

# เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

## เรื่องที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา

สายพันธุ์กลาย

แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>1</sub>

(*Aspergillus niger* P<sub>1</sub>)

ต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

โดย

นางสาวรัตนา สุขสรรค์

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ  
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

## เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

เรื่องที่ 2

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา

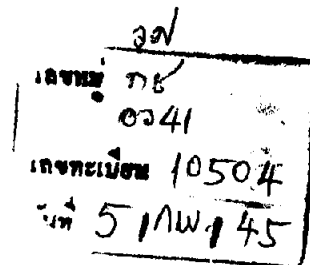
สายพันธุ์กลาย

แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub>

(*Aspergillus niger* P<sub>4</sub>)

ต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

โดย



นางสาวรัตนา สุขสรรค์

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

## บทคัดย่อ

นำเอาเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> (*Aspergillus niger* P<sub>4</sub>) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 6 (*Aspergillus niger* 6) , แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 81 (*Aspergillus niger* 81) และแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 500 (*Aspergillus niger* 500) มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเหลวซึ่งมี แอลฟา-เซลลูโลส (α - cellulose) ผสมอยู่ร้อยละ 2 ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบต้องใช้แบ่งเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนในการเจริญเติบโตจากการศึกษาทดลองพบว่า แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> ให้ปริมาณเซลล์อบแห้งหลังการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลส 2.10 ถึง 2.38 กรัม/100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.263 กรัม/100 มิลลิลิตร สายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 6 ให้ปริมาณเซลล์ 2.39 ถึง 2.50 กรัม/100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.453 กรัม/100 มิลลิลิตร สายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 81 ให้ปริมาณเซลล์ 3.29 ถึง 3.49 กรัม/100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 3.391 กรัม/100 มิลลิลิตร สายพันธุ์กลายใหม่ 500 ให้ปริมาณเซลล์ 2.40 ถึง 2.74 กรัม/100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.618 กรัม/100 มิลลิลิตร คำนวณค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานได้ 0.07931, 0.03802, 0.074154 และ 0.105494 ตามลำดับ เมื่อนำไปหาค่าเฉลี่ยที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 จะได้ค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ พี<sub>4</sub>  $2.26 \pm 0.057$  สายพันธุ์กลายใหม่ 6  $2.45 \pm 0.027$  สายพันธุ์กลายใหม่ 81  $3.39 \pm 0.053$  และสายพันธุ์กลายใหม่ 500  $2.62 \pm 0.075$  ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า สายพันธุ์กลายใหม่ 81 ให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> และสายพันธุ์กลายใหม่ 6 และ 500 นำเชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 81 นี้ ไปทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายใต้น้ำโดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งมีใต้น้ำและแป้งผสมอยู่ร้อยละ 1 ด้วยวิธีการเขย่าขวด (shake flask) ใต้น้ำที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบวิเคราะห์โปรตีนได้ร้อยละ 3.9 หลังถูกย่อยสลายด้วยเชื้อรา โปรตีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6.8 และเมื่อนำเอาใต้น้ำไปย่อยสลายเบื้องต้นโดยต้มกับด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 แล้วนำไปย่อยสลายด้วยเชื้อรา ปรากฏว่าใต้น้ำได้แปรสภาพเป็นเซลล์ของเชื้อราหมดภายใน 3 วัน แสดงว่าเชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 81 นี้ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายใต้น้ำ ปริมาณเซลล์หลังการย่อยสลายนำไปวิเคราะห์หาค่าโปรตีนได้ร้อยละ 15.0

## สารบัญ

|                                       | หน้า |
|---------------------------------------|------|
| สารบัญตาราง                           | ก    |
| สารบัญภาพ                             | ข    |
| คำนำ                                  | 1    |
| วัตถุประสงค์                          | 5    |
| ประโยชน์ที่ได้รับ                     | 5    |
| วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ               | 6    |
| ผลการศึกษาทดลอง                       | 12   |
| วิจารณ์ผลการศึกษาทดลอง                | 16   |
| สรุปผลการศึกษาทดลอง                   | 18   |
| คำขอบคุณ                              | 19   |
| เอกสารอ้างอิง                         | 20   |
| ภาคผนวก                               |      |
| ภาคผนวก ก                             | 21   |
| แสดงภาพการย่อยสลายเซลล์ูลูลของเชื้อรา |      |
| ภาคผนวก ข                             |      |
| วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน           | 27   |
| ภาคผนวก ค                             |      |
| ตารางแสดงค่าทางสถิติ                  | 28   |
| ภาคผนวก ง                             |      |
| วิธีการนับจำนวนสปอร์                  | 29   |
| บทแทรก                                | 31   |

## ก

### หน้า

#### สารบัญตาราง

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา หลังการย่อยสลายแอลฟา-<br>เซลลูโลส ( $\alpha$ - cellulose)   | 13 |
| ตารางที่ 2 แสดงปริมาณโปรตีนของไล่นุ่นและไล่นุ่นหลังการย่อยสลาย<br>ของเชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 81 | 15 |

สารบัญภาพ

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ภาพที่ 1 แสดงอาหารเหลวซึ่งมีแอลฟา-เซลลูโลส<br>( $\alpha$ - cellulose) ผสมอยู่ร้อยละ 2                                                                                                     | 22 |
| ภาพที่ 2 แสดงการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส<br>ไนเจอร์ พี <sub>4</sub> สายพันธุ์เดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี<br>แอลฟา-เซลลูโลสผสมอยู่ร้อยละ 2 และแบ่งผสม<br>อยู่ร้อยละ 1    | 23 |
| ภาพที่ 3 แสดงการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส<br>ไนเจอร์ พี <sub>4</sub> สายพันธุ์กลาย 81 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่<br>มีแอลฟา-เซลลูโลสผสมอยู่ร้อยละ 2 และแบ่งผสมอยู่<br>ร้อยละ 1 | 24 |
| ภาพที่ 4 แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส<br>ไนเจอร์ พี <sub>4</sub> สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์กลาย 81<br>หลังการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลส                                           | 25 |
| ภาพที่ 5 แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส<br>ไนเจอร์ พี <sub>4</sub> สายพันธุ์กลาย 81, 500 และ 6                                                                                  | 26 |
| ภาพที่ 6 แสดงสเกล (scale) ของเครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer)                                                                                                                         | 30 |

## คำนำ

โลกยุคปัจจุบันพบว่าทรัพยากรธรรมชาติได้ลดน้อยลงไปมาก ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาในการที่จะนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทที่มีเซลลูโลสมาทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดจึงเป็นที่มาของการวิจัยเรื่องการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> (*Aspergillus niger* P<sub>4</sub>) สำหรับใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลส งานวิจัยนี้เป็นการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งขั้นตอนของการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อราและขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อรานั้นได้กระทำแล้ว เมื่อพบว่าแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> สามารถย่อยสลายลำสาลีได้ ซึ่งพบโดยบังเอิญขณะผู้วิจัยไปฝึกงานเรื่อง microbial genetics ณ มหาวิทยาลัยสิงคโปร์ ซึ่งในตอนนั้นทางมหาวิทยาลัยได้มีงานวิจัยเรื่องการผลิตเอนไซม์เอมิเลสจากแบ่งด้วยเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ (*Aspergillus niger*) และเชื้อราสายพันธุ์กลายแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> ก็เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ในงานวิจัยนั้น วิธีการวิจัยใช้วิธีเขย่าขวดในระบบน้ำวน (circulating bath) เพื่อให้อุณหภูมิที่ปรับไว้สม่ำเสมอ ในขณะที่ทำการเขย่าขวดเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> ได้ปนเปื้อนลงไปบนจุลลำสาลีที่ใส่ปิดขวดทดลองนั้น ความชื้นในลำสาลีเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากละอองน้ำที่กระเด็นมาโดนทำให้ความชื้นของลำสาลีพอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เชื้อราจะปล่อยเอนไซม์ (enzyme) ออกมาย่อยสลายลำสาลี ลำสาลีบริเวณนั้นจะเป็นสีเหลือง และเส้นใยสีขาวของลำสาลีจะหายไป จุกลำสาลีจะแห้งไปตามที่เชื้อราเจริญเติบโต แสดงว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถย่อยสลายลำสาลีได้ ด้วยเหตุนี้จึงได้เก็บเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> นี้ไปทำการศึกษาดทดลองหาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยการเพาะเชื้อรา พี<sub>4</sub> ที่มีอายุนาน 7 วัน ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลลูโลสผสมอยู่ร้อยละ 2 โดยวิธี Point inoculation ดูโซน (zone) สีเหลืองที่เกิดรอบ ๆ โคโลนี ถ้าหากไม่มีโซนเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อรานั้นไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส เชื้อราที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ นำไปปรับปรุงประสิทธิภาพ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงขึ้น โดยวิธีการทำให้เชื้อรากลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร (250 nm) เชื้อราที่เหลืรอดร้อยละ 1 คือเชื้อราที่กลายพันธุ์แล้วอาจมีประสิทธิภาพด้อยหรือดีกว่าสายพันธุ์เดิม นำเชื้อราที่เหลืรอดร้อยละ 1 นี้ จำนวน 500 สายพันธุ์ ไปทดสอบหาประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งพบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้นที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลาย เซลลูโลสสูง คือ สายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ 6 (*Aspergillus niger* 6) แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ 81 (*Aspergillus niger* 81) และ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ 500 (*Aspergillus niger* 500) รายละเอียดและวิธีการตามรายงานกิจกรรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ ฉบับที่ 50 ปีงบประมาณ

2535] [1] เชื้อราที่ผ่านการปรับปรุงและคัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูง นำกลับมาทำการศึกษาทดลองต่อ ณ ห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ เพราะเห็นว่าอาจมีประโยชน์ในอนาคต

เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> เป็นเชื้อราที่มาจากสายพันธุ์เดิม แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลสูง เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ เป็นราดำ จัดอยู่ในกลุ่ม แอสโคไมยเซตีส (Ascomycetes) จินัส แอสเพอร์จิลลัส (genus *Aspergillus*) สปีชีส์ ไนเจอร์ (species *niger*) แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในดิน สปอร์จะแพร่ไปในอากาศอย่างรวดเร็วและงอกเป็นต้นเมื่อมีอาหารที่เหมาะสม สร้างไมซีเลียม (mycelium) สีขาว และสีเหลืองในเวลาต่อมา ลำต้นของเชื้อรามีลักษณะเป็นปล้องคล้ายต้นอ้อย มีขนาด 120 ไมครอน (μ) เมื่อแก่จัดปลายยอดของลำต้นจะกลม (conidia globose) และเต็มไปด้วยสปอร์ที่มีสีดำ เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส เจริญเติบโตได้ดีที่สุด (optimum temperature) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ให้ทั้งคุณและโทษ โทษที่ได้รับจากเชื้อรานี้คือทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น เกิดจุดสีดำบนผลไม้ เป็นต้น ประโยชน์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ใช้ในกระบวนการหมัก ทำให้เกิดอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก (citric acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) และกรดแกลลิก (gallic acid) เป็นต้น ในขณะที่เจริญเติบโต เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ จะปล่อยเอนไซม์หลายชนิดออกมาย่อยอาหาร เช่น แอมิเลส (amylase) กลูโคแอมิเลส (glucoamylase) และเซลลูเลส (cellulases) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิจัยหลายท่านทำการศึกษาทดลองผลิตเอนไซม์แอมิเลส กลูโคแอมิเลสและเซลลูเลส จากวัตถุดิบต่าง ๆ ที่เหมาะสมด้วยเชื้อรา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป ซึ่งปัจจุบันนี้ก็ได้อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวด้วยเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ กันอย่างกว้างขวาง และเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงจึงใช้วิธีการทาง พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา และแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> ก็เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ถูกปรับปรุงขึ้นมาจากสายพันธุ์เดิมแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลสูง และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อซาเพ็คด็อกซ์ ซัพพลีเมนต์อะการ์ (Czapek dox supplemented agar)

เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแบ่งเป็นน้ำตาลสูง และผ่านการทำให้กลายพันธุ์มาแล้ว เชื้อราสายพันธุ์นี้นอกจากจะมีเอนไซม์แอมิเลส (amylase enzyme) แล้วยังมีเอนไซม์เซลลูเลส (cellulases enzyme) ด้วย เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อราจะมีความคงตัวสูง (high stability) และไม่ค่อยถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารปนเปื้อนในวัตถุดิบ โดยเฉพาะวัตถุดิบที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จำพวกขี้เลื่อย หรือเศษกระดาษจากโรงพิมพ์ เป็นต้น [7]



วัสดุเหลือทิ้งที่เป็นเซลลูโลสก่อให้เกิดปัญหาทางมลพิษต่อสภาวะแวดล้อมเป็นอย่างมาก และนับวันจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามความเจริญของสังคม นักวิจัยหลายท่านเห็นว่าควรนำเอาวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาทำให้เกิดประโยชน์ โดยการเปลี่ยนรูปของเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส การเติมเอนไซม์เซลลูเลสลงในวัสดุเหลือทิ้งมีค่าใช้จ่ายสูง [2] และเห็นว่าเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงหันมาใช้สิ่งมีชีวิตในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งราคาถูกกว่าการใช้เอนไซม์ และสิ่งมีชีวิตที่มักนำมาใช้ได้แก่ เชื้อรา ไทรโคเดอร์มา ไวไรด์ (*Trichoderma viride*) และแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ปัจจุบันจะนิยมใช้เชื้อรา ไทรโคเดอร์มา ไวไรด์ มากกว่า เพราะเชื้อรา ไทรโคเดอร์มา ไวไรด์ นี้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่สมบูรณ์ คือมีทั้งชนิด  $C_1$  และ  $C_x$  ส่วนเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ จะมีเฉพาะเอนไซม์เซลลูเลสชนิด  $C_x$  เท่านั้น แต่อย่างไรก็ดีเชื้อรา ไทรโคเดอร์มา ไวไรด์ ก่อให้เกิดปัญหาในการปนเปื้อนสูง เป็นผลเสียต่อโรงงานและห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นการใช้เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ซึ่งเป็นเชื้อราคนละตระกูลกัน น่าจะดีกว่า จึงได้ทำการศึกษาทดลองเอาเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์  $Ph_1$  มาปรับปรุงประสิทธิภาพใหม่ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงขึ้นกว่าเดิม โดยใช้วิธีการง่าย ๆ ค่าใช้จ่ายถูก ถึงแม้ว่าจะไม่ทันสมัยดังเช่นการตัดต่อยีน (gene) ก็ตามแต่เมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการตัดต่อยีนและผลของงานแล้วเห็นว่าวิธีที่ใช้ยูกุ่มค่ากว่า

อนึ่งจากการค้นคว้าของ Ghose และ Pathak (review, 1973) [3] พบว่าในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา บางทีก็มีปฏิกิริยาของไฟเทส (phytase) ร่วมด้วย ดังนั้นถ้าจะใช้เชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์  $Ph_1$  ที่ปรับปรุงประสิทธิภาพแล้วไปย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจำพวกเศษขุนและเศษฝ้ายจากโรงงานทำที่นอนเพื่อเป็นอาหารสัตว์แล้ว นอกจากจะลดมลภาวะเป็นพิษแล้ว อาหารสัตว์ที่ได้ยังมีคุณค่าทางอาหารสูงอีกด้วย เพราะมีส่วนประกอบของไฟเทต (Phytate) ซึ่งเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์จำพวกเป็ด ไก่ และหมู เป็นต้น

ประเทศไทยมีโรงงานทำที่นอนและใช้วัสดุจำพวกขุนเป็นจำนวนมาก ดังนั้นสัณฐานจึงก่อให้เกิดปัญหามลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ถ้าสามารถนำเอาสัณฐานไปใช้ประโยชน์อื่น เช่น การทำเป็นอาหารสัตว์โดยวิธีทางชีววิทยา ก็จะลดการเกิดมลภาวะเป็นพิษให้กับโรงงานเป็นอย่างดี นอกจากนี้แล้วยังเพิ่มคุณค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกเซลลูโลสอีกด้วย ผู้วิจัยจึงได้นำเอาเชื้อราที่พบโดยบังเอิญ ณ ห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยสิงคโปร์ ซึ่งผ่านการทดสอบและ

ปรับปรุงประสิทธิภาพแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 6 และสายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 81 และสายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 500 มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายใต้น้ำสายพันธุ์ที่ปลูกภายในประเทศ ซึ่งในการศึกษาทดลองต่อไปนี้จะเรียกเชื้อราที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพสั้น ๆ ว่า เชื้อราสายพันธุ์กลาย 6, 81 และ 500 ตามลำดับ และก่อนดำเนินการทดสอบ จำเป็นต้องคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อราที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุดเพียงสายพันธุ์เดียว จากจำนวนที่กล่าวมาแล้ว 3 สายพันธุ์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทดลองครั้งนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงใช้ประโยชน์ต่อการย่อยสลายใต้น้ำวัสดุเหลือทิ้งในโรงงานให้เป็นอาหารสัตว์ด้วยเชื้อราแก่ผู้สนใจต่อไป

## วัตถุประสงค์

### วัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลอง

1. เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของเชื้อรา สายพันธุ์กลาย แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> และสายพันธุ์กลายใหม่ ได้แก่ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 6 แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ 81 และสายพันธุ์กลายใหม่ แอสเพอร์ จิลลัส ไนเจอร์ 500 ต่อการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา สายพันธุ์กลาย แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> สายพันธุ์กลายใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายเซลลูโลสต่อการย่อยสลาย ไลโนน วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

### ประโยชน์ของการศึกษาทดลอง

1. ทำให้ทราบถึงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราอย่างง่าย ๆ รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง
2. ทราบถึงวิธีการเพิ่มโปรตีนในไลโนนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป

### ระยะเวลาในการศึกษาทดลอง

- 1 ปี (ตุลาคม 2533 - กันยายน 2534)

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุ อุปกรณ์

#### 1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> สายพันธุ์ที่ได้มาจากห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยสิงคโปร์ ซึ่งได้ทำการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงขึ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร (250 nm) เชื้อราที่เหลือรอดร้อยละ 1 จำนวน 500 โคโลนี นำมาคัดเลือกประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลส เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> ได้สายพันธุ์กลายใหม่ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 6 สายพันธุ์ 81 และ สายพันธุ์ 500 ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูง (วิธีการและรายละเอียดตามรายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ ฉบับที่ 50 ปีงบประมาณ 2535) [1]

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายสำหรับเชื้อจาก

อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

##### 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งใช้อาหารสำเร็จ ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสูตรและวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

###### 2.1.1 ซาเพ็คด็อกซ์ซัพพลีเมนต์อะการ์ (Czapek dox supplemented agar)

|                                                                            |      |      |
|----------------------------------------------------------------------------|------|------|
| ซูโครส (sucrose)                                                           | 30   | กรัม |
| โซเดียมไนเตรด (sodium nitrate)                                             | 2    | กรัม |
| ไดเบสิกโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต<br>(di-basic potassium hydrogen phosphate) | 1    | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride)                                     | 0.5  | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate)                                      | 0.5  | กรัม |
| เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulphate)                                          | 0.01 | กรัม |
| อะการ์ (agar)                                                              | 12.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น                                                                   | 1    | ลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่น้ำกลั่น ต้มให้ละลาย ทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส และปรับความเป็นกรด - ด่าง (pH) สุดท้ายประมาณ 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวก่อนนำไปใช้

2.1.2 มินิมอลมีเดียอะการ์ (Minimal Medium agar) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า เอ็ม เอ็ม อะการ์ (MM agar) คืออาหารเลี้ยงเชื้อซาพิค็อกซ์ฟอสเฟต อะการ์ที่มีกลูโคส (glucose) ผสมอยู่ร้อยละ 1

## 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Liquid medium)

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| กลูโคส                          | 10 กรัม  |
| โซเดียมไนเตรด                   | 2 กรัม   |
| ไดเบสิกโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต | 1 กรัม   |
| โพแทสเซียมคลอไรด์               | 0.5 กรัม |
| แมกเนเซียมซัลเฟต                | 0.5 กรัม |
| เฟอร์รัสซัลเฟต                  | 0.1 กรัม |
| น้ำกลั่น                        | 1 ลิตร   |

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด - ด่าง สุดท้ายประมาณ 7.0 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นก่อนนำไปใช้

## 2.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือคลอไรด์อยู่ร้อยละ 0.89

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8.9 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลูกบาศก์เดซิเมตร หรือ 1 ลิตร แบ่งบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร และหลอดทดลองขนาด 150x20 มม. จำนวนหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นก่อนนำไปใช้

### 3. วัตถุดิบ สำหรับใช้ทดสอบประสิทธิภาพใช้เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน (carbon source) ของจุลินทรีย์ ได้แก่

3.1 แอลฟา - เซลลูโลส ( $\alpha$  - cellulose) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 ใสนุ่น

นำฝักนุ่นที่ได้จากชาวบ้านมาแกะเปลือกออก เอาเนื้อนุ่นและเมล็ดออก เหลือแต่ได้ นำไปปั่นหรือบดให้ละเอียด ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดสอบ

3.3 เซลโลบิโอส (cellobiose) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4 แป้ง (soluble starch) ของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 4. อุปกรณ์

1. ตู้บเพาะเชื้อ (Incubator) รุ่น B 6420 เครื่องหมายการค้า Heraeus ประเทศเยอรมนี
2. เครื่องเขย่า (Incubator Shaker) รุ่น 082540 G-2.5 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ตู้อบอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส Memmert รุ่น UBS 600 ของประเทศเยอรมนี
4. เครื่องนับเม็ดเลือด Haemocytometer ของ AO Scientific Instruments USA
5. กล้องจุลทรรศน์ เครื่องหมายการค้า โอลิมปัส ของประเทศญี่ปุ่น
6. เครื่องชั่ง รุ่น LC 6200 เครื่องหมายการค้า Sartorius ประเทศเยอรมนี
7. เครื่องชั่ง รุ่น AT201 เครื่องหมายการค้า Mettler ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. เครื่องกลั่นในเตรเจน เครื่องหมายการค้า BAIRD & TATLOCK LTD. ประเทศอังกฤษ
9. ขวดแก้ว เกลดดาห์ล (Kjeldahl Flasks) สำหรับย่อยสลายตัวอย่างในการวิเคราะห์โปรตีน
10. กระดาษกรอง Whatman #2
11. ขวดแก้วทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flasks) ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร ของบริษัท KIMBLE สหรัฐอเมริกา
12. ปิเปตแก้ว (Serological Pipets) ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร ของบริษัท KIMBLE สหรัฐอเมริกา
13. Whirl mixer ใช้สำหรับเขย่าสปอร์ในสารละลาย เครื่องหมายการค้า Vortex Geniez รุ่น G-560E ประเทศสหรัฐอเมริกา

14. ตู๊ปราศจากเชื้อใช้สำหรับถ่ายเชื้อรา เครื่องหมายการค้า Astec รุ่น SC 1200 ประเทศ  
อังกฤษ

## วิธีการ

วิธีการศึกษาทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการย่อยสลายเซลลูโลส

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กลายใหม่ 6, 81 และ 500 เพื่อคัดเลือกเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุดเพียงสายพันธุ์เดียว เพื่อนำไปย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกเซลลูโลสใช้เป็นอาหารสัตว์ ดังนั้น การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส จึงใช้ปริมาณเซลล์อบแห้ง (dry cells) เป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจากเซลล์เป็นแหล่งของโปรตีน เชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่สายพันธุ์ใดที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในการย่อยสลายเซลลูโลส จึงมีประสิทธิภาพสูง

2. ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการย่อยสลายไส้หนู

เชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 1 แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูง นำมาทดสอบประสิทธิภาพต่อการย่อยสลายไส้หนู ซึ่งเป็นเซลลูโลสชนิดหนึ่งที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการ ความสามารถในการแปรสภาพไส้หนูเพื่อใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตของเชื้อราคือประสิทธิภาพของเชื้อรานั้น วัตถุประสงค์ในการนำเชื้อรามาแปรสภาพไส้หนูเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โปรตีนคือสิ่งสำคัญ ดังนั้น ประสิทธิภาพของเชื้อราในขั้นตอนนี้วัดได้จากการแปรสภาพไส้หนูและปริมาณค่าของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น

1. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการย่อยสลายเซลลูโลส (ปรับปรุงมาจากวิธีของ Nasuno, S.T และคณะ 1971 และ Nga, B.H 1973 [4] [5]) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ คือ

- 1.1 นำเอาสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสายพันธุ์กลายใหม่ 6 , 81 และ 500 เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็ม เอ็มอะการ์ อบเพาะเชื้อในตู๊อบเพาะเชื้อ เครื่องหมายการค้า Heraeus รุ่น B6420 ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 3 - 5 วัน จะมีสปอร์สีดำเกิดขึ้น

- 1.2 นำสปอร์ของเชื้อราจากข้อ 1.1 ในแต่ละสายพันธุ์ ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สายพันธุ์ละ 1 หลอด เขย่าให้ สปอร์แตกตัวเป็นอิสระไม่เกาะกัน นับจำนวนสปอร์ ด้วยเครื่องมือนับเม็ดเลือด Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตามภาคผนวก ง) ได้จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร คำนวณแล้วทำให้สารละลายนั้นมีจำนวนสปอร์ของเชื้อราอยู่  $10^6$  สปอร์ต่อ มิลลิลิตร
  - 1.3 นำสารละลายจากข้อ 1.2 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีแอลฟา - เซลลูโลสผสมอยู่ร้อยละ 2 จำนวน 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
  - 1.4 นำไปเข้าเครื่องเขย่า (incubator shaker) ของ New Brunswick รุ่น 082540 G-2.5 ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุนจะเปลี่ยนเป็นใส และมีเม็ดกลมเล็กๆ คล้ายเม็ดสาหร่ายเป็นจำนวนมาก เม็ดกลมเล็กๆ นี้คือเซลล์หรือสปอร์ของเชื้อราที่เกิดขึ้นใหม่ (Biomass) ลักษณะเช่นนี้แสดงว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ ถ้าสายพันธุ์ใดไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสถึงแม้ว่าจะเขย่านานถึง 5 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อยังคงสภาพเดิมไม่เปลี่ยนแปลง (ผลการศึกษาดังกล่าวที่ 1-5 )
  - 1.5 นำขวดแก้วจากข้อ 1.4 ที่มีเซลล์ของเชื้อราในแต่ละสายพันธุ์ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman #2 เซลล์ที่กรองได้นำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักของเซลล์ ในแต่ละสายพันธุ์นั้น ด้วยเครื่องชั่ง Satorius ผลิตภัณฑ์ประเทศเยอรมนี (ดังตารางที่ 1)
2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการย่อยสลายได้นั้นมีวิธีการดังนี้:-
    - 2.1 นำเชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>2</sub> สายพันธุ์กลาย 81 ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าให้ปริมาณเซลล์สูง ไปเพาะลงในจานเพาะเชื้อซาพิคด็อกซ์ ชัพพลีเมนต์ อะการ์ แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 วัน เพื่อให้มีสปอร์เกิดขึ้นมาก
    - 2.2 ใช้เข็มเย็บเชื้อ (loop) เผลาไฟแล้วทิ้งให้เย็น เขี่ยเอาสปอร์ของเชื้อราออกมาใส่ในสารละลาย โซเดียม คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.89 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนสปอร์แตกตัวเป็น



อิสระไม่เกาะกันเป็นก้อน นับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

- 2.3 นำสารละลายสปอร์จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด ความจุ 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวซึ่งมีไล่นูนบดละเอียด และแบ่งผสมอยู่ร้อยละ 1 จำนวน 200 มิลลิลิตร อัตราส่วนของไล่นูนต่อแบ่ง คือ 1 : 1 ) นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน
- 2.4 นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman #2 ตะกอนที่กรองได้นำไปทำให้แห้งโดยอบในตู้อบเครื่องหมายการค้า Memmert ประเทศเยอรมนี ที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หา ปริมาณโปรตีน

**หมายเหตุ** การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ต่างกันเพราะในวิธีที่ 1 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพในการ ย่อยสลายเซลลูโลสสูง ทั้ง 3 สายพันธุ์มาจากสายพันธุ์เดิมเดียวกัน จึงใช้ dry cell เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งง่ายและประหยัด ส่วนวิธีที่ 2 เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ เชื้อราที่ผ่านการทดสอบจากวิธีที่ 1 แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส สูง มาทดสอบการย่อยสลายไล่นูน ประสิทธิภาพดูจากการแปรสภาพของไล่นูนให้ หมดไปกลายเป็นเซลล์ของเชื้อรา (Biomass) การหาค่าโปรตีนไม่ใช่การทดสอบประ สสิทธิภาพ แต่เป็นการหาค่าโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อรา หลังการย่อยสลายไล่นูน ทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไล่นูนจะมีคุณค่าอาหารโปรตีนอยู่ ร้อยละเท่าใด ซึ่งสำคัญต่อการที่จะนำไปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป

## ผลการศึกษาทดลอง

### 1. การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส

จากการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา สายพันธุ์ 6, 81 และ 500 โดยใช้สายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> เป็นตัวเปรียบเทียบและทำการทดสอบโดยวิธีเขย่าขวดแก้ว พบว่าเชื้อราไม่ทำงาน แอลฟา - เซลลูโลสที่ผสมอยู่ในอาหารเหลวไม่ถูกย่อย ลักษณะยังคงเหมือนเดิมถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการเขย่านานถึง 5 วันก็ตาม ได้มีการศึกษาทดลองใส่สารซึ่งเป็นตัวอินดิคเตอร์ (inducer) เช่น เซลโลบิโอสและอื่นๆ ลงไปเพื่อกระตุ้นการทำงานของเชื้อราแต่ปรากฏว่าไม่ได้ผล เนื่องจากว่าสายพันธุ์พี<sub>4</sub> เป็นสายพันธุ์ของเชื้อราที่ทำให้กลายพันธุ์และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส ได้มาจากสายพันธุ์เดิมแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ซึ่งมีเอนไซม์แอมัยเลส (enzyme amylase) ค่อนข้างสูง มีสมบัติในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลมอลโทส (maltose) ได้ดี ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาทดลองเติมแป้งลงไปร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา - เซลลูโลสผสมอยู่ทุกตัวอย่าง ผลปรากฏว่า หลังจากเขย่าขวดนานประมาณ 6 ชั่วโมง แอลฟา - เซลลูโลส เริ่มแปรสภาพเป็นเม็ดกลมเล็กๆ คล้ายเม็ดสาคู อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มใส และใสมากขึ้นเมื่อแอลฟา - เซลลูโลส ถูกย่อยด้วยเชื้อราจนหมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน เม็ดกลมๆ เล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นนี้คือเซลล์หรือสปอร์ของเชื้อรา แยกเซลล์ของเชื้อราออกจากน้ำได้โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง เซลล์ที่แยกได้นำไปทำให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อให้ทราบว่าสายพันธุ์ใดสามารถผลิตเซลล์ได้มาก จะได้นำเชื้อสายพันธุ์นั้นไปทดสอบประสิทธิภาพต่อการย่อยสลายใสน้ำต่อไป ซึ่งผลการศึกษาดังตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าจาก 10 การทดลอง เชื้อราสายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> ให้ปริมาณเซลล์อบแห้งหลังการย่อยสลายเซลลูโลส อยู่ระหว่าง 2.10 ถึง 2.38 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.263 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 6 ให้ปริมาณเซลล์อบแห้ง 2.39 ถึง 2.50 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.453 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 81 ให้ปริมาณเซลล์อบแห้ง 3.29 ถึง 3.49 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 3.391 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเชื้อราสายพันธุ์กลายใหม่ 500 ให้ปริมาณเซลล์อบแห้ง 2.40 ถึง 2.71 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย 2.618 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเมื่อนำผลการทดลองของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ พี<sub>4</sub>, 6, 81 และ 500 ไปหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน จะได้ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.07931, 0.03802, 0.074154 และ 0.105494 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา หลังการย่อยสลาย แอลฟา - เซลลูโลส ( $\alpha$  - cellulose)

| การศึกษาทดลอง               | น้ำหนักเซลล์ของเชื้อราหลังอบแห้ง (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) |                    |                     |                      |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
|                             | สายพันธุ์เดิม $P_4$<br>( $P_4$ )                         | สายพันธุ์กลาย<br>6 | สายพันธุ์กลาย<br>81 | สายพันธุ์กลาย<br>500 |
| 1                           | 2.28                                                     | 2.50               | 3.29                | 2.58                 |
| 2                           | 2.10                                                     | 2.41               | 3.49                | 2.71                 |
| 3                           | 2.27                                                     | 2.50               | 3.34                | 2.71                 |
| 4                           | 2.35                                                     | 2.39               | 3.41                | 2.74                 |
| 5                           | 2.25                                                     | 2.45               | 3.35                | 2.40                 |
| 6                           | 2.24                                                     | 2.44               | 3.35                | 2.63                 |
| 7                           | 2.32                                                     | 2.44               | 3.49                | 2.67                 |
| 8                           | 2.20                                                     | 2.44               | 3.49                | 2.53                 |
| 9                           | 2.38                                                     | 2.50               | 3.36                | 2.54                 |
| 10                          | 2.24                                                     | 2.46               | 3.34                | 2.67                 |
| ค่าเฉลี่ย                   | 2.263                                                    | 2.453              | 3.391               | 2.618                |
| ค่าความเบี่ยงเบน<br>มาตรฐาน | 0.07931                                                  | 0.03802            | 0.074154            | 0.105494             |

นำค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์อบแห้ง และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) มาเขียนเป็นตารางเปรียบเทียบผลที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสสูงสุด

#### การเปรียบเทียบผล

| สายพันธุ์ของเชื้อรา | ค่าเฉลี่ย ( $\bar{X}$ ) | ค่าความเบี่ยงเบน<br>มาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์อบ<br>แห้งที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95<br>( $t_{95}$ ) |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| $P_4$               | 2.263                   | 0.07931                     | 0.0567                                                                     |
| 6                   | 2.453                   | 0.03802                     | 0.0272                                                                     |
| 81                  | 3.391                   | 0.074154                    | 0.0530                                                                     |
| 500                 | 2.618                   | 0.105494                    | 0.0754                                                                     |

ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์อบแห้งที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Confidence limit 95%) ได้จากการคำนวณ โดยใช้สูตร

$$\bar{X} \pm t_{95} S/\sqrt{n}$$

เมื่อ  $\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์อบแห้ง

$S$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$n$  คือ จำนวนการทดลองของเชื้อราในแต่ละสายพันธุ์

$t_{95}$  คือ 2.262 (จากตารางค่าทางสถิติ Appendix table 2 ตามภาคผนวก ค) ใช้ค่า  $n-1$

จากตารางการเปรียบเทียบผลจะเห็นว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์อบแห้งของ

สายพันธุ์ พี<sub>4</sub>                       $2.26 \pm 0.057$

สายพันธุ์กลายใหม่ 6         $2.45 \pm 0.027$

สายพันธุ์กลายใหม่ 81        $3.39 \pm 0.053$

สายพันธุ์กลายใหม่ 500      $2.62 \pm 0.075$

จากค่านี้สามารถจะสรุปได้ว่า สายพันธุ์กลายใหม่ 81 ให้ปริมาณเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> และสายพันธุ์กลายใหม่ 6 และ 500 ตามนัยสำคัญความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

การศึกษาทดลองเน้นการใช้เชื้อราไปย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งจำพวกเซลล์ูลอสเพื่อเป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นสายพันธุ์กลาย 81 จึงเหมาะแก่การที่จะนำไปศึกษาทดลองต่อไป เพราะการที่เชื้อราสร้างเซลล์ได้มากย่อมทำให้มีค่าโปรตีนสูง เพราะโปรตีนก็คือส่วนของเซลล์นั่นเอง (Single - cell - protein)

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อการย่อยสลายไส้ขุน

เนื่องจากไส้ขุนมีน้ำหนักเบา ดังนั้นจึงต้องใช้ขวดแก้วทดลองรูปชมพู่ขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร ในการทดสอบไส้ขุนที่มีน้ำหนัก 1 กรัม แต่ถ้าจะใช้ขวดทดลองที่มีขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร จำเป็นต้องลดปริมาณไส้ขุนลง เพราะมิฉะนั้นแล้วเชื้อราจะย่อยไส้ขุนได้น้อย สำหรับไส้ขุนที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับต่างก่อนนำไปย่อยด้วยเชื้อรานั้นมีผลไม่ต่างกันมากนัก

จากผลการศึกษาทดลองพบว่า หลังจากการเขย่าขวดแก้วทดลองรูปชมพู่ได้ 3 วัน จะเห็นมีเม็ดเล็ก ๆ คล้ายเม็ดสาคูเกิดขึ้น แต่ไส้ขุนบางส่วนยังคงสภาพเป็นไส้ขุนอยู่ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาทดลองใหม่ โดยการนำเอาไส้ขุนไปต้มกับด่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที กรองแล้วนำไปล้างเอาด่างออกให้หมด ทำให้แห้ง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด ดำเนินการทดลองใหม่ตามวิธีเดิม ปรากฏว่าเชื้อราสามารถย่อยสลายไส้ขุนได้ทั้งหมด นำเอาเซลล์ของเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายเม็ดสาคูไปกรอง ทำให้แห้งแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl method) ได้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 15 (ผลการศึกษาทดลอง ดังตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** แสดงปริมาณโปรตีนของไส้ขุนและไส้ขุนหลังการย่อยสลายของเชื้อรา  
สายพันธุ์กลายใหม่ 81

| รายการ                                                      | ปริมาณโปรตีน<br>ร้อยละ |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| ไส้ขุน (วัตถุดิบ)                                           | 3.9                    |
| ไส้ขุนไม่ได้ทำ pretreatment ก่อนนำไปย่อยสลายด้วย<br>เชื้อรา | 6.8                    |
| ไส้ขุนทำ pretreatment ก่อนนำไปย่อยสลายด้วยเชื้อรา           | 15.0                   |

**หมายเหตุ** Pretreatment คือการเอาไส้ขุนไปต้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำให้เป็นกลางก่อนนำไปย่อยสลายด้วยเชื้อรา

### วิจารณ์ผลการศึกษาทดลอง

จากการศึกษาทดลองจะเห็นว่าการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> และสายพันธุ์กลายใหม่ 6, 81 และ 500 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (submerged culture) จำเป็นต้องเติมแป้ง (soluble starch) ลงไปร้อยละ 1 เพื่อเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนในการเจริญเติบโตเริ่มต้น เพราะเหตุที่เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ มีเฉพาะเอนไซม์ เซลลูเลสชนิดซีเอ็กซ์ (C<sub>x</sub> - type) จึงไม่สามารถที่จะย่อยสลาย (break - down) เซลลูโลสโดยตรงได้ เชื้อราไม่สามารถใช้แหล่งธาตุคาร์บอนจากเซลลูโลสจำเป็นต้องเติมแป้งลงไปเพื่อเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนในการเจริญเติบโต แหล่งธาตุคาร์บอนในแป้งที่เติมลงไปนี้จะทำหน้าที่ เปรียบเหมือนเป็นตัว catalyse ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตเร็วและผลิตเอนไซม์ออกมาได้หลายชนิดที่สำคัญคือ เอนไซม์แอมิเลสและเซลลูเลส แอมิเลสจะถูกใช้ในการย่อยแป้งให้หมดไปเป็นน้ำตาลมอลโทส (maltose) การมีน้ำตาลในกระบวนการหมักทำให้เกิดปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์เซลลูเลสในราจึงย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส (glucose) เมื่อไม่เติมแป้งเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เชื้อราไม่เจริญเติบโต การสร้างเอนไซม์จึงไม่เกิดขึ้น ไม่มีการผลิตเซลลูเลส เซลลูโลสจึงไม่ถูกย่อยสลาย ดังนั้นในการใช้เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> และสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ เพื่อย่อยสลายเซลลูโลสจำเป็นต้องเติมแป้งลงร้อยละ 1 เพื่อใช้เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนในการเจริญเติบโต

ไล่นุ่นอาจมีสารบางชนิดเช่น ไขมัน หรือสารตัวอื่นที่ทำให้ยากต่อการย่อยสลายของเชื้อราจำพวก แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ดังนั้นจึงต้องทำให้สารดังกล่าวสลายไปโดยการย่อยสลายเบื้องต้น (pretreatment) ด้วยสารเคมีจำพวกต่าง เช่น โซเดียม ไฮดรอกไซด์ เป็นต้น การย่อยสลายเบื้องต้นนั้นนอกจากจะขจัดสารบางชนิดที่ปิดกั้นเซลลูโลสไว้แล้วยังทำให้เซลลูโลสพองตัวขึ้นและช่วยทำให้ง่ายต่อการย่อยสลายของเชื้อรา ไล่นุ่นจึงแปรสภาพเป็นเซลล์หมดภายใน 24 ชั่วโมง

สำหรับการนำเชื้อราตัวนี้ไปหมักเพื่อย่อยสลายไล่นุ่นของโรงงานทำที่นอน จำเป็นต้องใช้วิธีการหมักแห้ง (solid-state-culture) เพราะโรงงานมีไล่นุ่นเป็นจำนวนมาก และไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ จำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองถึงปริมาณของเชื้อราต่อวัตถุดิบที่ใช้ ปริมาณความชื้นในวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อเชื้อรา และระยะเวลาในการหมักที่เชื้อรา ให้ปริมาณโปรตีนสูง

สุด การย่อยสลายเบื้องต้น (pretreatment) ต้องทำการศึกษาใหม่ว่าใส่ปูน 1 ตัน จะต้องใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละเท่าใด จำนวนกี่ลิตร รดลงไปบนใส่ปูน แล้วคลุมพลาสติกไว้จำนวนกี่วัน จึงจะพอดีต่อการย่อยสลายเบื้องต้น ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์บริการไม่ได้ทำการศึกษาทดลองเพราะเป็นการศึกษาทดลองนอกห้องปฏิบัติการ แต่ข้อมูลจากห้องปฏิบัติการ ทำให้ทราบว่าเชื้อราตัวนี้สามารถย่อยสลายใส่ปูนได้ และถ้าจะให้ผลผลิตที่ได้มีโปรตีนสูงขึ้น จำเป็นต้องทำการย่อยสลายวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนด้วยสารเคมีในทางปฏิบัติจริงอาจใช้สารเคมีตัวอื่น เช่น  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  แทน  $\text{NaOH}$  ก็ได้

การศึกษาดังกล่าวไม่ได้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอันเกิดจากเชื้อรา เพราะว่าเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ และวิธีการศึกษาดังกล่าวใช้วิธีการเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งวิธีการนี้เชื้อราจะไม่สร้างสารพิษ (เอกสารยืนยันดังบทแทรก ข้อ 7) แต่อย่างไรก็ดีเชื้อราสายพันธุ์เดียวกันนี้ถ้านำไปหมักเพื่อย่อยสลายใส่ปูนด้วยวิธีการหมักแห้ง ก่อนนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์จำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอันเกิดจากเชื้อราเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื้อสัตว์นั้น เพราะการหมักแห้งอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราตัวอื่นที่สร้างสารพิษ เช่น แอสเพอร์จิลลัส ฟลาวัส (*Aspergillus flavus*) ที่พบได้ทั่วไปในดิน อาจสร้างสารพิษที่เรียกว่า อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งในตับ ดังนั้นก่อนนำอาหารสัตว์ออกจำหน่ายจำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณของสารพิษนี้และต้องไม่พบ

### สรุปผลการศึกษาทดลอง

จากผลการศึกษาทดลองพอที่จะสรุปได้ว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายใหม่ 6, จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายใหม่ 81 และจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายใหม่ 500 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลสได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม พี<sub>4</sub> ซึ่งในการย่อยสลายทั้ง 4 สายพันธุ์ ต้องการแบ่งเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนเริ่มต้นในการเจริญเติบโต และในจำนวน 3 สายพันธุ์กลายใหม่นั้น สายพันธุ์กลายใหม่ 81 ให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด โดยเปรียบเทียบค่าด้วยปริมาณเซลล์อบแห้งและยืนยันค่าที่ได้ทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งเป็นค่าที่เชื่อถือได้ หลังจากนั้นนำเอาสายพันธุ์กลายใหม่ 81 ไปทดสอบประสิทธิภาพกับไส้หนอน ซึ่งเป็นเซลลูโลสชนิดหนึ่งที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการและจะใช้เป็นวัตถุดิบในการทำอาหารสัตว์ต่อไป จากผลการศึกษาทดลองพบว่าสายพันธุ์กลายใหม่ 81 สามารถย่อยสลายไส้หนอนได้ แต่เป็นเพียงบางส่วน วิเคราะห์โปรตีนได้ร้อยละ 6.8 และเมื่อนำไส้หนอนไปทำ pretreatment ด้วยต่างเพื่อขจัดสารบางอย่างที่เชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ออกไป ผลปรากฏว่า เชื้อราสามารถย่อยสลายไส้หนอนได้หมด และค่าโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 15.0 ซึ่งเพียงพอสำหรับนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ จากผลการศึกษาทดลองนี้อาจสรุปได้ว่า วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกเซลลูโลสควรมีการทำ pretreatment ด้วยสารเคมีก่อน เพื่อช่วยให้เชื้อราสามารถย่อยสลายได้ดีขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าโปรตีนสูงขึ้น

จากการศึกษาทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อราสายพันธุ์ แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ สามารถย่อยสลายไส้หนอนได้ และเพิ่มค่าโปรตีนของไส้หนอนสูงพอที่จะเป็นอาหารสัตว์ได้ จากการศึกษาทดลองในครั้งนี้อาจมีผู้สนใจนำไปศึกษาต่อยอดนอกห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มคุณค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกเซลลูโลส นำมาซึ่งผลดีต่อสถานะแวดล้อมของโรงงานทำที่นอนหรือบ้นฝ้าย จะได้ไม่ต้องมีขยะตกค้าง และเป็นผลดีต่อเกษตรกรด้วย เนื่องจากจะได้มีอาหารสัตว์ให้เปิด ไก่ ในราคาที่ถูกลง



### คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Nga Been Hen, Department of Microbiology, Faculty of Medicine The National University of Singapore ที่ได้ให้เชื้อราแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี<sub>4</sub> สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

คุณวรรณิ สมพร หัวหน้ากลุ่มงานจุลชีววิทยา ที่สนับสนุนแนะนำทางด้านวิชาการ และคุณสุคนธ์ เนคมานุรักษ์ หัวหน้ากลุ่มงานวิเคราะห์ทางโภชนาการที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

คุณสุจินต์ ศรีคงศรี และ คุณสุนทรี เปื้องการ ผู้อำนวยการกอง และหัวหน้ากลุ่มงานชีวเคมี กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่แนะนำ แก้วไข่ ตรวจทานผลงานวิจัยนี้

คุณดำรงศักดิ์ เหล่าแสงธรรม และ ดร. รวิวรรณ วงษ์สมุทร ที่ได้ช่วยเหลือทางด้านสถิติ

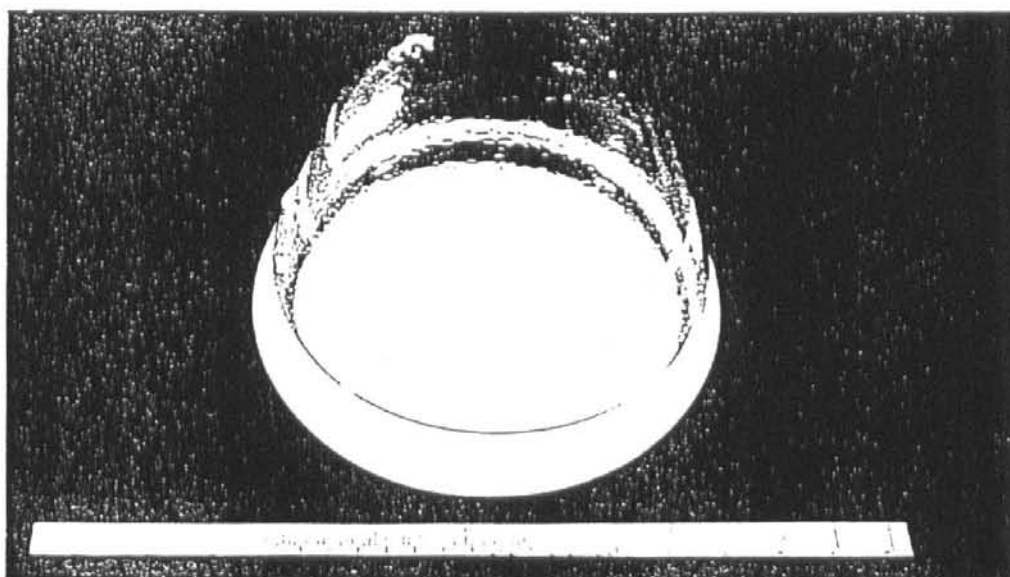
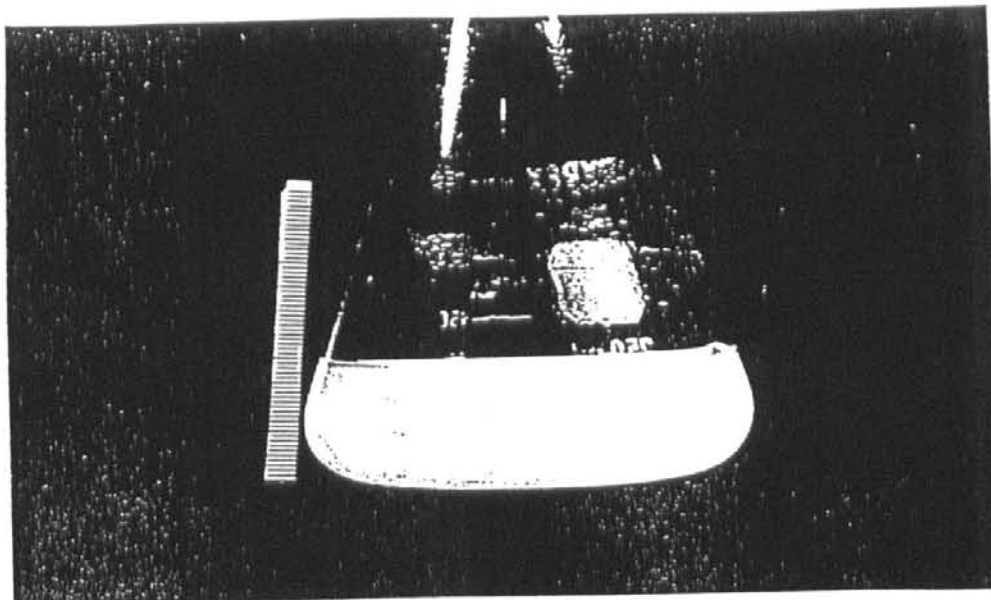
### เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์บริการ 2535 : รายงานกิจกรรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 50 หน้า 122-133
2. Das, k. and Ghose, T.K. (1973) "Economic considerations on cellulase" J. Appl. Chem. Biotechnol. 23, 829 - 836
3. Ghose, T.K. and Pathak, A.N. (1973) Process Biochemistry, 8(5), 20 - 21
4. Hollaender, A. Text book of chemical mutagens "principle and Methods for their Detection" Vol. 2 Chapter 12. *Aspergillus* by J.A. Roper, Department of Genetics Sheffield University Sheffield, England pp. 343 - 361
5. Nasuno, S.T. Chara, and N. Iguchi. 1971 Succesive isolation of proteines hyperproductive mutants of *Aspergillus sojæ* Agric. Giol. Chem. 35 : 291 - 293
6. Nga, B.H. 1973 : *Aspergillus oryzae* in the production of soy sauce and related foodsstuffs : Strain improvement and increased production Research Report, Applied Research Corporation, Signaprove
7. Wiseman, Alan : Handbook of Enzyme Biotechnology First published 1975, Ellis Horwood Limited, England "Enzyme Utilization in Industrail Processes" Chapter 6 : 117

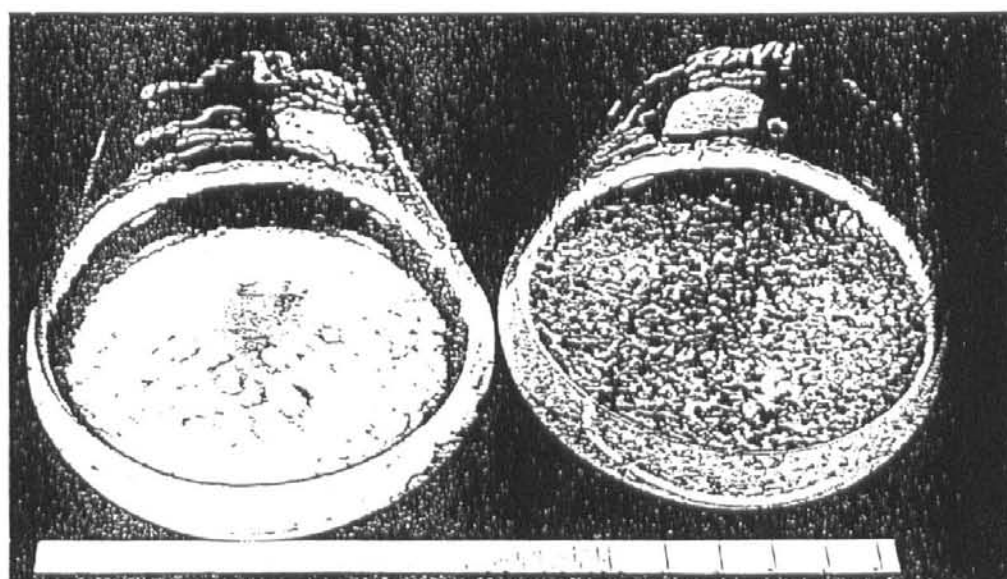
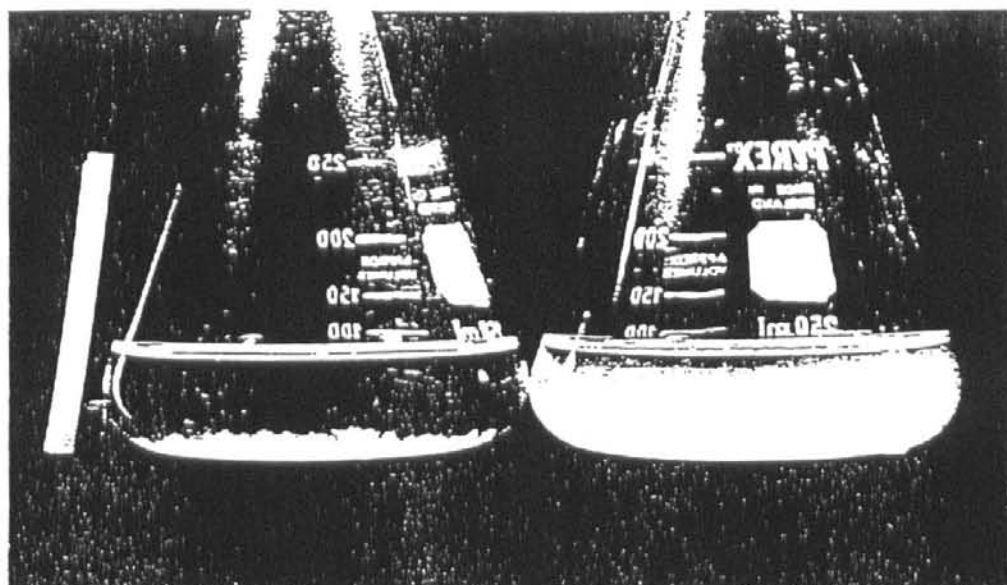
**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก ก

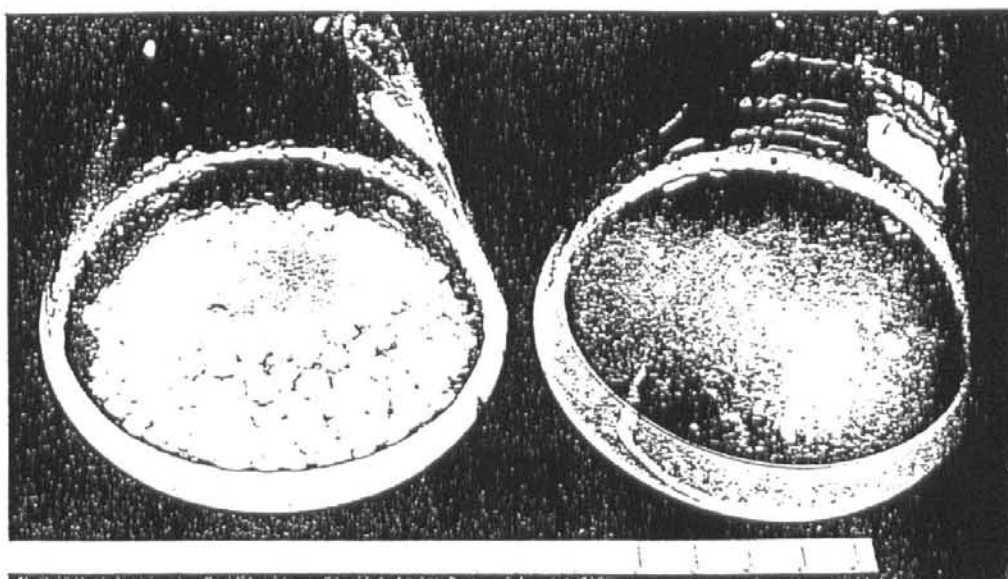
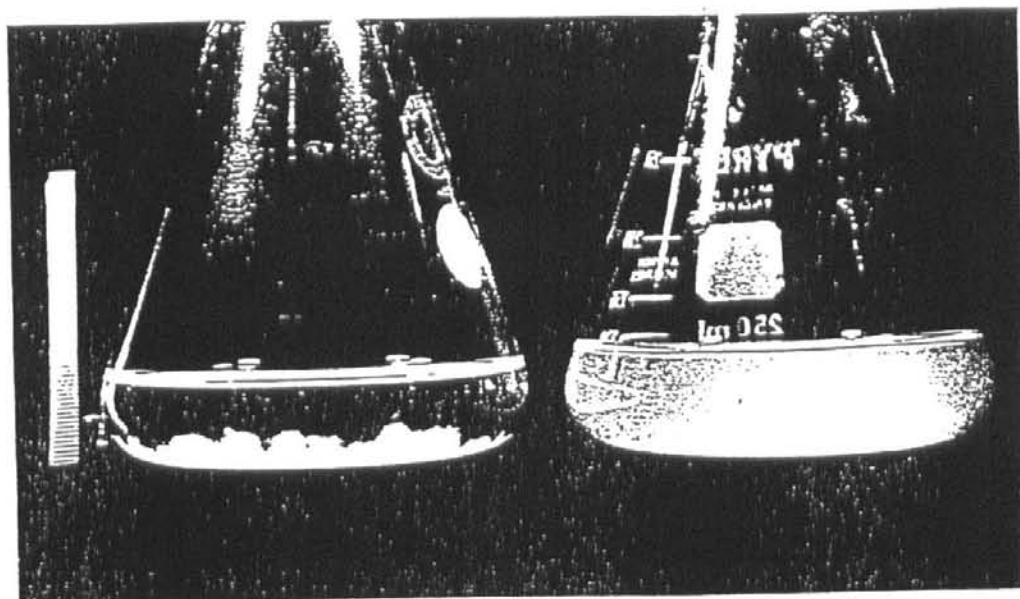
แสดงภาพการย่อยสลายเซลล์โลสของเชื้อรา



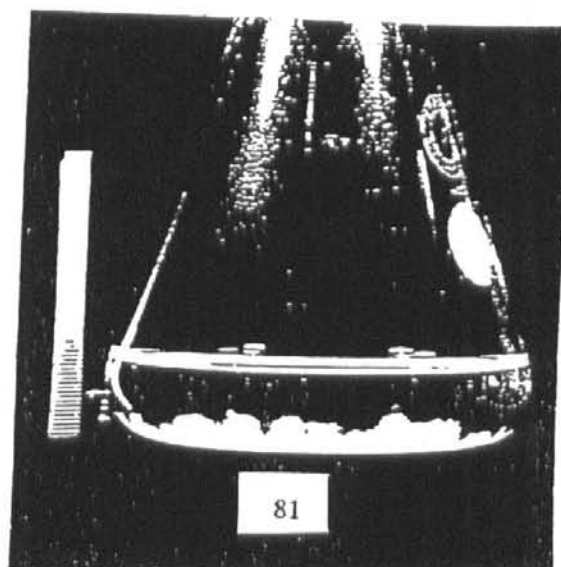
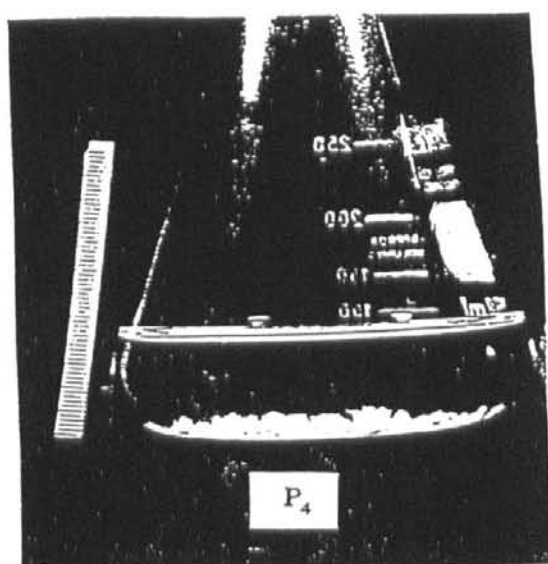
ภาพที่ 1. อาหารเหลวซึ่งมีแอลฟา-เซลลูโลส( $\alpha$ -cellulose) ผสมอยู่ร้อยละ 2



ภาพที่ 2. แสดงการย่อยสลายเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ที่ 4  
สายพันธุ์เดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลกอฮอล์-เซลล์ผสมอยู่ร้อยละ 2 (ภาพ  
ขวามือ) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งลงไปร้อยละ 1 (ภาพซ้ายมือ)



ภาพที่ 3. แสดงการย่อยสลายเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ ที่ 4  
 สายพันธุ์กลาย 81 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอลฟา-เซลล์ูโลสผสมอยู่ร้อยละ 2  
 (ภาพขวามือ) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งลงไปร้อยละ 1 (ภาพซ้ายมือ)

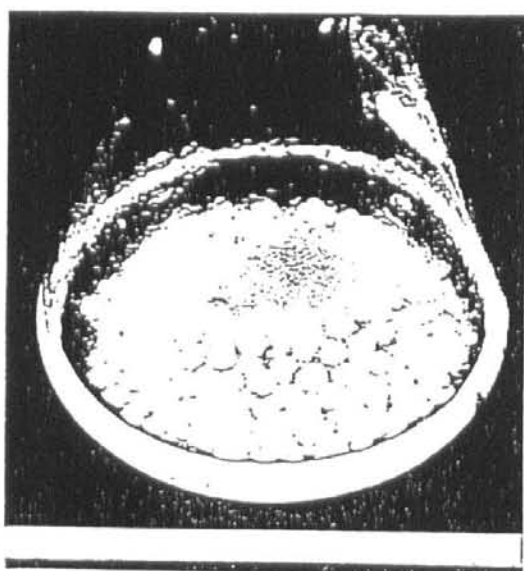


ภาพที่ 4. แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี4 สายพันธุ์เดิม  
และสายพันธุ์กลาย 81 หลังการย่อยสลายแอลฟา-เซลลูโลส



ภาพที่ 5. แสดงปริมาณเซลล์ของเชื้อรา แอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ พี4

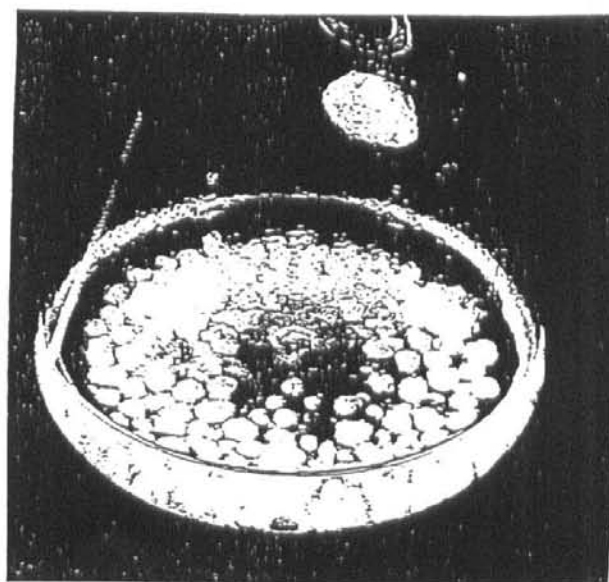
สายพันธุ์กลาย



81



500



6

หมายเหตุ ส่วนที่เห็นเป็นเม็ดกลมเล็กสีขาวคล้ายเม็ดสาเกคือเซลล์ของเชื้อรามิโปรตีน  
สูง สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ น้ำใสที่ได้คือน้ำตาลกลูโคส

ภาคผนวก ข

## ภาคผนวก ข

## วิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (1995) ข้อ 984.13 ซึ่งมีวิธีการทำดังต่อไปนี้คือ

1. ชั่งตัวอย่าง x กรัม ลงในขวดแก้วเจลดาล์ (kjeldahl flask)
2. เติมสารโพแทสเซียมซัลเฟต ( $K_2SO_4$ ) และคอปเปอร์ซัลเฟต ( $CuSO_4$ ) ลงไป  
จำนวน 10 และ 0.5 กรัม ตามลำดับ
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.  $H_2SO_4$ ) ลงไปตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร
4. นำไปย่อยสลายจนกระทั่งเป็นของเหลวใส
5. ถ่ายตัวอย่างที่ย่อยสลายแล้วลงในขวดกลั่นที่ใช้สำหรับกลั่นไนโตรเจน แล้ว  
ล้างส่วนที่ติดอยู่ในขวดด้วยน้ำกลั่นลงในขวดกลั่นให้หมด (น้ำที่ใช้ล้าง  
ประมาณ 200 มิลลิลิตร)
6. นำขวดกลั่นไปเข้าเครื่องกลั่น BAIRD & TATLOCK LTD รองรับสารที่กลั่นได้ คือ สาร  
แอมโมเนียด้วยกรดโบริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 (4% Boric acid) จำนวน 50 มิลลิลิตร  
ก่อนกลั่นให้เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 (40% NaOH) ลงไปในสาร  
ละลายที่ย่อยสลายแล้ว จำนวน 90-100 มิลลิลิตร
7. เปิดเครื่องกลั่น กลั่นเอาแอมโมเนียออกมาให้หมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที
8. นำเอาสารละลายแอมโมเนียที่กลั่นได้ไปไทเตรต ส่วนที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา  
(back titration) ด้วย กรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (normal) ( $0.1N H_2SO_4$ )  
โดยมีเมทิลเรด (Methyl red) เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) จำนวนปริมาตรของกรดที่  
ไทเตรตได้นำไปคำนวณหาค่าไนโตรเจนทั้งหมดตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ ไนโตรเจน (N) } = \frac{\text{ปริมาตรของกรด} \times \text{ความเข้มข้นของกรด} \times 14}{1000} \times \frac{100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

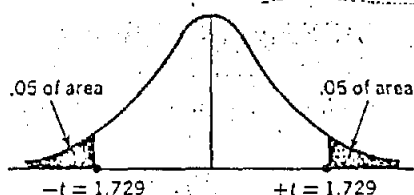
(14 คือ น้ำหนักโมเลกุลของไนโตรเจน)

$$\text{โปรตีน} = N \times 6.25$$

ภาคผนวก ค  
ตารางแสดงค่าทางสถิติ

## ภาคผนวก ก

APPENDIX TABLE 2

Areas in Both Tails Combined for Student's *t* Distribution.\*

EXAMPLE: To find the value of *t* which corresponds to an area of .10 in both tails of the distribution combined, when there are 19 degrees of freedom, look under the .10 column, and proceed down to the 19 degrees of freedom row; the appropriate *t* value there is 1.729.

| Degrees of freedom  | Area in both tails combined |        |        |        |
|---------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|
|                     | .10                         | .05    | .02    | .01    |
| 1                   | 6.314                       | 12.706 | 31.821 | 63.657 |
| 2                   | 2.920                       | 4.303  | 6.965  | 9.925  |
| 3                   | 2.353                       | 3.182  | 4.541  | 5.841  |
| 4                   | 2.132                       | 2.776  | 3.747  | 4.604  |
| 5                   | 2.015                       | 2.571  | 3.365  | 4.032  |
| 6                   | 1.943                       | 2.447  | 3.143  | 3.707  |
| 7                   | 1.895                       | 2.365  | 2.998  | 3.499  |
| 8                   | 1.860                       | 2.306  | 2.896  | 3.355  |
| 9                   | 1.833                       | 2.262  | 2.821  | 3.250  |
| 10                  | 1.812                       | 2.228  | 2.764  | 3.169  |
| 11                  | 1.796                       | 2.201  | 2.718  | 3.106  |
| 12                  | 1.782                       | 2.179  | 2.681  | 3.055  |
| 13                  | 1.771                       | 2.160  | 2.650  | 3.012  |
| 14                  | 1.761                       | 2.145  | 2.624  | 2.977  |
| 15                  | 1.753                       | 2.131  | 2.602  | 2.947  |
| 16                  | 1.746                       | 2.120  | 2.583  | 2.921  |
| 17                  | 1.740                       | 2.110  | 2.567  | 2.898  |
| 18                  | 1.734                       | 2.101  | 2.552  | 2.878  |
| 19                  | 1.729                       | 2.093  | 2.539  | 2.861  |
| 20                  | 1.725                       | 2.086  | 2.528  | 2.845  |
| 21                  | 1.721                       | 2.080  | 2.518  | 2.831  |
| 22                  | 1.717                       | 2.074  | 2.508  | 2.819  |
| 23                  | 1.714                       | 2.069  | 2.500  | 2.807  |
| 24                  | 1.711                       | 2.064  | 2.492  | 2.797  |
| 25                  | 1.708                       | 2.060  | 2.485  | 2.787  |
| 26                  | 1.706                       | 2.056  | 2.479  | 2.779  |
| 27                  | 1.703                       | 2.052  | 2.473  | 2.771  |
| 28                  | 1.701                       | 2.048  | 2.467  | 2.763  |
| 29                  | 1.699                       | 2.045  | 2.462  | 2.756  |
| 30                  | 1.697                       | 2.042  | 2.457  | 2.750  |
| 40                  | 1.684                       | 2.021  | 2.423  | 2.704  |
| 60                  | 1.671                       | 2.000  | 2.390  | 2.660  |
| 120                 | 1.658                       | 1.980  | 2.358  | 2.617  |
| Normal Distribution | 1.645                       | 1.960  | 2.326  | 2.576  |

\* Taken from Table III of Fisher and Yates, *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, published by Longman Group Ltd., London (previously published by Oliver & Boyd, Edinburgh) and by permission of the authors and publishers.

ภาคผนวก ง

วิธีการนับจำนวนสปอร์

## ภาคผนวก ง

วิธีการนับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer)

1. เตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension)

1.1 ใช้เข็มเปียเชื้อ นำเชื้อแล้วเปียสปอร์จากเชื้อราที่มีอายุนาน 7 วัน จำนวน 1 ลูป(loop) ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.89 และผ่านการนำเชื้อแล้ว จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สปอร์กระจายตัวด้วย whirl mixer เจือจางสารละลายสปอร์จนกระทั่งนับได้

1.2 หยด Bromthymol blue indicator ลงในสารละลายสปอร์ที่เจือจาง จำนวน 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากันด้วย whirl mixer อีกครั้งหนึ่ง

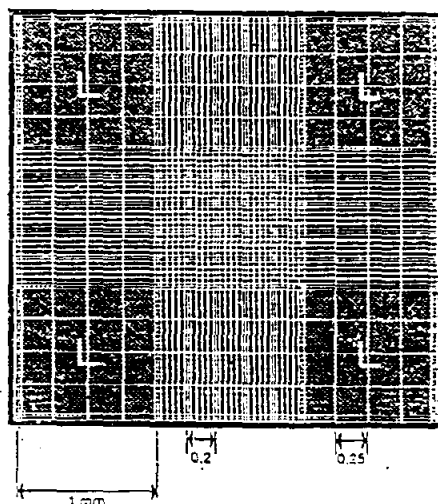
2. เปิดสารละลายสปอร์ จากข้อ 1.2 หยดลงไปบนจุดที่มีสเกล (scale) บนสไลด์ของเครื่องนับเม็ดเลือด (ตามภาพหน้า 30) แล้วปิดด้วย cover slip นำไปนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่มีกำลังขยาย 100 เท่า

3. จำนวนสปอร์ที่นับได้นำมาคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้}}{\text{counted surface} \times \text{chamber depth} \times \text{ปริมาตรที่เจือจาง}} = \text{จำนวนสปอร์/มิลลิลิตร}$$

(0.2 mm<sup>2</sup>)                      (0.1 mm)                      สารละลายสปอร์

ภาพที่ 6



ภาพแสดงสเกล ( scale ) ของเครื่องนับเม็ดเลือด ( haemocytometer )

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ระบุ chamber depth = 0.1 mm

การนับจำนวนสปอร์นับที่ส่วนกลางซึ่งอยู่ในกลุ่ม 5 squares ดังนั้น counted surface =  $0.2 \text{ mm}^2$



### บทแทรก

เปรียบเทียบวิธีการหมักโดยเลี้ยงในอาหารเหลวหรือหมักเปียก (Submerged culture) และการหมักแห้ง (Solid - substrate fermentation)

| Submerged culture                                                                                           | Solid-substrate fermentation                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 Relatively rapid growth and product formation can be achieved by yeasts and bacteria.                     | Slower fermentation due to slow growth of fungi on solid substrate.                                           |
| 2 Mixed or pure cultures of filamentous fungi, yeast and/or bacteria at relatively low cell concentrations. | Mixed fungal cultures predominate; relatively high biomass and enzyme concentrations.                         |
| 3 Aeration and agitation requirements can be high for aerobic cultures.                                     | Relatively low levels of aeration and agitation-the latter due to the shear sensitivity of filamentous fungi. |
| 4 Process scaled-up readily to large fermenter volumes.                                                     | Scale-up problems due to limitations of heat and mass transfer and process control.                           |
| 5 Process control (pH, T, D.O) relatively easy to achieve. Processes suited to computer control.            | Process control more difficult due to three-phase (gasliquid-solid), heterogeneous fermentation.              |
| 6 Product recovery (e.g. cell separation, distillation) can be an important part of overall process.        | Final product obtained from SSF process.                                                                      |
| 7                                                                                                           | Possible problems due to contamination and mycotoxin production.                                              |

คัดลอกจากหนังสือ Australian Journal of Biotechnology Vol. 2 No.1, June 1988 หน้า 51 ในหัวข้อเรื่อง "A Solid Substrate Fermentation Process for an Animal Feed Product : Studies on Fungal Strain Improvement"