บทที่ 2

การสำรวจการวิจัยอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเกี่ยวกับเชื้อหมัก

เชื้อหมัก (mold bran หรือ starter) ที่ผลิตแบบพื้นบ้านของอินโดนีเซีย ที่เรียกรากิ (ragi) และเชื้อหมักที่ผลิตเป็นการค้าจากไต้หวัน ที่เรียกว่า "levure chinoise" มีลักษณะคล้ายกับลูกแป้งไทย (จิราภรณ์ สุขุมาวาสี, 1975) และโคจิ (koji) ซึ่งเป็นเชื้อหมักของญี่ปุ่น ก็มีจุดประสงค์ในการใช้ในอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับลูกแป้งไทย

Went และ Geerligs (1896) ได้รายงานไว้ว่า รากิ เตรียมได้จากแป้งข้าวจ้าว และเติมน้ำตาลอ้อย กับเหง้า (rhizome) ของ ข่า (Alpinia galanga) โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วผสมกับแป้งข้าวจ้าว ผึ่งแดดให้แห้งบดละเอียด แล้วเติมน้ำมะนาว (Citrus limonellus) ปั้นเป็นลูกกลม ใส่เชื้อที่ลูกกลมนี้ด้วยรากิเก่า หลังจากนั้นนำไปผึ่งแดดให้แห้ง ยีสต์ที่พบในรากิ คือ ยีสต์ Hansenula anomala และอีกชนิดหนึ่งคือ ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ราที่พบในรากิ คือ Rhizopus oryzae และ Chlamydomucor oryzae

Stithnimarnkarn (1949) ได้รายงานถึงส่วนประกอบ และวิธีการทำลูกแป้งไทย ซึ่งใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ และวิสกี้จากเมล็ดธัญพืช ว่า ลูกแป้งทำจากข้าวดิบบดละเอียด และเครื่องเทศหลายชนิด เช่น กระเทียม (Allium sativum) จันทน์เทศ (Myristica fragrans) ดีปลี (Piper chaba) พริกไทย (Piper nigrum) ข่า (Alpinia galanga) เป็นต้น ผสมส่วนประกอบทั้งหมด

เข้ากับน้ำ แล้วทำให้เป็นก้อนกลม ๆ ใส่เชื้อลงบนก้อนกลมนี้ด้วยลูกแป้งเก่า โดยบดลูกแป้งเก่าที่จะใช้เป็นเชื้อต่อไป ให้เป็นผงละเอียด แล้วนำมาโรยลงบนลูกแป้งที่เตรียมใหม่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28° - 34°ซ. นาน 72 ชั่วโมง แล้วผึ่งแดดให้แห้ง

Morita และคณะ (1966) ได้รายงานว่า โคจิ (koji) ของญี่ปุ่นเตรียมจากข้าวที่สุกแล้ว และเพาะเชื้อ Aspergillus oryzae สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกแล้วลงบนข้าวที่นึ่งสุก ข้าวที่นำมาใช้เป็นข้าวที่ได้รับการขัดสีอย่างดี บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 32° - 39° ซ. นาน 34 ชั่วโมง

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี (1975) ได้อ้างถึง การทำรากิ ว่า ทำจากแป้งข้าวจ้าว มีเครื่องเทศผสม จุลินทรีย์มี แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ใช้รากิในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ในการผลิตอาหารหมักพื้นเมืองของอินโดนีเซีย เช่น arak brem tape ketan และ tape ketella ซึ่งวัตถุดิบเป็น กากน้ำตาล ข้าวจ้าวที่สุกแล้ว ข้าวเหนียวนึ่ง และมันสำปะหลังที่สุกแล้ว ตามลำดับ ส่วน lévure chinoise ประกอบด้วยเชื้อผสมของราใน family Mucoraceae 2 ชนิด และยีสต์

การวิจัยเกี่ยวกับเอนซายม์บางชนิดซึ่งสร้างโดยรา และคุณสมบัติบางประการของเอนซายม์แอมิเลส

Underkofler และ Hickey (1954) ได้พบว่า แอมีเลสที่ได้จากรา เป็นเอนซายม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซล (exocellular enzyme) ซึ่งให้ปฏิกริยาย่อยสลาย (hydrolysis) เอนซายม์แอมีเลสที่สำคัญมี แอลฟา-แอมีเลส (α-amylase) มอลเตส (maltase) และเด็กซตริเนส (dextrinase) แอลฟา-แอมีเลส ย่อยโมเลกุลใหญ่ของแป้งเป็นเด็กซตริน (dextrin) มอลเตสเปลี่ยนมอลโตส (maltose) เป็นกลูโคส (glucose) เด็กซตริเนส ย่อยเด็กซตรินได้ผลเป็นน้ำตาลที่ถูกหมักได้

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

(fermentable sugars) และได้พบว่า จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน หรือชนิดเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์ มีความแตกต่างกันมากในการผลิตเอนซายม์ นอกจากนี้อาหารยังมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนซายม์ ดังนั้นในการผลิตเอนซายม์แอมีเลส นอกจากต้องเลือกราสายพันธุ์ที่ดีแล้ว ยังต้องหาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนซายม์โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ได้คัดแล้วนั้นด้วย

Hoogerheide (1954) ได้พบว่า อาจแบ่งแอมีเลสออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ คือ แอลฟา-แอมีเลส หรือ สตาร์ชเด็กซตรินซิงเอนซายม์ (Starch dextrinising enzyme) ซึ่งตัดโมเลกุลของแป้งอย่างสุ่ม ได้ผลเป็นเด็กซตริน ซึ่งประกอบด้วยหน่วยของกลูโคส ปฏิกริยานี้เป็นผลให้ลดความขันหนืดของแป้งลง อีกพวกหนึ่ง คือ เบตา-แอมีเลส (β-amylase) หรือ ไพรมารี แซคคาริไฟอิง เอนซายม์ (primary saccharifying enzyme) ซึ่งย่อยโมเลกุลของแป้งจากปลายด้านที่ไม่มีรีดิวซิงเอนด์ (reducing end) ได้ผลเป็นมอลโตส จนกระทั่งเมื่อตัดถึง side chain หรือ หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ของโมเลกุลแป้ง ปฏิกริยาจะหยุด เพราะเอนซายม์เบตา-แอมีเลส ไม่สามารถตัดส่วนที่เหลือต่อไป จนกว่าจะมีการสร้างปลายด้านใหม่ขึ้น

Pazur และ Okada (1967) ได้ศึกษาคุณสมบัติของกลูโคแอมีเลส (gluco-amylase) จาก Rhizopus delemar ได้พบว่า คุณสมบัติของกลูโคแอมีเลสจาก R. delemar ต่อสารประเภทแป้ง และสาร มอลโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (malto-oligo-saccharide) คล้ายกับ กลูโคแอมีเลสจาก Aspergillus niger และได้พบว่า กลูโคแอมีเลสจากราทั้งสองชนิดดังกล่าว คะตะไลซ์ (catalyze) ปฏิกริยากลับ (reversion) ในอัตราต่ำ อัตราของกลูโคแอมิเลสจาก R. delemar เป็นที่เชื่อถือได้ว่า สูงกว่าอัตราของ กลูโคแอมีเลส จาก A. niger

Gleason (1971) ได้อ้างถึงว่า ทราบกันมานานแล้วว่า ราบางชนิดใน order Mucorales สามารถหมักกลูโคสเป็น เอทานอล (ethanol) โดยเอนซายม์ แอกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และเอนซายม์นี้ ตรวจพบได้ใน Rhizopus sp. เท่านั้น เขาได้ทำการศึกษาแล้วได้พบว่า มีราอย่างน้อยที่สุด 3 family ได้แก่ Mucoraceae Thamnidiaceae และ Choanephoraceae ซึ่งอยู่ใน order Mucorales ที่สามารถสังเคราะห์เอนซายม์ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนสได้

จิราภรณ์ สุขุมาวาสี (1975) ได้ศึกษาเรื่อง กิจกรรมเอนซายม์ของลูกแป้ง ได้นำลูกแป้งจำนวน 6 ตัวอย่าง มาตรวจหาเชื้อ และทดสอบความสามารถของแอมีเลส เชื้อที่แยกได้จากลูกแป้งตัวอย่างที่ 2 ให้ความสามารถของแอมีเลสสูงสุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ลูกแป้งเป็นทั้งเชื้อหมัก และแหล่งเอนซายม์ และพบว่าความสามารถของแอมีเลสจากจุลินทรีย์หลาย ๆ สายพันธุ์ในลูกแป้ง รวมกันจะสูงกว่า จากสายพันธุ์เดียวที่ให้ความสามารถของแอมีเลสสูงจากลูกแป้งเดียวกัน จุลินทรีย์ที่ให้ความสามารถของแอมีเลสสูงสุด คือ Endomycopsis fibuligera ซึ่งให้แอมีเลส 2 ชนิด คือ กลูโคแอมีเลส และแอมีเลสที่ย่อยไซโคลเด็กซตริน (cyclodextrin)

การวิจัยเกี่ยวกับอิทธิพลของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์

Lilly และ Barnett (1953) ได้พบว่า Sordaria fimicola ไม่มีการเจริญแม้แต่ภายหลัง 15 วัน ของการบ่มเชื้อ เมื่อเลี้ยงด้วยซูโครส (Sucrose) หรือเมลิไบโอส (melibiose) เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าเติมน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) เช่น ฟรุคโตส (fructose) หรือกาแลคโตส (galactose) ลงในอาหารซูโครส หรืออาหารเมลิไบโอส จึงจะมีการใช้น้ำตาลซูโครส หรือ เมลิไบโอสได้ โดยที่น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นภายใน 5 วันของการบ่มเชื้อ และ Cochrane (1958)

ได้อธิบายว่า น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ที่เติมลงไปนั้น จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานให้พอเพียงแก่การเจริญเติบโต และสังเคราะห์เอนซายม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และย่อยอาหาร หลังจากนั้นจึงสามารถใช้น้ำตาล ซูโครส หรือ เมลิไบโอส ได้

Hesseltine และ Anderson (1956) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของอาหารที่มีต่อการสร้างไซโกสปอร์ (zygospore) ของรา Thamnidium elegans แล้วได้พบว่า ราชนิดนี้สร้างไซโกสปอร์ที่อุณหภูมิต่ำ (6-7° ซ) ในอาหารที่เหมาะสม และได้พบว่าแม้ว่าเชื้อราชนิดนี้มีการเจริญดีบน sucrose steep agar แต่ไม่มีการสร้างไซโกสปอร์ แต่ถ้าแทนที่ซูโครสด้วยกลูโคสในอาหารนี้ จะทำให้มีการสร้างไซโกสปอร์จำนวนมาก

Barnett และ Lilly (1956) ได้ศึกษาอิทธิพลของสิ่งต่าง ๆ ที่มีต่อการสร้างไซโกสปอร์ของ Choanephora cucurbitarum ได้พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล การสร้าง gametangia และการแก่ของไซโกสปอร์จะช้าลง และไซโกสปอร์ ถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในอาหารที่ประกอบด้วย ซูโครส มอลโตส แลคโตส (lactose) และราฟฟิโนส (raffinose) ซึ่งให้การเจริญเติบโตไม่ดี และพบว่าไม่มีการสร้างไซโกสปอร์ภายในระยะเวลา 14 วัน ในอาหารที่ประกอบด้วย สารประกอบแอมโมเนียม หรือ ยูเรีย (urea) แต่มีการสร้างไซโกสปอร์รวดเร็วมากในอาหารที่มีกรดกลูตามิค (glutamic acid) แอสปาราจีน (asparagine) และ เฟนิลอลานีน (phenylalanine)

Thöni (1963) ได้พบว่า เมื่อเลี้ยง Rhizopus oryzae สายพันธุ์ Went & Geerligs ในอาหารที่มีไกลซีน (glycine) เป็นแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด ราชนิดนี้ไม่มีการเจริญเติบโต จนกว่าหลังจากที่ได้บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-4 วันแล้ว แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด ราชนิดนี้เริ่มมีการเจริญเติบโตตั้งแต่วันแรกของการบ่มเชื้อ

Papavizas และ Ayers (1964) ได้รายงานว่า ดี-กลูโคส และมอลโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตของ Aphanomyces euteiches นอกจากนี้ได้พบว่า ดี-กลูโคส และ ดี-ฟรุคโตส (D-fructose) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดการสืบพันธุ์แบบมีเพศ และพบว่า A. euteiches ไม่สามารถใช้น้ำตาลพวกโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น ซูโครส(sucrose) แลคโตส (lactose) และราฟฟิโนส (raffinose) เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์เอนซายม์ที่จำเป็นในการย่อยสลายน้ำตาลนั้น หรือ เนื่องจากไม่สามารถนำเอาน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์เหล่านั้นไปใช้ได้โดยตรง โดยที่ไม่มีการย่อยสลายขั้นต้นเสียก่อน

Sorrenson และ Hesseltine (1966) ได้ศึกษาการใช้คาร์บอน และไนโตรเจนของ Rhizopus oligosporus สายพันธุ์ Saito (NRRl 2710) ได้พบว่า แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดของรานี้ คือ กลูโคส ไซโลส (xylose) ฟรุคโตส กาแลคโตส (galactose) มอลโตส และ แมนิทอล (manitol) และน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน แทนน้ำตาลหลาย ๆ ชนิดได้ โดยให้การเจริญที่ดียิ่ง ส่วนแหล่งของไนโตรเจน พบว่า เกลือแอมโมเนียม ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และกรดอมิโน ได้แก่ โปรลีน (proline) ไกลซีน กรดแอสปาติค (aspartic acid) และลิวซีน (leucine) ให้การเจริญเติบโตดี พบว่า ทริพโตแฟน (tryptophan) และ โซเดียมไนเตรต ไม่ให้การเจริญเติบโตเลย

Gottlieb (1971) ได้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ Rhizoctonia solani พบว่า อัตราการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อวันที่ 4 -5 แล้วลดลงจนการเจริญหยุดในเวลา 8-9 วัน และพบว่า เอททานอล (ethanol) ที่สกัดได้จากเชื้อเก่ายังยั้งการเจริญของเชื้อที่ปลูกใหม่ เขาได้สรุปว่า การที่การเจริญมีขีดจำกัดขึ้นอยู่กับ 1. ขนาดของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ 2. มีสารที่มีผลยับยั้งการเจริญปล่อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3. สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง

Schiffmann-Nadel และ Cohen (1972) ได้ศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของ Phytophthora citrophthora ได้พบว่า รานี้เจริญได้จำกัดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เจริญได้ดีบนมอลโตส และเจริญได้น้อยลงบนซูโครส รานี้เจริญดีที่สุดบนแป้งที่ละลายได้ (soluble starch).

Ellis, Wang และ Hesseltine (1974) ได้ทำการทดลองขั้นต้นในการตรวจหาอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ Rhizopus sp. 10 สายพันธุ์ เพื่อให้มีความสามารถในการสร้างแอมีเลส ได้พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแป้งข้าวสาลี เกือบทุกสายพันธุ์แสดงความสามารถในการสร้างแอมีเลส แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหารแป้งข้าวจ้าวบางสายพันธุ์เท่านั้น ที่แสดงความสามารถในการสร้างแอมีเลส

Ribeiro, Erwin และ Zentmyer (1975) ได้พบว่าเมื่อเลี้ยง Phytophthora sp. 20 สายพันธุ์ บนอาหารสังเคราะห์เปรียบเทียบกับ อาหาร V-8 juice ส่วนใหญ่เชื้อรานี้สร้าง oospore บนอาหารสังเคราะห์ และการงอกของ oospore ที่ได้จากอาหารสังเคราะห์ดีเท่า ๆ กันหรือดีกว่า oospore ที่สร้างขึ้นบนอาหาร V-8 juice

Fergus และ Delwiche (1975) ได้พบว่า เมื่อเลี้ยง Chaetomium rectopilium ด้วยอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกอย่าง คือ แร่ธาตุ แหล่งไนโตรเจน ไวตามิน กลูโคส เชื้อรานี้สร้าง ascospore ได้น้อย ประมาณ 8% หรือ ต่ำกว่า แต่เมื่อใส่โปตัสเซียมอซีเตต (Potassium acetate) ลงไปด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ กัน กลับกระตุ้นให้การงอกเพิ่มขึ้นถึง 8 เท่า และพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง C. rectopilium ด้วยอาหารมอลต์สะกัด จะให้การงอกดีมากกว่า เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารโปตัสเซียมอซีเตต คือให้การงอกถึง 89% และ pH ที่เหมาะสมของอาหารทุกชนิด คือ 5.7 - 6.4

ประสิทธิ์ เรืองไรรัตน์โรจน์ และไมตรี สุทธจิตต์ (2520) ได้พบว่า ขิง เหลวสีเหลือง ลักษณะเป็นน้ำมัน มีกลิ่นฉุนแรงระคายเคืองจมูก ที่สกัดได้จากกระเทียม โดยวิธีการกลั่นที่ผ่านด้วยไอน้ำ และสกัดสิ่งที่กลั่นได้ด้วยอีเธอร์ (ether) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ Aspergillus flavus ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ความเข้มข้นอย่างน้อยที่สุดเท่ากับ 1 : 2000 (โดยปริมาตร)

บัญญัติ สุขสรีงาม (2518) ได้รายงานว่า ส่วนมากน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ของเครื่องเทศ27 ชนิด เป็นส่วนสำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งมีแบคทีเรีย 2 ชนิด ยีสต์ 2 ชนิด รา 8 ชนิด และพบว่า น้ำที่เหลือจากการสะกัดน้ำมันของกระชาย พริกขี้หนู ลูกจันทร์ เป็นส่วนสำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องเทศบางชนิด ส่งเสริมการเจริญของรา โดย ขมิ้นขาว ส่งเสริมการเจริญของ Rhizopus sp. และ Penicillium sp. หัวกระเทียม ส่งเสริมการเจริญของ Aspergillus sp. Cunninghamella sp. Penicillium sp. และ Rhizopus sp.