

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์ชนิดและการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม
ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ
ในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย

Identification and Environmental Factors Studies for
Optimal Growth of Effective Microorganisms in
Compost and Sewage biodegradation

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2542

16 พ.ย. 2544

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

สุมาลี เหลืองสกุล

สมใจ ศิริโชค

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คำนำ

ปัญหาขยะและน้ำเสียที่เป็นอยู่ในขณะนี้ เป็นปัญหาระดับชาติที่จะต้องมีการแก้ไข มีการศึกษาถึงการนำจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในขยะและน้ำเสียเพื่อให้สามารถบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จุลินทรีย์ที่ใช้จะต้องสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในขยะและน้ำเสียได้ โดยสามารถผลิตเอ็นไซม์ออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ต่างๆได้ และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้ด้วย จุลินทรีย์ที่เจริญได้จะเปลี่ยนสารที่ได้จากการย่อยสลายให้เป็นชีวมวล ซึ่งจะสามารถแก้ปัญหามลพิษของขยะและน้ำเสียได้ แต่การจะใช้จุลินทรีย์ชนิดใดนั้นจะต้องผ่านการคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ที่พบในขยะและน้ำเสียได้ดี และที่สำคัญต้องไม่แพ้เชื้อโรค ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์และศึกษาปัจจัยทางด้านโภชนาการและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์และการจัดการขยะและน้ำเสียให้เหมาะสมซึ่งจะให้จุลินทรีย์สามารถทำกิจกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2542 คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณทางมหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนในครั้งนี้

สุมาลี เหลืองสกุล และคณะ

บทคัดย่อ

จากการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ 5 กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ xylan, carboxy methyl cellulose, starch, skim milk และ tributyrin ตามลำดับ โดยวิธีการย้อมสีแกรมแบคทีเรียและเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์แล้วศึกษาเปรียบเทียบกับคู่มือการวิเคราะห์เชื้อ พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดของจุลินทรีย์ทุกกลุ่มอยู่ใน Genus *Bacillus* ส่วนเชื้อราทุกชนิดอยู่ใน Genus *Aspergillus* การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและพลังงานและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและพลังงานและอุณหภูมิ พบว่า แบคทีเรีย Sb1 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 เมื่อใช้หญ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Hbb3.2 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 เมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Ma5 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรีย Sk7 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 เมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาการบ่มนาน 24 ชั่วโมง และแบคทีเรีย T5 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 5 เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง จากการศึกษานี้ของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า yeast extract ส่วนเชื้อราให้ผลตรงกันข้ามกับแบคทีเรีย คือใช้ yeast extract ได้ดีกว่า ผลจากการแปรผันอุณหภูมิ พบว่าแบคทีเรียทุกกลุ่มเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37°C ส่วนเชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C ผลการแปรผันความชื้น ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ solid state พบว่า ความชื้น 60 % pH 7 เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่ความชื้น 80 % pH 6-8 เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

Abstract

Five groups of selected microorganisms that had the abilities to decompose xylan, carboxy methyl cellulose, starch, skim milk and tributyrin were identified using Gram 's staining for bacteria and slide culture for molds. All of the bacteria were *Bacillus* spp. whereas all of the molds were *Aspergillus* spp. Various agricultural wastes were utilized to study the optimal carbon and energy sources for growing these selected microorganisms at different temperature. The result showed that grass, rice bran, corn starch and bean oil were the optimal carbon and energy sources for the best growing- bacteria named Sb1 in group 1, Hbb3.2 in group 2 and Sk7 in group 4, Ma5 in group 3, and T5 in group 5, respectively. For nitrogen sources, all of the bacteria utilized peptone better than yeast extract but vice versa in molds. The optimal condition for growing bacteria in solid state culture was 37⁰ C at pH 7 with 60% moisture whereas the optimal condition for growing the molds was 45⁰ C at pH 6-8 with 80% moisture.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	6
วัตถุประสงค์	8
ขอบเขตของการวิจัย	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผล	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	29



บทนำ

มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบอยู่มากมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันและพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น เซลลูเลส ไชเลนเนส และอื่นๆออกมาย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรได้กฏโคส และถ้าให้มีการย่อยสลายต่อก็จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และฮิวมัส (2,3,10,17,29.) และจากการพัฒนาอุตสาหกรรมในด้านต่างๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านอาหาร ทำให้มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้ง โปรตีนและไขมันชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์มากมายหลายชนิด ตลอดจนมีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอส อะไมเลส และไลเปสมากขึ้นและสามารถผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ในเชิงพาณิชย์ได้ (1) ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะใช้จุลินทรีย์เร่งการสลายตัวของสารประกอบอินทรีย์ต่างๆที่มีในขยะและน้ำเสียให้เร็วยิ่งขึ้น มีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบในขยะและน้ำเสียได้ดีมาผลิตเป็นหัวเชื้อที่ใช้ในด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม (6,16,26,40) ในต่างประเทศมีผู้สนใจศึกษาการนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาเติมในขยะและน้ำเสียนอกเหนือไปจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติแล้วเพื่อลดปริมาณของสารพิษและเพื่อให้การสลายตัวของสารอินทรีย์เป็นไปด้วยความรวดเร็ว ในระยะนี้มีการนำเข้าจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในการกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียหลายชนิดแต่ก็อยู่ในขั้นทดลองและโฆษณา เนื่องจากจุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึมที่หลากหลายและต้องการสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน การนำจุลินทรีย์จากต่างประเทศมาใช้ในประเทศอาจไม่ได้ผลเท่าที่ควรและมีราคาแพง การคัดเลือกจุลินทรีย์จากท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดขยะ และบำบัดน้ำเสียแต่ละชนิดในท้องถิ่นจึงน่าจะให้ผลที่ดีกว่า

จากการที่พบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบจากเศษซากพืชและสัตว์ จึงมีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มศักยภาพในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในกองปุ๋ยหมัก การคัดเลือกมักพิจารณาจากความสามารถในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบในขยะและน้ำเสียได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม สิ่งที่จะต้องคอยระวังเกี่ยวกับจุลินทรีย์ คือ จุลินทรีย์ที่ใช้ไม่ควรเป็นเชื้อโรค ควรเป็นจุลินทรีย์ที่มีการจำแนกชนิดเป็นที่แน่นอนแล้ว และควรคำนึงถึงการแข่งขันกันระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกันเองซึ่งอาจจะเกิดขึ้นได้

การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากก่อนที่จุลินทรีย์จะย่อยสลายขยะและบำบัดน้ำเสียได้นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ดีก่อน เนื่องจากการสร้างเอนไซม์จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus subtilis* จะผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงปลายของ log phase และ *Bacillus* บางชนิดผลิตเอนไซม์ในช่วงแรกของ stationary phase (26) เมื่อสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้มากและนำสารที่ได้จากการย่อยสลายไปใช้ในการเพิ่มชีวมวล

ได้ดี ซึ่งจะเป็นผลให้มีการผลิตเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นไปอีก ตลอดจนทำให้จำนวนจุลินทรีย์มากพอที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ตามธรรมชาติ การศึกษาปัจจัยในด้านโภชนาการ เช่น ความต้องการสารอาหารชนิดต่างๆซึ่งจะเน้นสารประกอบที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นหลัก เพื่อให้มีต้นทุนราคาถูก และปัจจัยด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน ปัจจัยเหล่านี้มีผลในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ นอกจากนี้จะได้เป็นข้อมูลข่าวสารที่จะเผยแพร่ให้เกษตรกรที่จะนำจุลินทรีย์ไปใช้เป็นหัวเชื้อได้ทราบข้อมูล ซึ่งจะทำการนำไปใช้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

ปัจจัยทางโภชนาการที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่

1. แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ autotrophic prototrophs ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ ในขณะที่ heterotrophic prototrophs ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน มีรายงานการใช้ soluble starch , glucose , maltose , lactose และ dextrin เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอ็นไซม์ได้ดี (20,23,37,39,44) มีรายงานการใช้น้ำมัน 1-2 % เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตเอ็นไซม์ไลเปส (32,38)

2. แหล่งไนโตรเจน อาจเป็นสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ก็ได้ สารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย ไนเตรด ไนไตรต์ และก๊าซไนโตรเจน ส่วนสารประกอบอินทรีย์อาจได้จากการสลายตัวของเซลล์พืชและสัตว์ จุลินทรีย์ที่ตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ได้แก่ *Azotobacter* , *Rhizobium* , *Clostridium* จะเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นไนโตรเจนอินทรีย์ได้ จุลินทรีย์บางชนิดเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นกรดอะมิโนแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์อื่นที่อยู่ร่วมกันสามารถนำไปใช้ได้ มีรายงานว่า yeast extract , peptone , tryptone และกากถั่วเหลือง เป็นสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี (11,32,36,43) มีรายงานการใช้ peptone 3% ร่วมกับ yeast extract 1% ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* บางสายพันธุ์เพื่อผลิตเอ็นไซม์ lipase

3. แหล่งพลังงาน จุลินทรีย์หลายชนิดใช้สารประกอบอินทรีย์ชนิดเดียวกันเป็นทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งพลังงาน เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก ในขณะที่บางชนิดใช้แป้ง น้ำตาล เซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลสเป็นทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน

4. ธาตุชนิดอื่นๆและสารช่วยการเจริญ เช่น กำมะถัน ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก และสารช่วยการเจริญอื่นๆ จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณไม่มากเท่าคาร์บอนและไนโตรเจน และมักได้รับจากสภาพแวดล้อมในขยะหรือน้ำเสียในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการอยู่แล้ว (18)

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ มีดังนี้

1. อุณหภูมิกับการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นปัจจัยที่สำคัญมากเนื่องจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารในการหมักบูหมักและน้ำเสียมักเป็นพวก mesophils และ thermophils และมักมีอุณหภูมิที่เหมาะสมใกล้เคียงกับอุณหภูมิสูงสุดที่จะเจริญได้ แต่ก็มีบ้างที่เป็น

psychrophils ที่มีบทบาทในการทำลายคราบไขมันในทะเลซึ่งมักมีอุณหภูมิต่ำ และการบำบัดน้ำเสียในเขตหนาว มีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ protease ได้ดี เจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 25-60 องศาเซลเซียส ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีนั้นพบว่าเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส (32,38,43)

2. ความชื้นกับการเจริญของจุลินทรีย์ มีรายงานการผลิตปุ๋ยหมัก พบว่าการให้ความชื้นในกองปุ๋ยหมักเท่ากับ 60 % จะทำให้การย่อยสลายเกิดได้ดี (2)

3. ความเป็นกรด-ด่างกับการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนมีผลต่อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้ว แบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่ pH ใกล้เคียงกลาง ส่วน pH ต่ำสุดและสูงสุดที่จะเจริญได้จะอยู่ที่ 5 และ 9 ตามลำดับ ราส่วนใหญ่ชอบสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างเป็นกรด โดยมี pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 5 และมี pH ต่ำสุดอยู่ระหว่าง 1-3 แอคติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่ pH ใกล้เคียงค่าประมาณ 8 มี pH ต่ำสุด 5.5 เช่นเดียวกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Penicillium* sp. มี pH ต่ำสุด 1.6 สูงสุด 11.1 *Thiobacillus thiooxidans* เจริญได้อย่างรวดเร็วที่ pH ระหว่าง 2.0-3.5 มีรายงานว่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* sp. ซึ่งผลิต alkaline amylase คือ จะเจริญได้ไม่ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกลางและไม่ผลิตเอนไซม์เลข แต่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นด่าง (11,23,30,31,36,42) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีเจริญได้ดีที่ pH ประมาณ 7 (32,38,43)

4. ออกซิเจนกับการเจริญของจุลินทรีย์ ความต้องการออกซิเจนขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรีย *Bacillus* และเชื้อราเป็นพวกต้องการออกซิเจนในการเจริญ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสียได้ดีที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วในระดับจิณิส
2. เพื่อศึกษาปัจจัยทางโภชนาการและทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ขอบเขตของการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นจุลินทรีย์คัดเลือกที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย xylan, carboxy methyl cellulose , starch, skim milk และ tributyrin ได้ดี
2. แหล่งคาร์บอนและพลังงานที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ หญ้า แกลบ ขี้เลื่อย ไร่ข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก
3. แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ peptone , yeast extract
4. อุณหภูมิ กำหนดที่ 37°C , 45°C และ 50°C
5. ความชื้น กำหนดที่ 60% , 70% และ 80%

6. ความเป็นกรด-ด่าง กำหนดที่ 6 , 7 และ 8

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการวิจัยคาดว่าจะทราบชนิดและทราบถึงความต้องการสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงาน และแหล่งไนโตรเจน ตลอดจนสภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการในการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์และการปรับสภาพแวดล้อมของขยะและน้ำเสียให้เหมาะสมต่อการนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดขยะและบำบัดน้ำเสียต่อไป



อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์คัดเลือก

จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ ได้ดีในการวิจัยเบื้องต้นของ สุมาลีและคณะ (5) และนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ 5 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย xylan ได้ดี คือ Sb1, Sb4, Ga26, Hbb3.1 และ Mb22 โดยมี Sb4 ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการย่อยสลายสารสูงสุดเท่ากับ 50 มิลลิเมตร

กลุ่มที่ 2. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย cellulose ได้ดี คือ Hab9, Hbb3.1, Hbb3.2, และ Ga15 โดยมี Hbb3.1 ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการย่อยสลายสารสูงสุดเท่ากับ 63 มม.

กลุ่มที่ 3. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย starch ได้ดี คือ Ga15, Ga20, Hba8 และ Hbd9 โดยมี Ga20 ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการย่อยสลายสารสูงสุดเท่ากับ 34 มม.

กลุ่มที่ 4. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย skim milk ได้ดี คือ Sk7, Sk10 และ Sk13 โดยมี Sk 10 ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการย่อยสลายสารสูงสุดเท่ากับ 44 มม.

กลุ่มที่ 5. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสลาย tributyrin ได้ดี คือ Gb11, Hab4, Had6, Hba11 และ T5 โดยมี T5 ให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการย่อยสลายสารสูงสุดเท่ากับ 32 มม.

2. การวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์

2.1 การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรีย ทำโดยการศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อด้วยวิธีการ ย้อมสีแกรม ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาต่างๆ ที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ชนิดตามที่กำหนด ไว้ใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (9)

2.2 การวิเคราะห์ชนิดของเชื้อรา ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) แล้วศึกษา ลักษณะต่างๆ เช่น เส้นใย โครงสร้างพิเศษ โครงสร้างต่างๆ ที่ใช้ในการสืบพันธุ์ เป็นต้น แล้ววิเคราะห์ ชนิดตามคู่มือ เช่น ตาม Illustrated genera of imperfect fungi ของ Bennett (7)

3 การศึกษาการเจริญในแหล่งอาหารชนิดต่างๆและในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันของจุลินทรีย์

3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละ กลุ่ม ทำโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วศึกษาการเจริญจากการนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยวิธี viable count ในอาหาร plate count agar

3.1.1 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่1 ที่ย่อยสลาย xylan ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผัน แหล่งคาร์บอนและพลังงานได้แก่ หย้าบค และกลีบ 1% โดยการเติมเชื้อที่เลี้ยงใน inoculum medium อายุ 24 ชั่วโมงปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 50 มิลลิลิตรใน flask

ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่า (New Brunswick Scientific Rotary shaker, model Innova 4000) ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 24, 36, 48, 60 ชั่วโมง

3.1.2 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 ที่ย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ได้แก่ จี๊เล็บ และรำข้าวข้าว 1% ทำโดยการเติมเชื้อที่เลี้ยงใน inoculum medium อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 50 มล. ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 60 ชั่วโมง

3.1.3 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ที่ย่อยสลาย starch ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ได้แก่ แป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลัง 1% ทำโดยการเติมเชื้อที่เลี้ยงใน inoculum medium อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 50 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 24, 48 และ 60 ชั่วโมง

3.1.4 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ที่ย่อยสลายโปรตีนได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวข้าว 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำโดยการเติมเชื้อที่เลี้ยงใน inoculum medium อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 50 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง

3.1.5 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 5 ที่ย่อยสลาย tributyrin ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์ม 1% ทำโดยการเติมเชื้อที่เลี้ยงใน inoculum medium อายุ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 50 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 48, 72, 96 ชั่วโมง

3.2 ศึกษาปัจจัยต่างๆของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น และความต้องการออกซิเจน

3.2.1 การแปรผันอุณหภูมิ กำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 37°C, 45°C และ 50°C เนื่องจากการศึกษาในข้อ 3.1.1-3.1.5 ได้ทำที่อุณหภูมิ 37°C แล้ว จึงแปรผันอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ไว้ที่ 45°C และ 50°C เท่านั้น

3.2.2 การแปรผันความชื้น กำหนดความชื้นไว้ที่ 60%, 70% และ 80% ศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารแบบ solid state แล้วแปรผันความชื้น บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.2.1 โดยไม่มีการเติมอากาศ

3.2.3 การแปรผันความเป็นกรด-ด่าง กำหนดที่ 6, 7 และ 8 ศึกษาโดยการ

เลี้ยงเชื้อในอาหารแบบ solid state และให้ความชื้นที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในข้อ 3.2.2 แล้ว
แปรผัน pH และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในข้อ 3.2.1 โดยไม่มีการเติมอากาศ

3.2.4 ความต้องการออกซิเจน กำหนดสภาพที่มีหรือไม่มีอากาศโดยดูผลจากการ
วิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ว่าเป็นชนิดที่ต้องการออกซิเจนหรือไม่

4. การศึกษาความสามารถในการย่อย xylan ทำโดยการนำเชื้อที่เลี้ยงในข้อ 3.1.1 มาปั่นแยก
เซลล์โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sorval model RC 5 plus) นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพ
ในการย่อยสลาย xylan โดยวิธี congo red staining of substrate in a cup plate diffusion assay (13)



ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์คัดเลือก

1.1 ผลการศึกษาจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ถึง 5 จากการย้อมสีแกรมแบคทีเรียและเพาะเลี้ยงเชื้อรา โดยวิธี slide culture พบว่า แบคทีเรียทุกชนิดในทุกกลุ่ม มีรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างเอ็นโดสปอร์ วิเคราะห์ได้ว่าเป็นแบคทีเรียใน Genus *Bacillus* spp. ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปร่างและการติดสีของแบคทีเรีย

รหัสเชื้อ	รูปร่าง	การติดสีแกรม	Genus
Sb1	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Sb4	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Had11	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hbb3.1	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Mb22	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hab9	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hbb3.2	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hba8	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hbd9	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Ma5	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Sk7	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Sk10	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Sk13	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Gb 11	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hab 4	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Had 6	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
Hba 11	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>
T 5	ท่อน, มีเอ็นโดสปอร์	+	<i>Bacillus</i>

จากการศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา Ga26, Ga 15, Ga20 พบว่า เชื้อราทุกชนิดสร้างเส้นใยที่มีผนังกัน สร้าง conidiophore ที่มี conidia อยู่ติดกันเป็นลูกโซ่ Ga 15 มี conidia สีดำ Ga 20 มี conidia สีเขียวอมเหลือง Ga 26 มี conidia สีน้ำตาลอ่อน ราทั้งหมดมี foot cell สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นราใน Genus *Aspergillus* ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะของเชื้อราชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ	ลักษณะ	Genus
Ga15	Septate hypha, conidiophore ไม่มี septum, มี foot cell , มี conidia กลมเรียงต่อกันเป็นสายบน sterigma รอบ vesicle ที่ปลายของ conidiophore , conidia สีดำ	<i>Aspergillus niger</i>
Ga20	Septate hypha, conidiophore ไม่มี septum, มี foot cell , มี conidia กลมเรียงต่อกันเป็นสายบน sterigma รอบ vesicle ที่ปลายของ conidiophore , conidia มีสีเขียวอมเหลือง	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ga26	Septate hypha, conidiophore ไม่มี septum, มี foot cell , มี conidia กลมเรียงต่อกันเป็นสายบน sterigma รอบ vesicle ที่ปลายของ conidiophore , conidia มีสีน้ำตาลอ่อน	<i>Aspergillus</i> sp.

2. การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จากผลการวิเคราะห์ว่า จุลินทรีย์เป็น *Bacillus* และ *Aspergillus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไปจึงเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนทั้งสิ้น

2.1 การศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงาน และอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

2.1.1 จากการเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ซึ่งย่อยสลาย xylan ได้ดีใน production medium ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24, 36, 48, 60 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที พบว่าที่อายุการบ่มนาน 60 ชั่วโมง จุลินทรีย์ทุกชนิดเจริญได้ดีที่สุด โดยมี Sb1 เจริญได้ดีที่สุดในกลุ่ม คือ ให้จำนวนนับสูงสุดเท่ากับ 17×10^8 cfu/ml โดยที่สามารถย่อยสลาย xylan บนอาหารแข็งที่ผสม xylan ได้ดีที่สุดในด้วย ส่วน Ga26 ซึ่งเป็นเชื้อราเจริญได้ช้ากว่าแบคทีเรียทั้งหมด เมื่อนำ crude enzyme มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย xylan ในอาหารแข็งที่ผสม xylan พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ให้บริเวณใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกันที่อายุ 48-60 ชั่วโมง ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C, 45°C และ 50°C พบว่าแบคทีเรียทุกชนิดเจริญที่อุณหภูมิ 37°C ได้ดีที่สุดใน ส่วนเชื้อรา Ga 26 เจริญที่อุณหภูมิ 45°C ได้ดีที่สุดใน และพบว่า Sb1, Sb4, Ga26 ไม่เจริญเลยที่ 50°C ดังตารางที่ 5

เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในอาหารที่มีแกลบเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรีย

ทุกชนิดเจริญในหญาบคได้ดีกว่าแกลบในขณะที่เชื้อราเจริญในแกลบได้ดีกว่า ดังตารางที่ 6 ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 สามารถเจริญโดยใช้หญาบคเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมงได้ดีและให้ผลดีที่สุด

ตารางที่ 3 ผลการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ในอาหารที่มีหญาบคเป็นแหล่งคาร์บอน
ที่อายุการเจริญต่างๆที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ (x 10 ⁷ cfu/ml.)			
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง
Mb22	4800	6980	6100	7830
Had11	6200	7050	7450	7880
Hbb3.1	5130	6250	7350	7830
Sb1	807	10100	15100	17000
Sb4	4100	7350	7750	14900
Ga26	0.0897	0.685	0.242	3.52

ตารางที่ 4 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย xylanของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ในอาหารแข็ง
ที่มีหญาบคเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อายุการเจริญต่างๆที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (มม) 37°C			
	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง
Mb22	24	25	28	28
Had11	27	27	28	28
Hbb3.1	24	26	28	28
Sb1	31	31	32	32
Sb4	31	32	32	32
Ga26	-	16	18	25

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ในอาหารที่มีหญาบค
เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 45°C, 50°C

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ (x 10 ⁷ cfu/ml.)		
	37°C	45°C	50°C
Mb22	7830	2372.5	65.5
Had11	7880	1992.5	455
Hbb3.1	7830	1965	3.85
Sb1	17000	1567.5	-
Sb4	14900	2317.5	-
Ga26	3.52	6.85	-

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 ในอาหารที่มีแกลบ และหมักเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C 60 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^5$ cfu/ml.)	
	แกลบ	หมัก
Mb22	2355	7830
Had11	2110	7880
Hbb3.1	6316	7830
Sb1	196	17000
Sb4	57	14900
Ga26	355	3.52

2.1.2 จากการเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 ที่ย่อย carboxy methyl cellulose ได้ดีในอาหาร glucose-ammonium dihydrogen phosphate medium (pH 6) ที่เติมจีเลอ 1 % เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแทนกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 45°C, และ 50°C ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 60 ชั่วโมง พบว่า Hbb3.2 เจริญได้สูงสุดที่ 37°C คือ 289×10^5 cfu/ml. แบคทีเรียทั้งหมดเจริญที่อุณหภูมิ 37°C ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิอื่น ส่วนเชื้อรา Ga 15 เจริญได้ช้ากว่า และเจริญที่อุณหภูมิ 45°C ได้ดีกว่าที่ 37°C เล็กน้อย และไม่เจริญเลยที่ 50°C ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 จำนวนจุลินทรีย์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจีเลอเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 60 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^5$ cfu/ml.)		
	37°C	45°C	50°C
Hab9	74.8	1.8	0.2
Hbb3.1	172.0	39.6	0.2
Hbb3.2	289.0	18.2	0.7
Ga15	0.3	0.4	-

เมื่อทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 ในอาหาร glucose-ammonium dihydrogen phosphate medium (pH 6.0) ที่เติมรำข้าวเจ้า 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานแทนกลูโคส บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 60 ชั่วโมง พบว่า Hbb3.2 เจริญได้สูงสุด ดังตารางที่ 8 และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีจีเลอกับอาหารที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน พบว่าแบคทีเรีย Hbb3.2 เจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาบ่มนาน 60 ชั่วโมง ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีซีลีเนียมกับรำข้าวเจ้า
เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่ระยะเวลาการบ่มานาน 60 ชั่วโมง

เชื้อทดสอบ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)	
	ซีลีเนียม	รำข้าวเจ้า
Hab9	74.8	5675
Hbb3.1	172.0	1277
Hbb3.2	289.0	7950
Ga15	0.3	0.18

2.1.3 จากการเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ที่ย่อยสลาย starch ได้ดีในอาหารที่เค็มแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพียง 1 % พบว่า ที่อุณหภูมิ 37°C Ma5 เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น ที่ระยะเวลาการบ่มานาน 48 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1030×10^3 cfu/ml. ส่วนเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดที่ 60 ชั่วโมงโดยพบว่า Ga15 เจริญได้ดีกว่า Ga20 โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1.08×10^3 cfu/ml. ดังตารางที่ 9 เมื่อแปรผันอุณหภูมิ พบว่า จุลินทรีย์ทุกชนิดเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37°C และพบว่าเชื้อราไม่เจริญเลยที่อุณหภูมิ 50°C ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 9 การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ที่เจริญในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด
เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่ช่วงอายุต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง
Hba8	64.5	420	83.5
Hbd9	104	940	77.5
Ma5	192	1030	48
Ga15	0.004	0.3	1.08
Ga20	0.003	0.03	0.046

ตารางที่ 10 การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ที่เจริญในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด
เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37°C , 45°C , 50°C ที่ 48 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)		
	37°C	45°C	50°C
Hba8	420	35	34
Hbd9	940	56	8.2
Ma5	1030	71	7.9
Ga15	0.3	0.4	0
Ga20	0.03	0.003	0

เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ในอาหารเค็มเป้งมันสำปะหลัง พบว่าแบคทีเรีย Hba8 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 1365×10^5 cfu/ml. เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ส่วนเชื้อรา Ga15 เจริญได้ดีกว่า Ga20. โดยให้เซลล์สูงสุดเท่ากับ 1×10^5 cfu/ml ดังตารางที่ 11

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเค็มเป้งข้าวโพดกับเป้งมันสำปะหลัง พบว่า จุลินทรีย์ทุกชนิดใช้เป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ดีกว่าเป้งมันสำปะหลัง ยกเว้น Hba8 ที่ให้ผลตรงกันข้าม ดังตารางที่ 9 และ 11 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย Ma5 และเชื้อรา Ga15 เจริญได้ดีที่สุดในกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราตามลำดับซึ่งสามารถใช้เป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่มนาน 48 ชั่วโมงได้ดีที่สุด

ตารางที่ 11 การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 ที่เจริญในอาหารที่มีเป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่ช่วงอายุต่างๆที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^5$ cfu/ml.)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง
Hba8	114	1365	173
Hbd9	9	0.63	3.1
Ma5	14	715	300
Ga15	0.001	1	0.1
Ga20	0.001	nd	0.001

2.1.4 จากการเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 ที่ย่อย skim milk ได้ดีในอาหารที่มีรำข้าวข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน 1 % บ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C Sk 7 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 218×10^5 cfu/ml ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีรำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^5$ cfu/ml.)		
	37°C	45°C	5°C
Sk 7	218	5.7	11.1
Sk 10	198	11.8	11.9
Sk 13	170	4.4	12.2

2.1.5 จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 5 ที่ย่อยสลาย tributyrin ได้ดีในอาหารที่มี น้ำมันถั่วเหลือง 1 % เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C , 45°C และ 50°C พบว่าที่ 37°C แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุดในช่วงอายุ 96 ชั่วโมง ดังตารางที่ 13 และ 14 และเมื่อแปรผันอุณหภูมิ พบว่า T5 เจริญได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 540×10^5 cfu/ml. และเมื่อแปรผัน

แหล่งคาร์บอนและพลังงานเป็นน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 96 ชั่วโมง พบว่า T5 ยังคงเจริญได้สูงสุดในน้ำมันทั้ง 2 ชนิด ผลการทดลองแสดงว่า T5 ใช้ไขมันถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 96 ชั่วโมง ได้ผลดีที่สุด ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 13 การเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงอายุต่างๆ ในการเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็น แหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสเชื้อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)		
	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
Gb 11	0.265	1.9	10
Hab 4	4	15	16.5
Had 6	11.5	44.5	210
Hba 11	5	35	17
T 5	3	2.5	540

ตารางที่ 14 การเจริญของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็น แหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 96 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)		
	37°C	45°C	50°C
Gb 11	10	0.55	-
Hab 4	16.5	-	0.1
Had 6	210	5.5	-
Hba 11	170	25.6	9
T 5	540	-	1

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่อุณหภูมิ 37°C 96 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ ($\times 10^3$ cfu/ml.)		
	น้ำมันถั่วเหลือง	น้ำมันมะกอก	น้ำมันปาล์ม
Gb 11	10	2	9.35
Hab 4	16.5	0.56	0.3
Had 6	210	3.75	10.1
Hba 11	170	0.355	6.1
T 5	540	5.35	187

2.2 การศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

เนื่องจากแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษาเป็น *Bacillus* sp. ทั้งหมด และเชื้อราเป็น *Aspergillus* ในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนจึงได้คัดเลือก Sk 10, Sk 13 , Hbd9 เป็นตัวแทน ของ *Bacillus* และ Ga15 , Ga20 เป็นตัวแทนของ *Aspergillus* และเลือกอาหารที่มีรำข้าวเจ้าเป็น

แหล่งคาร์บอนและพลังงาน เนื่องจากพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหารที่มีรำข้าวข้าวได้ ดีกว่าแหล่งคาร์บอนและพลังงานอื่นๆ เพราะมีสารอาหาร เช่น วิตามิน และ สารช่วยการเจริญเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย และเป็นวัสดุจากการเกษตรราคาถูก จึงเลือกใช้รำข้าวข้าวเป็นตัวแทนของ แหล่งคาร์บอนและพลังงานในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการเลี้ยง Sk10, Sk 13 , Hbd9 , Ga15 และ Ga20 ในอาหารที่มีรำข้าวข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานและแปรผันแหล่งไนโตรเจนได้แก่ peptone กับ yeast extract โดยจัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร ดังตารางที่ 16 บ่มเชื่อนาน 24 ชั่วโมง ที่ ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับแบคทีเรีย และ 45°C สำหรับเชื้อรา เมื่อเปรียบ เทียบแบคทีเรียทั้งหมด พบว่า Sk10 เจริญได้ในอาหารที่เติม peptone (สูตรที่ 4) ได้ดีกว่าอาหารที่ เติม yeast extract (สูตรที่ 3) ดังตารางที่ 16 ในขณะที่เชื้อราทั้ง 2 ชนิดเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร สูตรที่ 3 ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 37°C

รหัสชื่อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ (x 10 ³ cfu/ml.)			
	อาหารสูตร 1 *	อาหารสูตร2 **	อาหารสูตร3 ***	อาหารสูตร 4 ****
Sk10	120	60	164	198
Sk13	37	53	6.4	170
Hbd9	3	11.8	22.8	165

* รำข้าว 1%

** รำข้าว 1 % + peptone 0.2% + yeast extract 0.1 %

*** รำข้าว 1 % + yeast extract 0.1 %

****รำข้าว 1 % + peptone 0.2%

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

รหัสชื่อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ (x 10 ³ cfu/ml.)			
	อาหารสูตร 1	อาหารสูตร2	อาหารสูตร3	อาหารสูตร 4
Ga15	11.7	7.1	202	188
Ga20	8.9	4.4	152	75

2.3 การศึกษาผลของความชื้นที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

เนื่องจากแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษาอยู่ใน Genus *Bacillus* sp. ทั้งหมด และราทั้งหมด อยู่ใน Genus *Aspergillus* ในการทดลองนี้ จึงได้คัดเลือก Sk 10, Sk 13 , Hbd9 เป็นตัวแทนของ แบคทีเรีย และ Ga15 , Ga20 เป็นตัวแทนของเชื้อรา ในการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยการเลี้ยงเชื้อแบบ solid state โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ในข้อ 2.2 สำหรับแบคทีเรีย และสูตรที่ 3 ในข้อ 2.2 สำหรับเชื้อรา แล้วแปรผันความชื้นที่ 60% , 70% และ 80% ตามลำดับ นอก จากนี้ จากการที่แบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาศึกษาเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ส่วนราเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ

45°C จึงบ่มเชื้อที่อุณหภูมิดังกล่าว ผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียทั้งหมดเจริญได้ดีที่สุดที่ความชื้น 60% (ตารางที่ 18) และ Hbd9 เจริญได้ดีที่สุดในกลุ่ม มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 23.2×10^5 cfu/g. ส่วนเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดที่ความชื้น 80% (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีความชื้นระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย ($\times 10^5$ cfu / g.)		
	ความชื้น 60%	ความชื้น 70%	ความชื้น 80%
Sk10	10.9	8.1	5.7
Sk13	21.1	9.2	6.5
Hbd 9	23.2	6.7	7.9

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของราในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ที่มีความชื้นระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนเชื้อรา ($\times 10^5$ cfu / g.)		
	ความชื้น 60%	ความชื้น 70%	ความชื้น 80%
Ga 15	6.4	19.6	30
Ga 20	7.8	7.9	16.8

2.4 การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จากผลการศึกษาในข้อที่ 2.2 และ 2.3 พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่มีความชื้น 60% ส่วนเชื้อราเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ที่มีความชื้น 80% ที่อุณหภูมิ 45°C จึงแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 6 – 8 ได้ผลว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 7 ยกเว้น Sk10 ที่เจริญที่ pH 6 ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 20 ส่วนเชื้อรานั้นเจริญได้ใกล้เคียงกันทุก pH ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 4 ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 60% pH 6, 7, 8 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนแบคทีเรีย ($\times 10^5$ cfu / g.)		
	pH6	pH7	pH8
Sk10	7.9	4.5	3.4
Sk13	5.6	14.9	5.2
Hbd 9	3.1	16.9	14.4

ตารางที่ 21 จำนวนราทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 3 ที่อุณหภูมิ 45°C
ความชื้น 80% pH 6,7,8 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	จำนวนเชื้อรา ($\times 10^5$ cfu / g.)		
	pH6	pH7	pH8
Ga 15	7.1	7.5	7.0
Ga 20	5.3	5.0	5.4



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ 5 กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบ xylan, carboxy methyl cellulose, starch, skim milk และ tributyrin พบว่า แบคทีเรียทุกชนิดของ จุลินทรีย์ทุกกลุ่มอยู่ใน Genus *Bacillus* ส่วนเชื้อราทุกชนิดอยู่ใน Genus *Aspergillus* จากการ ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและพลังงานและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า แบคทีเรีย Sb1 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 เมื่อใช้หญ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Hbb3.2 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์ กลุ่มที่ 2 เมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาการบ่มนาน 60 ชั่วโมง แบคทีเรีย Ma5 เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 3 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่ง คาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่มนาน 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรีย Sk7 เจริญ ได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 4 เมื่อใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่ระยะเวลาการบ่มนาน 24 ชั่วโมง และแบคทีเรีย TS เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มที่ 5 เมื่อใช้น้ำมัน ถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง จากการ ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า yeast extract ส่วนเชื้อราให้ผลตรงกันข้ามกับแบคทีเรีย คือ ใช้ yeast extract ได้ดีกว่า ผลจากการแปรผันอุณหภูมิ พบว่า แบคทีเรียทุกกลุ่มเจริญได้ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 37°C ส่วนเชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C ผลการแปรผันความชื้น ความ เป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพ solid state พบว่า ความชื้น 60 % pH 7 เหมาะสมกับ การเจริญของแบคทีเรีย ในขณะที่ความชื้น 80 % pH 6-8 เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

การที่แบคทีเรียคัดเลือกอยู่ใน Genus *Bacillus* ได้ผลเช่นเดียวกับรายงานหลายชิ้นที่พบว่า *Bacillus* สามารถย่อยสลายสารประกอบ เช่น starch, cellulose, hemicellulose และ lipid ได้ดี (11,23,24,30,31,35,38,44) และจากการวิเคราะห์เชื้อราพบว่าเป็น *Aspergillus* ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานที่กล่าวถึงว่า *Aspergillus* สามารถย่อยสลาย cellulose และ xylan ได้ดี (3) และนอกจากนี้ เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่า *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วและเต้าเจี้ยวมีความ สามารถในการย่อยสลายโปรตีนและแป้งได้ดี เช่นเดียวกับ *Aspergillus niger* ที่ย่อยสลายแป้งได้ดี และสามารถใส่สารประกอบได้หลายชนิดมาก จึงมีการใช้ *Aspergillus niger* ในการย่อยแป้งมัน ลำปะหลังให้เป็นน้ำตาลในการผลิตกรดซิตริกในปัจจุบัน (4)

การที่จุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 สามารถใช้หญ้าเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าเกลือเป็นผลมาจากการที่ส่วนประกอบ ในหญ้ามีย xylan มากกว่าเกลือ และจุลินทรีย์กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่คัดเลือกมาจากจุลินทรีย์ที่สามารถ ย่อยสลาย xylan ได้ดี (5) ผลการทดลองยังพบว่า ความสามารถในการย่อยสลาย xylan จะดีขึ้นตาม อายุการบ่ม (ตารางที่ 4) ส่วนการที่พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ 2 เจริญในซีอิ๊วได้ช้า มีผลจากซีอิ๊ว

เป็นไม้เนื้อแข็ง มีทั้ง cellulose และ lignin ซึ่งการย่อยสลายต้องใช้เวลาานมากกว่านี้ และเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องเป็น inducible enzyme (5,17) จึงทำให้เจริญได้ไม่ดีเท่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นแม้ว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 2 จะคัดเลือกมาจากจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย carboxy methyl cellulose ได้ดีก็ตาม จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งย่อย starch ได้ดีสามารถใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นผลจากสารประกอบทางเคมีในแป้งต่างกัน การใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังจึงควรใช้เวลามากกว่านี้ หรือให้แป้งผ่านกรรมวิธีอื่นก่อนนำมาใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เช่นการย่อยบางส่วนด้วยกรด (4) อีกประการหนึ่งการผลิตแป้งมันสำปะหลังมีการใช้สารฟอกขาวในขณะที่การผลิตแป้งข้าวโพดไม่ใช้ ซึ่งสารดังกล่าวอาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า Hba8 สามารถเจริญในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังได้ดีกว่าแป้งข้าวโพด จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 4 สามารถใช้รำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน พลังงาน และแหล่งไนโตรเจนได้ดีเนื่องจากในรำข้าวเจ้ามีโปรตีนสูงถึง 11-12 % และยังมีสารช่วยเจริญ วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เป็นต้น (28)

สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 5 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทั้งหมดนั้น สามารถใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานได้ดี เป็นผลดีต่อการนำไปใช้ในการบำบัดไขมันในขยะและน้ำเสียเนื่องจากในประเทศของเรานิยมใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มในการประกอบอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย TS ที่เจริญได้ดีที่สุดในจุลินทรีย์กลุ่มนี้ สามารถเจริญได้ดีในน้ำมันทุกชนิด และเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันถั่วเหลือง

เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียตัวแทนทุกชนิด ทำให้สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรที่ 4 ส่วน yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อราจึงเจริญได้ดีในอาหารสูตรที่ 3

ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียอยู่ที่ 60 % อาจเป็นเพราะแบคทีเรียทั้งหมด เป็น *Bacillus* ซึ่งต้องการออกซิเจน และการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาความชื้นที่เหมาะสมมิได้เติมอากาศให้เพราะเลี้ยงในสภาพ solid state การที่ความชื้นต่ำระดับนี้จะช่วยให้มีช่องว่างในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีออกซิเจนเพียงพอในการเจริญ หากความชื้นสูงเกินไปอาจมีผลต่อปริมาณออกซิเจนในช่องว่างของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ สำหรับเชื้อราความชื้นที่เหมาะสมอยู่ที่ 80% เป็นเพราะเชื้อราสามารถแทรกเส้นใยเข้าไปในอาหารและดูดซึมอาหารได้ดี ส่วนเส้นใยที่อยู่ด้านบนของอาหารก็สามารถรับออกซิเจนได้ ผลการทดลองในเรื่องของ pH ที่เหมาะสม ปรากฏว่าได้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Chomsri และคณะ (14) ที่ว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของเอ็นไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* คือ pH 7 ส่วน *Aspergillus* ทั้ง 2 ชนิด ให้ผลผลิตในช่วง pH 6-8 ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Butrindr & Rakariyatham (12) ซึ่งพบว่า *Aspergillus* เจริญและให้กิจกรรมเอ็นไซม์โปรติเอสได้ดีที่ pH 6-8 ในช่วงอุณหภูมิ 37-42 °C

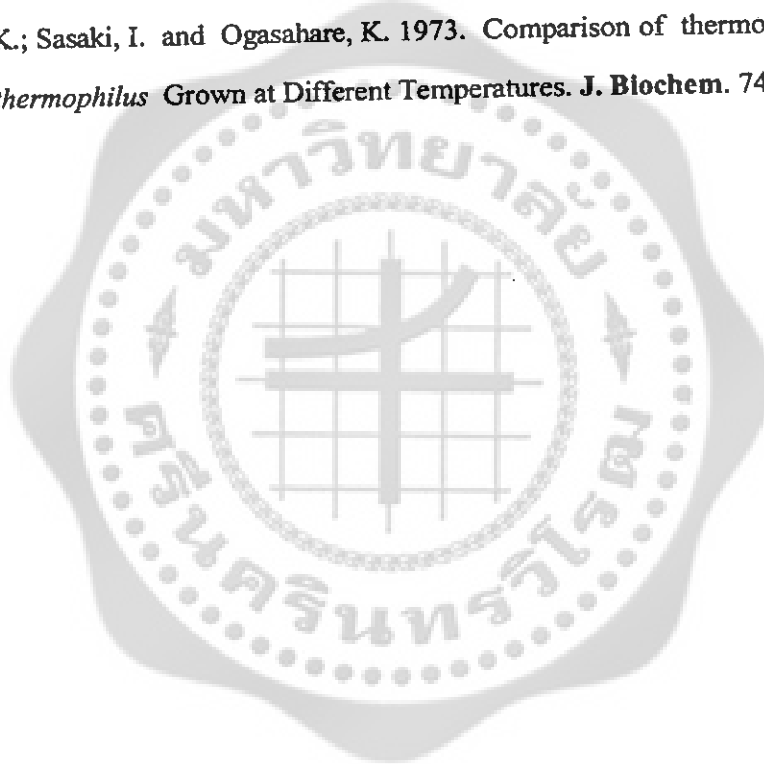
เอกสารอ้างอิง

1. ทนง ภักดิ์พันธ์ 2522. เอ็นไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 225.น.
2. ทิพวรรณ สิทธิรังสรรค์ 2542 ปุ๋ยหมัก ดินหมัก และปุ๋ยน้ำชีวภาพ : เพื่อการปรับปรุงดิน โดยวิธีเกษตรธรรมชาติ สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ
3. วิเชียร กิจปรีชาวนิช วิเชียร สีสุก อัญชริศา สวาท และนภา โล่ห์ทอง 2535. การผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสและไซแทนจากวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรกรรมโดยเชื้อ *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-IF วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26: 296-306.
4. วิเชียร วรพทุทธิพร สิรินทรเทพ เต้าประยูร และงามนิจ นนทโส 2540 การผลิตกรดมะนาวโดยวิธี Submerged Fermentation จากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 23
5. สุมาลี เหลืองสกุล สมใจ ศิริโชค และขจีนาฏ โพธิเวชกุล 2541 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารในขยะและน้ำเสีย วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 15 ฉบับที่ 1 หน้า 4-18
6. อรุณวรรณ หวังกอบเกียรติ อารี ไชยาภินันท์ เสาวนีย์ สุนทรพิทักษ์ และนิติศตปริญญาครี-โท 2538 การใช้ EM ในการบำบัดน้ำเสียและการลดปริมาณสารอาหารในน้ำเสียโดย EM โครงการวิจัย EM และผลของการใช้ต่อสิ่งแวดล้อม โครงการวิจัยร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารประกอบการสัมมนา 157-162.
7. Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th. ed. Macmillan, New York.
8. Bellamy, W. D. 1977. Cellulose and Lignocellulose Digestion by Thermophile Actinomycetes For SCP Production. *Dev. Microbiol.* 18: 249-254.
9. Buchanan, R. E. and Gibbon, N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th. ed. The williams and Wilkins ,Baltimore.
10. Buchholz, K., Puls, J., Godelmann, B. and Dietrichs, H.H. . 1980/1981. Hydrolysis of Cellulosic Wastes. *Process Biochem.* 15(8):37-43.
11. Buonocore, I.; Caporale, C. De Rosa, M. and Gambacorta, A. 1976. Stable, Inducible Thermophilic α -amylase from *Bacillus acidocadarius*. *J. Bacteriol.* 128: 515-521.

- 12 Butrindr, B. and Rakariyatham, N. 2000. Hydrolysis of Mung Bean Flour by Protease. Abstracts The 12th. Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Thailand . p 103
- 13 Carder, J.H. 1986 Detection and Quantitation of Cellulase By Congo Red Staining of Substrates in cup-Plate Diffusion Assay. **Analytical Biochemistry** 153, 75-79.
- 14 Chomsri, N. ; Bavonsombat, S. ; Jomduang, S. and Poosaran, N. 2000. Thermal Stability of Protease Enzyme . Abstracts The 12th. Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Thailand . p 112.
15. Chupong Kanchanalak. 1995. Solid Waste Disposal in Cities, Seminar on Solid Waste Management in the Cities. Chulalongkorn University 6 July .
16. Edwards, C. Thermophiles. 1990. In Edwards, C. (ed) **Microbiology of Extrem Environments**. Open University Press Milton Keynes. 1-32.
17. Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
18. Gandy, A.F. and Gandy, E.T. 1981. **Microbiology for Environmental Scientists and Engineers**. McGraw-Hill, Inc. Tokyo.
19. Guthrie, R. K. 1988. **Food Sanitation**. 3rd ed. An AVI. Book, New York.
20. Halpern, M.G. 1981. **Industrial Enzymes from Microbial Sources**. Noyes Data Corporation. New Jersey.
21. Hobson, P.N. and Poole, N.J. 1988. In Lynch, J.M. and Hobbie, J.E. (ed.) **Micro-organisms in Action : Concepts and Application in Microbial Ecology**. Black well Scientific Publications, London.
22. Hui, Y.H. 1991. **Encyclopedia of Food Science and Technology**. Vol.2. E-H John Wiley and Sons, Inc. USA. 745-746.
23. Ingle, M.B. and Erickson. 1978. Bacterial α -amylase. **Advances in Applied Microbiology**. 24:257-278. .
24. Kokusho, Y., Machida, H. and Iwasaki, S. 1982a. Study on Alkaline Lipase: Isolation and Identification of Lipase Producing Microorganisms. **Agr. Biol. Chem. Soc.** 46(5):1159-1164.
25. Labeda, D. P. and Shearer, M.C. ; Seifert, K.A.; Brand, L.E.; Phaff, H. J. ; Hespell, R.B. ; Lacey, J. 1990. In Labeda, D. P. (ed.) **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. McGraw-Hill Publishing Company, New York.

- 26 Luchai, S. and Dharmsthiti, S. 2000. Mixed Cultures of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Acinetobacter calcoaceticus* for Lipid-Rich Wastewater Treatment. Abstracts The 12th. Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. Thailand . p 163.
27. Macrae, A. R. 1983. Lipase Catalyzed Interesterification of Oils and Fats J. Amer. Oil Chem. Soc. 60(2): 3A-246A..
- 28 Macrae, R., Robinson, R. K. and Sadler, M. J. 1993. Encyclopedia of Food Science Food Technology & Nutrition : Rice. Vol. 6. Academic Press, Sandiago, U.S.A.
29. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom , J. . 1974. Enzymic Hydrolysis of Waste Cellulose. Biotech. Bioeng. 16:141-149.
30. Medda,S. and Chandra, A.K.1980. New Strain of *B. licheniformis* and *B. coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline. J. of Applied Bacteriology. 48: 47-58.
31. Morgan, F. T. and Priest, F.G. 1981. Characterization of a Thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis*. NCIB 6346. J. Appl. Bacteriol. 50: 107-114.
32. Muraoka, T; Ando, T and Okuda, H. 1982. Purification and Properties of A Novel Lipase. J. Biochem. 92 : 1933-1939.
33. Omar, I.C. ,Hayashi, M. and Nagai, S. 1987. Purification and Some Properties of A Thermostable Lipase From *Humicola lanuginosa* No.3. Agr. Biol. Chem. Soc. 51(1):37-45.
34. Ota, Y.,Gomi, K., Kato, S., Sukiura,T. and Minoda,Y. 1982. Purification and Some Properties of Cell-Bound Lipase From *Saccharomycopsis lipolytica*. Agr. Biol.Chem. Soc. 46 (12): 2885-2893.
35. Saito, N. 1973. A Thermophilic Extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys. 155: 290-299-8.
36. Smith, R.E. 1977. Rapid Test Tube For Detecting Fungal Cellulase Production. Appl. and Environ. Microbiol. 33(40):980-981.
37. Sonnleitner,B. 1981. Biotechnology of Thermophilic Bacteria : Growth , Products and Application. Academic Press. New York.
38. Sukihara, A.: Tani, T. and Tominaka, Y. 1991. Purification and Characterization of A Novel. Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. J. Biochem. 109: 211-216.
39. Tagami,H.; Akiba,T. and Horikoshi, K . 1989. Production of Extreamly Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 120-124.

40. Thakur, M. S., Kennedy, M. J. and Karanth, N.G. 1991. An Environmental Assessment of Biotechnological Processes. In Neidleman, S.L., and Laskin, A I. (ed) . **Advances in Applied Microbiology**. Academic Press, 67-83. .
41. Upton, M.E. and Forgaty, W.M.1977. Production and Purification of The Thermostable Amylase and Protease of *Thermomonospora viridis* . **Applied and Environmental Microbiology**. 33: 59-64.
- 42 Windish,W.W. and Mhatre, N.S. 1965. **Microbial Amylase**. In Advanced in Applied Microbiology . (W.W. Umbreit ed.) Academic Press, New York.
43. Yamaguchi, t., Muroya, N. Isobe, M. and Sukiora,M.1973 . Production and Properties of Lipase From A Newly Isolated *Chomobacterium*. **Agr. Biol. Chem. Soc.** 37(5): 999-1005. .
44. Yutani, K.; Sasaki, I. and Ogasahare, K. 1973. Comparison of thermo α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* Grown at Different Temperatures. **J. Biochem.** 74:573-579.



ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด หลังจากที่ได้เตรียมใส่ภาชนะที่เหมาะสมแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 1

1.1 Inoculum medium (glucose urea medium / L)

ประกอบด้วย

glucose	20 .0g.
urea	0.5g.
KH_2PO_4	0.6g.
K_2HPO_4	0.4g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g.
Yeast extract	1.0g.
Distrill water	1000 ml. pH 6

1.2 Production medium ที่มีหญาบดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ประกอบด้วย

หญาบด	10.0g.
urea	0.5g.
KH_2PO_4	0.6g.
K_2HPO_4	0.4g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g.
yeast extract	1.0g.
distrill water	1000 ml. pH 6

1.3 Production medium ที่มีเกลบเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 1.2 แต่ใช้เกลบแทนหญาบด

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 2

2.1 Inoculum medium/L Glucose ammonium dihydrogen phosphate medium

ประกอบด้วย

glucose	10.0g.
(NH ₄)H ₂ PO ₄	2.0g.
KH ₂ PO ₄	3.0g.
K ₂ HPO ₄	2.0g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g.
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.1g.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0mg.
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.6mg.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4mg.
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	2.0mg.
yeast extract	1.0g.
peptone	1.0g.
distill water	1000 ml. pH 6

2.2 Production medium ที่มีจีเลอีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 2.1 แต่ใช้จีเลอีนแทน glucose

2.3 Production medium ที่มีรำข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 2.1 แต่ใช้รำข้าวเจ้าแทน glucose

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 3

3.1 Inoculum medium/L

ประกอบด้วย

yeast extract	10g.
peptone	20g
distill water	1000 ml.

3.2 Production medium/L ที่มีแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ประกอบด้วย

แป้งข้าวโพด	5g.
yeast extract	5g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
KH ₂ PO ₄	5g.
distrill water	1000 ml.

3.3 Production medium/L ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 3.2 แต่ใช้แป้งมันสำปะหลังแทนแป้งข้าว

โพด

4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 4

4.1 Inoculum medium/L

ประกอบด้วย

glucose	10g.
yeast extract	5g.
NaCl	5g.
distrill water	1000 ml.

4.2 Production medium/L ที่มีรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ประกอบด้วย

รำข้าว	10g.
peptone	2g.
distrill water	1000 ml.

5. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ 5

5.1 Inoculum medium/L

ประกอบด้วย

peptone	5g.
beef extract	3g.
distrill water	1000 ml.

5.2 Production medium/L ที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

ประกอบด้วย

น้ำมันถั่วเหลือง	10ml.
peptone	5g.
beef extract	3g.
distill water	1000 ml.

5.3 Production medium/L ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 5.2 แต่ใช้น้ำมันปาล์มแทนน้ำมันถั่ว

เหลือง

5.4 Production medium/L ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

เตรียมโดยใช้ส่วนประกอบเดียวกันกับ 5.2 แต่ใช้น้ำมันมะกอกแทนน้ำมันถั่ว

เหลือง

6. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

อาหารสูตรที่ 1

ประกอบด้วย

รำข้าว	10g.
distill water	1000 ml.

อาหารสูตรที่ 2

ประกอบด้วย

รำข้าว	10g.
peptone	2g.
yeast extract	1g.
distill water	1000 ml.

อาหารสูตรที่ 3

ประกอบด้วย

รำข้าว	10g.
yeast extract	1g.
distill water	1000 ml.

อาหารสูตรที่ 4

ประกอบด้วย

รำข้าว	10g.
peptone	2g.
distrill water	1000 ml.

7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษาความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 6 สูตรที่ 4 สำหรับแบคทีเรีย และสูตรที่ 3 สำหรับเชื้อรา โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำกลั่นที่เดิมให้ตามน้ำหนักให้เป็น 60% , 70% และ 80%

8. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 6 สูตรที่ 4 สำหรับแบคทีเรีย และสูตรที่ 3 สำหรับเชื้อรา โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำกลั่นที่เดิมให้ตามน้ำหนักให้เป็น 60% และ 80% และปรับ pH ให้เป็น 6, 7 และ 8

9. Plate Count Agar

ประกอบด้วย

peptone from casein	5.0g.
yeast extract	2.5g.
D(+)-glucose	1.0g.
agar-agar	14.0g.