหมาะสมโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำที่ใช้คลุกสับสเตรตก่อนการเพาะเชื้อ การทดลองดังกล่าว ยังอยู่ในระหว่างดำเนินการ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะให้เชื้อราสกุล Rhizopus สายพันธุ์ 26R ผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้สูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Espino,T.M., C.B.Pham, S.M.Maldo, D.M.Alba, N.T.Molina and H.A.Lapitan. 1986. Isolation, Purification and Optimization of Condition for Pectinase Production from Aspergillus ficuum. Abs.ASIA-PACIF.Biotech.Cong. p. 4. (BIOTECHUPLB)

Fielding,A.H. and R.J.W.Byrde.1969. The Partial Purification and Properties of Endopolygalacturonase and -L-Arabinosidase secreted by Sclerotinia fructigena. J. Gen. Microbiol. 58:79-84.

Ishihara,M., S.Toyama and K.Yonaha. 1987. Degradation of Uncooked Cassava Tuber with Enzyme Preparations for Ethanol Fermentation. Sci.Bull.Coll.Agric.Univ.Ryukyus. 34:21-27.

Ishii,S. abd T.Yokotsuka. 1972. Purification and properties of Pectin trans-Eliminase from Aspergillus sojae Agr.Biol.Chem. 39(2):313-321.

Lee,S.Y., Y.C.Shin, H.S.Kim, and S.M.Byun. 1985. Ethanol Fermentation of Uncooked Cassava Starch. J. Ferment. Technol. 63(1):51-56.

Liu,Y.K. and B.S. Luh. 1978. Purification and Characterization of Endo-Polygalacturonase from Rhizopus arrhizus. J. Food Sci. 43:721-726.

Lotong,N., C.Chettanachittara, B.Yongsmith, W.Yongmanitchai, S.Limtong, N.Noparatnaraporn, V.Kitpreechavanich and L.Buranakarl. 1984. Utilization of Cassava and Cassava Waste through Fermentation Technology ; Progress report no.1 research project USAID/PSTC Program Grant no. 936-5542. 28 p.

Parini,C., M.G.Fortina and P.L.Manachini. 1988. Properties of two Pectin lyases produced by Aureobasidium pullulans LV10. J. Appl. Bact. 65:477-481.

Satiwihardja,B., Sulistari, C.C.Nurwitri and J.Hariantono. 1985. Production of Pectinase Through Solid State Fermentation by Molds Isolated from Fruit. Med.Teknol.Pang. 1 (1): 29-39.