บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกเชื้อรา

ในการแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งจากตัวอย่างซึ่งเก็บจากโรงงานสุราทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ได้เชื้อราทั้งหมด 12 ชนิด ซึ่งคาดว่าจะมีความสามารถในการย่อยแป้งสูง เนื่องจากเป็นเชื้อที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุด โดยวิธีตรึงสปอร์ของเชื้อรา หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวให้เกิดการเจริญเติบโต แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของเซลที่ถูกตรึงทั้งหมดเปรียบเทียบกับเชื้อ Aspergillus oryzae AHO-1 พบว่า Rhizopus sp. และ Aspergillus oryzae จากโรงงานสุรา จังหวัดนครปฐมและชลบุรี ตามลำดับ มีความสามารถในการย่อยแป้งสูง การคัดเลือกเชื้อโดยวิธีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง เนื่องจากมีวัตถุประสงค์จะนำเซลที่ถูกตรึงนี้ไปใช้ในการย่อยแป้ง และเลือกใช้การตรึงเซล โดยวิธีการตรึงสปอร์เนื่องจากสปอร์จะแพร่กระจายได้อย่างสม่ำเสมอในเม็ดเจลที่ใช้ตรึง ดีกว่าการตรึงสายใย

4.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลที่ถูกตรึงเพื่อให้มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต ตามรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ พบว่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Aspergillus oryzae จะเพิ่มขึ้นจากความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จนมีค่า 7.0 ที่เวลา 40 ชั่วโมง หลังจากนั้นความเป็นกรดด่างจะลดลงเหลือเพียง 4.8 ที่ 72 ชั่วโมง ส่วน Rhizopus sp. ความเป็นกรดด่าง จะลดลงภายหลัง 28 ชั่วโมง จนเหลือ 2.9 ที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งความเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างนี้ Lineback และคณะ (73) กล่าวว่าเกิดจาก

การที่เซลล์สร้างกรดอินทรีย์ (organic acid) ชนิดที่เซลไม่สามารถใช้ได้ และค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ๆ จะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ย่อยแป้ง หรือไปยับยั้งความสามารถของเชื้อราในการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยแป้ง และในการทดลองของ Barton และคณะ (74) พบว่าการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างคือ ชนิดของเชื้อ, วิธีการในการเลี้ยงเชื้อ, ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์โบไฮเดรตและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การที่ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะเดียวกันมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างต่างกันเนื่องจากต่างสายพันธุ์กันนั่นเอง

สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ใน Aspergillus oryzae จะสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงแล้วลดลงตามลำดับ ส่วนใน Rhizopus sp. ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะสูงสุดที่ 44 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนเป็น 0 ที่ชั่วโมงที่ 56 การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลงขณะที่เซลของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงยังมีการเจริญเติบโต แสดงว่าเซลที่ถูกตรึงนำน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งไปใช้ในเมตาโบลิซึม (metabolism) ของเซลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลงตามลำดับ

จากการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเซลที่ถูกตรึงอายุ 52 ชั่วโมงจะมีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุด ตามรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ และในขณะเดียวกันก็พบว่าเอนไซม์ย่อยแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงสุดเมื่อเซลที่ถูกตรึงมีอายุ 52 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นระยะที่เซลสร้างเอนไซม์และขับเอนไซม์ออกมาได้มากที่สุด และเนื่องจากเอนไซม์ย่อยแป้งเป็นเอนไซม์ที่ขับมานอกเซล (extracellular enzyme) จึงสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงและเอนไซม์จะลดลงทั้งใน Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ซึ่งใน Aspergillus oryzae จะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วน Rhizopus sp. จะลดลงอย่างช้า ๆ ซึ่ง Alazard และ Raimbault (75) พบปรากฏการณ์เช่นเดียวกันนี้ ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งในอาหารเหลวโดย Aspergillus niger และสันนิษฐานว่าเกิดจากการแตก (autolysis) ของสายใยของราทำให้ความสามารถในการย่อยแป้งของเซลลดลง และ Hayashida

(76) พบว่าการเลี้ยง Aspergillus awamari และ Aspergillus oryzae ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่างระหว่าง 6.5-7.0 จะสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ของเซล และเมื่อความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 5.0 จะเริ่มมีการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเอนไซม์นี้จะไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ย่อยแป้ง ทำให้ความสามารถในการย่อยแป้งของเอนไซม์ลดลง และในขณะเดียวกันยังพบว่าขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (2.0-4.0) เซลจะสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูงอีกด้วย ดังนั้นการที่ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. มีความสามารถในการย่อยแป้งโดยเซลที่ถูกตรึงและเอนไซม์ลดลง อาจเป็นสาเหตุมาจากการลดต่ำลงของความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้น, การแตกของสายใยของรา และการที่เซลสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่การที่ Rhizopus sp. ความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงลดลงอย่างช้า ๆ อาจเนื่องจากขณะนั้นเซลยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงเป็นระยะเวลานานกว่า ทำให้การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงและเอนไซม์เป็นไปอย่างช้า ๆ

4.3 การใช้เซลที่ถูกตรึง 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง

จากการทดลองย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เซลของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงมาย่อยแป้งร่วมกัน โดยใช้อัตราส่วนของเซล 2 ชนิด เป็น 1:1 ตามรูปที่ 3.7 และ 3.8 พบว่าการใช้เซลที่ถูกตรึงของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกันในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุก จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าการใช้เซลที่ถูกตรึงของเชื้อเพียงชนิดเดียว และพบว่าเซลของ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงจะมีความสามารถในการย่อยแป้งสูงกว่า Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึง Ueda และคณะ (77) รายงานว่าการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสร่วมกับเอนไซม์อื่น ๆ จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบให้สูงขึ้น โดยพบว่าการย่อยแป้งข้าวโพดดิบด้วยกลูโคอะไมเลส I และ II จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยให้สูงขึ้นเมื่อร่วมกับไอโซอะไมเลสของ Pseudomonas sp. และ แอลฟา-อะไมเลสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งดิบของกลูโคอะไมเลส I และ II ของเชื้อ Rhizopus sp. ได้เช่นกัน ดังนั้นการใช้ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง อัตราส่วน 1:1 ร่วมกันในการย่อยแป้งดิบแล้วได้ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าการใช้เซลที่ถูกตรึงของเชื้อเพียงชนิดเดียวอาจเกิดจากการที่ Aspergillus oryzae และ

Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถเสริมความสามารถในการย่อยแป้งดิบซึ่งกันและกัน และสำหรับการย่อยแป้งสุกก็อาจอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกัน

4.4 การใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อรา 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง

การใช้เอนไซม์ที่สกัดจาก Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. อัตราส่วน 1:1 ย่อยแป้งดิบและแป้งสุก ตามรูป 3.9 และ 3.10 พบว่าการใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเชื้อรา 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์และน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าการใช้เอนไซม์ที่สกัดจาก Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. เพียงชนิดเดียวในการย่อยแป้ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ใช้เซลที่ถูกตรึงในข้อ 4.3 และอธิบายได้ด้วยเหตุผลอย่างเดียวกัน

4.5 การหาชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้ง

จากการทดลองย่อยแป้งดิบและแป้งสุก โดยการใช้เซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งดิบและแป้งสุก พบว่าการใช้เชื้อผสมของเซล Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึง กับ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง อัตราส่วน 1:1 และการใช้ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุก จะให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ส่วนการใช้ Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึงจะให้น้ำตาลกลูโคสครึ่งหนึ่งของน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นในการย่อยแป้งสุก และได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวส์ใกล้เคียงกันในการย่อยแป้งดิบ และจากการทดลองใช้เอนไซม์ที่สกัดจาก Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. และการใช้เอนไซม์ผสมของทั้ง 2 เชื้อ อัตราส่วน 1:1 ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกโดยใช้เซลที่ถูกตรึง และจากการทดลองย่อยแป้งดิบและแป้งสุกโดยเซลที่ถูกตรึงและเอนไซม์ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการทดสอบชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกโดยเอนไซม์ที่สกัดจาก Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีกระดาษ กล่าวคือ เอนไซม์ที่สกัดจาก Aspergillus oryzae จะย่อยแป้งสุกได้ผลลัพธ์เป็นน้ำตาลกลูโคส, มอลโตส และมอลโตไตรโอส และย่อยแป้งดิบได้ผลลัพธ์เป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจาก Aspergillus oryzae สามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง แอลฟา-อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส (78) และเนื่องจาก

แอลฟา-อะไมเลส่จะย่อยพันธะ แอลฟา (1-4) กลูโคไซดิคในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม แต่ไม่สามารถย่อยพันธะ แอลฟา (1-6) กลูโคไซดิค ได้ผลิตผลเป็นกลูโคส, มอลโตส, แอลฟา-ลิมิต-เดกซตริน ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน ส่วนกลูโคอะไมเลส่สามารถย่อยได้ทั้งพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคไซดิค และ แอลฟา (1-6) กลูโคไซดิค จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์ ได้ผลสัพธ์เป็นกลูโคส จึงทำให้ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยแป้งสุกของ Aspergillus oryzae คือ กลูโคส, มอลโตส, มอลโตไตรโอส ส่วนการย่อยแป้งดิบของ Aspergillus oryzae เกิดจากการทำงานของกลูโคอะไมเลส จึงได้ผลผลิตเป็นกลูโคสอย่างเดียว

สำหรับเอนไซม์ที่สกัดจาก Rhizopus sp. และเอนไซม์ผสมของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. อัตราส่วน 1:1 จะย่อยแป้งดิบและแป้งสุกได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว แสดงว่าการย่อยเกิดขึ้นโดยการทำงานของกลูโคอะไมเลส

4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์

การหาสภาวะในการตรึงสปอร์ของเชื้อรา อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราที่ถูกตรึงจะช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของเซลที่ถูกตรึง สำหรับการตรึงเซลของจุลินทรีย์ในการทดลองนี้เลือกใช้วิธีการตรึงสปอร์ของเชื้อราด้วยโซเดียมอัลจิเนต เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนตเป็นสารตรึงที่ราคาไม่แพง การตรึงทำได้ง่าย และขบวนการตรึงเหมาะสมกับการตรึงสปอร์ซึ่งต้องกระทำในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำสปอร์ที่ถูกตรึงเหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและมีความสามารถในการย่อยแป้งโดยไม่มีการรบกวนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อาจปะปนมา

ผลการทดลองเลือกชนิดของโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ พบว่าโซเดียมอัลจิเนตชนิด 300 cps. จะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการย่อยแป้งสูงกว่าเซลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตชนิด 500 cps. ทั้งในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง ทั้งนี้อาจเนื่องจากรูพรุนในเม็ดเจลของโซเดียม-อัลจิเนตชนิด 300 cps. มีขนาดโตกว่าชนิด 500 cps. ทำให้การซึมผ่านของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลที่ถูกตรึงซึมผ่านเข้าออกได้ดีกว่าการใช้โซเดียมอัลจิเนตชนิด 500 cps. เซลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตชนิด 300 cps. จึงมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าใน 500 cps. โดยเปรียบเทียบจากน้ำหนักเปียกของเซลที่ถูกตรึง และมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูง

จากความเห็นของ Cheetham, P.S.J. และคณะ (79) ที่ว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตแล้วจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของเม็ดเจลให้มีความคงทนสูงขึ้น และจะทำให้รูพรุนในเม็ดเจลมีขนาดเล็กลง จึงได้ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงสปอร์ของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. และไม่พบความแตกต่างของความสามารถในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบของเซลที่ถูกตรึงในโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นต่างกันคือ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์คงเดิม

ผลการทดลองตรึงสปอร์ของ Rhizopus sp. ในโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นของสปอร์ต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อใช้ปริมาณสปอร์ 10^6, 10^7 สปอร์ต่อ 100 มล.ของโซเดียม-อัลจิเนต หลังจากนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการงอกของสปอร์เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอทุกเม็ดเจลแสดงว่าปริมาณสปอร์ที่ใช้ต่อปริมาณโซเดียมอัลจิเนตน้อยเกินไป ทำให้การกระจายของสปอร์ไม่ทั่วถึงในทุกเม็ดเจล ส่วนเม็ดเจลที่ใช้สปอร์ความเข้มข้น 10^8, 10^9, 10^{10} สปอร์ต่อ 100 มล.โซเดียมอัลจิเนต จะเกิดการงอกของสปอร์ในทุก ๆ เม็ดเจล แต่การใช้สปอร์ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อ มล.จะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกดีที่สุด แสดงว่าปริมาณสปอร์ที่ใช้ในการตรึงมีผลต่อคุณสมบัติของเซลที่ถูกตรึง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ HOQ และคณะ (80) ซึ่งพบว่าปริมาณสปอร์ของ Curvularia lunata. 9×10^5 สปอร์ต่อ มล.ของไฮโดรโฟบิค โพโต-ครอสลิงเคเบิล เรซิน พรีโพลีเมอร์ (hydrophobic photo-crosslinkable rasin prepolymer) ซึ่งใช้เป็นสารตรึงจะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการผลิตไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) ได้สูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนสปอร์เหมาะสมกับปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสปอร์สามารถงอกเป็นสายใยได้หมด การใช้สปอร์ปริมาณสูง ๆ จะทำให้เกิดการจำกัดของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และจะมีสปอร์ที่ไม่งอกหลงเหลืออยู่จำนวนมาก

4.7 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลที่ถูกตรึง

เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งนอกจากจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ดังนั้นจึงต้องปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เซลที่ถูกตรึงที่มีคุณภาพดี มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์สูง (81) จากการทดลองปรับปรุงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้

จากสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมซิเตรต และแอมโมเนียมอซิเตต ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนการใช้เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมและไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่าในสูตรอาหารที่เติมเฉพาะไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ดังกล่าวข้างต้นโดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์จะไม่มีการงอกของสปอร์ของ Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึง ส่วน Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงจะไม่งอกในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมอซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมซิเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีการงอกของสปอร์เป็นสายใย แต่จะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการย่อยแป้งต่ำ สำหรับสูตรอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์และไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ร่วมกันเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าจะไม่มีการงอกของสปอร์ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมอซิเตตและสารสกัดจากยีสต์ แสดงว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถใช้แอมโมเนียม-อซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมซิเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ ทั้งสปอร์ของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. จะสามารถงอกได้ในสูตรอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ และในสูตร-อาหารที่เติมแอมโมเนียมซิเตรตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้นในทั้ง 2 เชื้อ ซึ่งผลการทดลองนี้ต่างจากรายงานของ Sinkar และ Lewis (82) ที่ใช้แอมโมเนียมอซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับ Aspergillus niger ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และสนับสนุนกับการทดลองของ Sen และ Ueda (83) ซึ่งรายงานว่าแอมโมเนียมซิเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งดิบโดย Aspergillus oryzae อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแอมโมเนียมซิเตรตจะเป็นแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ที่ดีที่สุดสำหรับ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง แต่เนื่องจากการเติมแอมโมเนียมซิเตรตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจะทำให้ได้ลักษณะของเซลที่ถูกตรึงที่ผิดไปจากเดิม กล่าวคือ เซลที่ถูกตรึงของ Rhizopus sp. จะไม่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมในสูตรอาหารที่เติมแอมโมเนียมซิเตรตมากกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแคลเซียมอัลจิเนตซึ่งเป็นสารที่ใช้ตรึงเซลไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีซิเตรตแอนอิออน (citrate anion) เซลที่ถูกตรึงของ Rhizopus sp. ที่มีลักษณะเป็นสายใยสั้น ๆ และเป็นขุยเนื่องจาก Rhizopus sp. ไม่สามารถจับตัวเป็นเม็ดกลมได้เมื่อไม่ถูกตรึง ส่วน Aspergillus oryzae พบว่ายังสามารถจับตัวเป็นเม็ดกลมได้ ดังนั้นแม้จะเกิดการ

ล่ลายตัวของแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ตรึงก็ไม่มีผลต่อการจับตัวเป็นก้อนกลมของ Aspergillus oryzae การที่แอมโมเนียมซีเตรตความเข้มข้นต่ำ ๆ ไม่มีผลต่อความเล่ถียรของเม็ดเจลของแคลเซียมอัลจิเนต เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยรักษาล่ภาพของเม็ดเจล (79) จึงยังคงได้เซล Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลม

เนื่องจากการใช้แอมโมเนียมซีเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนจากล่ารอนินทรีย์เพื่อให้ได้เซลที่ถูกตรึงที่มีความล่ามารถในการย่อยแป้งสูงไม่ล่ามารถใช้ในความเข้มข้นเกิน 1.0 เปอร์เซนต์ และการใช้แอมโมเนียมซีเตรตร่วมกับล่ารล่กัดจากยีล่ต์จะได้เซลที่ถูกตรึงที่มีความล่ามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซีเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงพยายามหาแหล่งไนโตรเจนจากล่ารอินทรีย์มาใช้แทน อาทิเช่น รำข้าวล่าลี, รำข้าวเจ้า, ทริปโตน, โปรติโอล่เปปโตน, เปปโตน, กากถั่วเหลือง, ล่ารล่กัดจากยีล่ต์ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ แทนการใช้เปปโตนและล่ารล่กัดจากยีล่ต์ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 พบว่า เซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีล่ารล่กัดจากยีล่ต์เป็นแหล่งไนโตรเจนจากล่ารอินทรีย์จะมีความล่ามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด ส่วน Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง พบว่าโปรตีโอล่เปปโตนจะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความล่ามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด Sinkar และ Lewis (82) รายงานว่า โพลีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเล่ริมการผลิตกลูโคอะไมเลล่ของ Aspergillus niger ได้สูงสุด รองลงมาคือ ทริปโตน โปรติโอล่เปปโตน และล่ารล่กัดจากยีล่ต์ ตามล่าดับ และ Sinkar และ Lewis ยังทดลองใช้วัล่ดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น รำข้าวล่าลี, กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจากล่ารอินทรีย์ที่มีราคาถูก และใช้ได้ผลดี ล่ามารถใช้แทนเปปโตน, ทริปโตน, โปรติโอล่เปปโตน เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจากล่ารอินทรีย์ที่มีราคาแพงได้ ดังนั้นอาจล่รุปได้ว่าเชื้อแต่ละล่ายพันธุ์จะต้องการแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันจากการทดลองดังกล่าวข้างต้น แม้ว่าล่ารล่กัดจากยีล่ต์และโปรติโอล่เปปโตนจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีคุณภาพดี ทำให้ได้เซลของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง ที่มีความล่ามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด แต่เนื่องจากล่ารล่กัดจากยีล่ต์และโปรติโอล่เปปโตนเป็นล่ารราคาแพง จึงเลือกใช้วัล่ดุทางการเกษตรซึ่งให้ผลผลิตรองลงมา แต่ราคาถูกกว่ามาก และที่ได้ผลดีคือ กากถั่วเหลือง จึงได้ทำการทดลองใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองที่ขนาดต่าง ๆ กัน และพบว่า เซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกากถั่วเหลือง 1.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์จะให้เซลที่มีความล่ามารถในการย่อย

แป้งสุกและแป้งดิบสูงสุด

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสสามารถใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือแป้ง เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และจากการทดลองหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม พบว่าเซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม 4.0 เปอร์เซ็นต์ แป้งมันสำปะหลังจะมีความสามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด Lineback และคณะ (73) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตขนาดพอเหมาะจะสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของ Aspergillus niger เมื่อใช้ไนโตรเจนอินทรีย์เป็นแหล่งของไนโตรเจน และ Hayashida (76) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมันฝรั่ง (potato starch) ความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส I ซึ่งใช้ในการย่อยแป้งดิบจาก Aspergillus awamori var kawachi ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองข้างต้น

เพื่อให้ได้เซลที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง จึงพยายามปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติมแอมโมเนียมซีเตรต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ที่เหมาะสม แต่ไม่สามารถใช้ในปริมาณสูง ๆ ดังกล่าวแล้ว เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เลี้ยงเซลที่ถูกตรึง พบว่าเซลที่ถูกตรึงของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 0.3 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซีเตรต ร่วมกับกากถั่วเหลืองจะให้เซลที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด และสอดคล้องกับการทดลองของ จตุรพร พรศิลป์ทิพย์ (83) ซึ่งกล่าวว่า การผสมแหล่งไนโตรเจนที่มาจากกากถั่วเหลืองร่วมกับแอมโมเนียมซีเตรตในอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง อะไมโลไมซีส (Amylomysis sp.) จะได้เอนไซม์ย่อยแป้งที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งดิบสูง

สำหรับเกลือแร่ที่เหมาะสมที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมโปแตสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะได้เซล Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงที่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบและแป้งสุกสูงสุด Sinkar และ Lewis (82) รายงานว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมกับการผลิตกลูโคอะไมเลส โดย Aspergillus niger ในอาหารเหลว ไกรฤกษ์ ธวัชพันธุ์ (85) พบว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.15 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1

เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการผลิตกลูโคอะไมเลสโดย Rhizopus oryzae ได้ดี และ Hayashida (76) กล่าวว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมในการผลิตกลูโคอะไมเลส I เพื่อใช้ในการย่อยแป้งดิบของ Aspergillus awamori var kawachi แสดงว่า โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง แต่ปริมาณที่ใช้แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อรา

สำหรับความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม Lineback และคณะ (73), Lewis และ Sinkar (86) รายงานว่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสของ Aspergillus niger คือ 3.0-5.0 และ Hayashida (76) พบว่าการเลี้ยง Aspergillus awamori และ Aspergillus oryzae ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดด่าง 2.0-4.0 จะทำให้เซลสามารถผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูง และ Alazard and Raimbault (75) พบว่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดย Aspergillus niger ในอาหารแข็งและอาหารเหลวคือ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. คือ 5.5 และ 4.0 ตามลำดับ ดังนั้นสรุปได้ว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์ต้องการความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน

4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบสำหรับ Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึงคือ 3.5 และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงคือ 4.5 และจากรายงานของ Meyrath (87) ได้กล่าวไว้ว่า ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้งของกลูโคอะไมเลสจาก Aspergillus oryzae อยู่ระหว่าง 3.5-5.0 และ Rhizopus sp. อยู่ระหว่าง 4.5-5.5 นอกจากนี้ จตุรพร พรศิลป์ทิพย์ (84) พบว่า กลูโคอะไมเลสที่สกัดจากอะไมโลไมซีสมีความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยแป้งสุกและแป้งดิบอยู่ในช่วงเดียวกันคือ 4.5-5.5 จากการทดลองนี้แม้ไม่ใช่เอนไซม์บริสุทธิ์ แต่เป็นการย่อยแป้งโดยเซลที่ถูกตรึง ซึ่งอาจมีการสร้างเอนไซม์หรือสารอื่น ๆ ร่วมด้วย แต่ผลการทดลองก็สอดคล้องกัน และสามารถกล่าวได้ว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยแป้งจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของรา

จากการทดลองแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยแป้งเป็น 30, 37, 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น ความสามารถในการย่อยแป้งสูงขึ้นทั้งใน Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง ทั้งนี้อาจเกิดจากเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีขึ้น แต่เนื่องจากจุดประสงค์ของการนำเซลที่ถูกตรึงไปใช้งาน ต้องการให้เซลนั้นมีความคงทนอยู่ได้นาน เพื่อนำไปใช้ย่อยแป้งแบบต่อเนื่อง Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. เป็นเชื้อราที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30°c ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ต่ำลงมา และเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องซึ่งใช้ในการย่อยแป้งแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาซึ่งจะทำการทดลองต่อไป

ภายหลังการปรับปรุงคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้เซลที่ถูกตรึงที่มีคุณภาพดี ได้นำเซล Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึง อัตราส่วน 1:1 พบว่าการใช้เซลที่ถูกตรึงของเชื้อรา 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกันในการย่อยแป้งจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงกว่า การใช้ Aspergillus oryzae ที่ถูกตรึง แต่จะต่ำกว่าการใช้ Rhizopus sp. เล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เซลที่ถูกตรึง 2 ชนิดร่วมกันในการย่อยแป้ง ก็แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในทางส่งเสริมความสามารถในการย่อยแป้งซึ่งกันและกัน เนื่องจากผลผลิตน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเชื้อผสมจะมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของผลบวกของปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยของ Aspergillus oryzae และ Rhizopus แต่ละตัว

การนำเซลที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่เพื่อดูประสิทธิภาพของเซลที่ถูกตรึงนั้นว่าสามารถนำกลับมาใช้ได้นานเท่าไร หรือศึกษาดูว่าจะนำกลับมาใช้ใหม่ได้กี่ครั้งในกรณีที่เป็นกระบวนการไม่ต่อเนื่อง (batch operation) โดยเปลี่ยนน้ำแป้งที่ใช้เป็นสารตั้งต้นทุก ๆ วัน พบว่าความสามารถของเซลที่ถูกตรึงในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งจะค่อย ๆ ลดลง ตามลำดับ จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ของการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่ Aspergillus oryzae และ Rhizopus sp. สร้างขึ้นเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซล และเอนไซม์จะละลายอยู่ในน้ำแป้งที่ใช้เป็นสารตั้งต้นเมื่อเปลี่ยนน้ำแป้งใหม่ เอนไซม์นั้นก็ถูกทิ้งไปด้วย ทำให้เซลต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นใหม่เพื่อใช้ในการย่อย และในน้ำแป้งที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของการย่อยไม่มีสารอาหารที่เพียงพอจะส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ขึ้นใหม่ ทำให้ความสามารถของเซลที่ถูกตรึงในการย่อยแป้งลดลงตามลำดับ

4.9 การย่อยแบบต่อเนื่อง

การย่อยแป้งแบบต่อเนื่องจะช่วยลดการสะสมของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย เช่น กลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์นำมาใช้ได้ง่าย และสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของจุลินทรีย์เมื่อสะสมปริมาณสูง (87) นอกจากนี้ยังสามารถเติมอาหารใหม่ให้แก่เซลตลอดเวลา และการเลือกใช้หอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่นเป็นผลดีที่มีการผ่านอากาศให้แก่เซลที่สังเคราะห์เอนไซม์ย่อยแป้งในหอปฏิกิริยาอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจาก Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงย่อยแป้งสุกได้ดี จึงศึกษาผลการย่อยแป้งสุกแบบต่อเนื่องของ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดเซชั่น และพบว่าความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงจะสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ใน 2 วันแรกของการทดลอง โดยให้ปริมาณน้ำตาลที่ถูกรีดิวส์ประมาณ 10 มก.ต่อ มล. หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดจากการย่อยจะลดลงอย่างช้า ๆ จนเหลือครึ่งหนึ่งของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้ในวันแรกเมื่อทำการทดลองได้ 5 วัน แล้วลดลงจนเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7-8 แต่ความสามารถในการย่อยแป้งยังคงอยู่แม้จนถึงวันที่ 12 ของการทดลอง แสดงว่า Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งออกมาตลอดเวลา แต่เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลจึงละลายอยู่ในสารละลายในหอปฏิกิริยา ดังนั้นในผลิตภัณฑ์ที่ไหลจากหอปฏิกิริยาจะมีเอนไซม์ปะปนออกมาด้วย ขณะเดียวกันน้ำแป้งใหม่ก็ไหลเข้าสู่หอปฏิกิริยาทำให้ปริมาณเอนไซม์ย่อยแป้งที่มีอยู่ในสารละลายภายในหอปฏิกิริยาลดลง และการสร้างเอนไซม์ขึ้นใหม่โดยเซลที่ถูกตรึง เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำกว่าอัตราที่เอนไซม์ถูกล้างออกจากหอปฏิกิริยา ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยลดลงเรื่อย ๆ แต่การที่เซลที่ถูกตรึงยังสามารถย่อยแป้งได้จนถึง 12 วันของการทดลอง แสดงว่าเซลยังไม่ตาย แต่อาจไม่มีสารอาหารเพียงพอสำหรับการสร้างเอนไซม์ขึ้นใหม่ในอัตราที่สูงพอที่จะรักษาระดับความสามารถในการย่อยแป้งให้คงที่ ต่อมาได้ลองเติมสารไนโตรเจนและเกลือแร่ให้แก่เซลที่ถูกตรึงหลังวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งเป็นเวลาที่ความสามารถในการย่อยแป้งจะเริ่มลดลงเล็กน้อยถ้าไม่เติมสารอาหารให้แก่เซลที่ถูกตรึง ภายหลัง 12 ชั่วโมง พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งโดยเซลที่ถูกตรึงจะยังคงที่ และเมื่อถ่ายสารละลายในหอปฏิกิริยาออกหมดและเติมน้ำแป้งใหม่ให้แก่เซล ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ย่อยแป้งในหอปฏิกิริยาไหลออกไปพร้อมกับสารละลายที่ถ่ายออก เซลจึงต้องสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งขึ้นใหม่ และในวันที่ 5 ของการทดลองความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงจะสูงกว่าวันที่ 4 แล้วค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ในวันถัดมา แสดงว่าสารอาหารที่เติมให้กับเซลสามารถเป็นแหล่งอาหารให้กับเซลที่ถูกตรึงในการ

สร้างเอนไซม์ขึ้นใหม่ได้ จึงทดลองเติมสารอาหารให้กับเซลที่ถูกตรึงเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น โดยไม่ถ่ายเอาสารอาหารออกหลังจากเติมลงไป เพื่อให้คงมีสารอาหารอยู่ในหอปฏิกิริยาและไม่เป็นการล้างเอาเอนไซม์ที่มีอยู่ในสารละลายในหอปฏิกิริยาออกไปด้วย พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงจะคงที่ไปจนถึงวันที่ 6 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ จนถึงวันที่ 9 แล้วจะลดลงอย่างรวดเร็ว จนความสามารถในการย่อยลดลงเหลือครึ่งหนึ่งหลังวันที่ 10 ของการทดลอง แสดงว่าสารอาหารที่เติมลงไปทำให้เซลที่ถูกตรึงมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยแป้งได้ในระยะเวลานานขึ้นกว่าการไม่เติมสารอาหารให้แก่เซล แต่หลังจากระยะเวลาหนึ่ง แม้ว่าจะเติมสารอาหารให้แก่เซลก็ตามแต่ไม่สามารถรักษาความสามารถในการย่อยของเซลได้อีก

เนื่องจากการทดลองของ Cheetham และคณะ (79) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของเม็ดเจลให้มีความคงทนสูงขึ้น จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลของ Rhizopus sp. ที่บรรจุในหอปฏิกิริยา พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงโดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์จะต่ำกว่าใช้โซเดียมอัลจิเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์ และความสามารถในการย่อยแป้งลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของวันแรกภายใน 3 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต แม้ว่าจะทำให้ความคงทนของเม็ดเจลสูงขึ้น แต่จะทำให้รูพรุนในเม็ดเจลมีขนาดเล็กลง ทำให้การผ่านเข้าออกของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลที่ถูกตรึงและน้ำแป้งในเม็ดเจลเกิดได้ยาก ความสามารถในการย่อยแป้งจึงลดลง และจากการทดลองใช้โซเดียมอัลจิเนต 0.75 เปอร์เซ็นต์ในการตรึงสปอร์ของรา พบว่าที่ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เซลที่ถูกตรึงจะมีความสามารถในการย่อยแป้งต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน โดยจะย่อยแป้งได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ใน 2 วันแรก และลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าเซลที่ถูกตรึงไม่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งในปริมาณที่สูงพอที่จะรักษาระดับความสามารถในการย่อยแป้งไว้ได้แม้จะเติมแหล่งอาหารให้แก่เซล ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ต่ำเกินไปไม่เพียงพอที่จะรักษาสภาพของเม็ดเจล เมื่อนำเซลที่ถูกตรึงนั้นมาใช้แบบต่อเนื่องเซลบางส่วนอาจหลุดออกจากเม็ดเจลและเกิดการแตกหักของสายใยได้ง่าย ทำให้ความสามารถในการย่อยลดลง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลมีอิทธิพลต่อความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง ซึ่งต่างจากผลการทดลองแบบ

ไม่ต่อเนื่องซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตไม่มีผลต่อความสามารถในการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึง การย่อยแป้งโดยใช้เซลที่ถูกตรึงแบบไม่ต่อเนื่องซึ่งกระทำในช่วงระยะเวลาเพียง 5-6 ชั่วโมง อาจเป็นระยะเวลาสั้นเกินกว่าที่จะสามารถเห็นความแตกต่างของความสามารถในการย่อยของเซลที่ถูกตรึงโดยโซเดียมอัลจิเนต ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการย่อยเกิดขึ้นโดยสายใยที่อยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการย่อยในหอปฏิกิริยาซึ่งกระทำติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ผลของความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่มีต่อขนาดรูพรุนของเม็ดเจลและความคงทนของเม็ดเจล ที่มีต่อความสามารถในการส่งผ่านอาหารผ่านรูพรุนเริ่มมีบทบาท เนื่องจากเซลที่อยู่ภายในเม็ดเจลสามารถช่วยในการย่อยให้เกิดได้ดีขึ้น

จากการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแป้งที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการย่อยเป็น 1.5 เปอร์เซนต์ พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งจะสูงถึง 80 เปอร์เซนต์ใน 4 วันแรก ได้น้ำตาลรีดิวส์ 13 มก.ต่อ มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าเมื่อใช้น้ำแป้ง 1.0 เปอร์เซนต์ และความสามารถในการย่อยแป้งจะลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งคือ 40 เปอร์เซนต์ ได้ปริมาณน้ำตาล 7 มก.ต่อ มล. ในวันที่ 9 ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อใช้น้ำแป้งความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ แสดงว่าแม้เมื่อเติมสารอาหารให้แก่เซลที่ถูกตรึงแล้วก็ตามก็ทำให้ความสามารถในการย่อยแป้งโดยเซลที่ถูกตรึงลดลง แต่เกิดขึ้นช้า ๆ กว่าเมื่อไม่เติมสารอาหารให้แก่เซลที่ถูกตรึงเลย และการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแป้งจะดีในข้อที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นในปริมาตรของเหลวที่เท่ากัน และจากการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยแป้งของ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในหอปฏิกิริยา โดยวิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ พบว่าผลผลิตที่ได้จากการย่อยแป้งกลูโคสอย่างเดียว แสดงว่าการย่อยแป้งของ Rhizopus sp. ที่ถูกตรึงในหอปฏิกิริยาเกิดจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

จากการเก็บตัวอย่างที่เกิดจากการย่อยแป้งของเซลที่ถูกตรึงที่ระดับความสูงต่าง ๆ ของหอปฏิกิริยา เพื่อหาค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยโดยเซลที่ถูกตรึงที่เวลาหนึ่ง ๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ระดับความสูงต่าง ๆ ของหอปฏิกิริยามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย หรืออาจกล่าวได้ว่ามีความเข้มข้นเท่ากันตลอดทุกความสูง แสดงว่าการหมุนเวียนของสารละลายในหอปฏิกิริยาเป็นไปอย่างดี การผสมผสานของน้ำตาลที่เกิดขึ้น น้ำแป้งที่ยังเหลือ และจำนวนเม็ดเจลเป็นไปอย่างทั่วถึงทุกความสูงของหอปฏิกิริยา แสดงว่าระบบของฟลูอิดไดเซชั่นนี้เป็นระบบการทำงานแบบการไหลย้อนกลับที่มีประสิทธิภาพสูง