

บทที่ 4

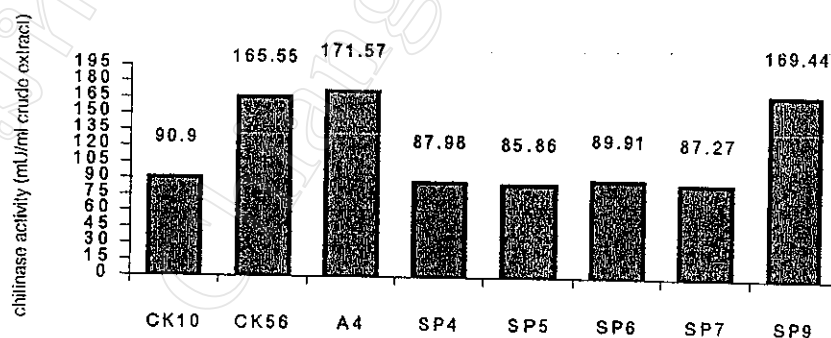
ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา

จากการแยกเชื้อราจากดินตัวอย่างบริเวณต่างๆ พบว่ามีเชื้อราที่สามารถเจริญ ได้บนอาหารแข็ง colloidal chitin ได้จำนวน 64 ไอโซเลท และเชื้อราที่คัดเลือกได้จากหน่วยเก็บเชื้อจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (Microbiology Section, Chiang Mai University ; MSCMC culture collection) 6 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 70 ไอโซเลท ตาราง 14 และ 15

2. การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตไคตินเอสได้สูงในอาหารเหลว

จากการเลี้ยงเชื้อ 70 ไอโซเลทในอาหารเหลว EPM เพื่อผลิตไคตินเอส พบว่า เชื้อราไอโซเลท CK10, CK56, A4, SP4, SP5, SP6, SP7 และ SP9 ทั้งหมด 8 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงในชุดการทดลอง ที่ผสม *Lactobacillus* sp. PJ15 ผลิตไคตินเอสสูงระหว่าง 85.86-171.57 mU/ml crude extract ภาพ 2 ตาราง 16



ไอโซเลทเชื้อรา

ภาพ 2 ค่า chitinase activity ของเชื้อรา 8 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium ร่วมกับ *Lactobacillus* sp. PJ15

3. ทดสอบความสามารถในการผลิตไคตินเนสในอาหารแข็ง

3.1 จากการนำเชื้อราที่มีค่าการทำงานของไคตินเนสสูงในอาหารเหลว EPM จำนวน 8 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไคตินเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบ กระจกบดพบว่า เชื้อราไอโซเลท SP6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบด ให้ค่าการทำงานของไคตินเนสสูงสุด เท่ากับ 10.31 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 5.00 mU/mg protein ตาราง 7 และภาพ 3 จึงเลือกเชื้อราไอโซเลท SP6 ไปหมักต่อในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 7 Chitinase activity และ specific activity ของเชื้อราไอโซเลท CK10, CK56, A4, SP4, SP5, SP6, SP7 และ SP9 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง กระจกบด

ชุดการทดลอง	chitinase activity (mU/gIDS)	Specific activity (mU/mg protein)
เปลือกกุ้งบด-control	0	0
กระจกบด-control	0	0
เปลือกกุ้งบด+CK10	0	0
เปลือกกุ้งบด+CK56	0	0
เปลือกกุ้งบด+A4	8.84	3.40
เปลือกกุ้งบด+SP4	0	0
เปลือกกุ้งบด+SP5	0	0
เปลือกกุ้งบด+SP6	10.31	5.00
เปลือกกุ้งบด+SP7	0	0
เปลือกกุ้งบด+SP9	0	0
กระจกบด+CK10	0	0
กระจกบด+CK56	6.35	4.00
กระจกบด+A4	0	0
กระจกบด+SP4	0	0
กระจกบด+SP5	0	0
กระจกบด+SP6	0	0
กระจกบด+SP7	2.27	2.00
กระจกบด+SP9	0	0



ภาพ 3 เพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดและอาหารแข็งกระดองปูบดในถุงพลาสติก ขนาด 8"x12"

3.2 เมื่อนำเชื้อราไอโซเลท SP6 มาทดสอบความสามารถในการผลิตโคคิเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดที่มีการผสมข้าวโพดหมัก หรือ *Lactobacillus* sp. PJ15 หรือกรดแลคติกลงในระบบ และแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 11 ชุด เปรียบเทียบภาระในการหมักระหว่าง ถุงพลาสติกขนาด ใหญ่ 8"x12" ถุงพลาสติกขนาดเล็ก 5"x7" และจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 mm พบว่าการหมักระหว่าง ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ 8"x12" และ ถุงพลาสติกขนาดเล็ก 5"x7" ไม่พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์โคคิเนส ส่วนจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 mm พบว่าการทำงานของเอนไซม์โคคิเนสสูงอยู่ใน 4 ชุดการทดลอง คือ X+SP6, X+SP6+LAB, X+SP6+กรดแลคติก และ X+SP6+CSs ค่าการทำงานของโคคิเนสอยู่ในช่วงระหว่าง 1.35-14.14 mU/ml crude extract (ตาราง 8) จึงเลือกภาระจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 mm เป็นภาระในการหมักต่อไป

ตาราง 8 Chitinase activity และ specific activity ของเชื้อราไอโซเลท SP6 ใน 11 ชุดการทดลองเพาะเลี้ยงในภาชนะจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 mm

ชุดการทดลอง	chitinase activity		specific activity (mU/mg protein)
	(mU/ml crude extract)	(mU/gIDS)	
X+SP6*	14.14	7.07	0.53
X+SP6+LAB*	1.35	0.67	0.05
X+SP6+กรดแลกติก*	12.49	6.24	0.44
X+SP6+CSn	2.40	0.60	0.08
X+SP6+LAB+CSn	0	0	0
X+LAB	0	0	0
X+กรดแลกติก	0	0	0
X+CSn	0	0	0
X+SP6+CSs*	3.61	0.90	0.12
X+SP6+LAB+CSs	0	0	0
X+CSs	0	0	0

หมายเหตุ X = เปลือกกุ้งบด LAB = *Lactobacillus* sp. PJ15

CSn = ข้าวโพดหมักไม่ฆ่าเชื้อ CSs = ข้าวโพดหมักฆ่าเชื้อ

3.3 นำเชื้อราไอโซเลท SP6 มาทดสอบความสามารถในการผลิตไคตินเอสในอาหารแข็ง เปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับการใช้เปลือกกุ้งสกัดที่มีการผสมข้าวโพดหมัก, *Lactobacillus* sp. PJ15 และ กรดแลกติกลงในระบบ แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงในชุดการทดลอง X+SP6+CSs ให้ค่าการทำงานของไคตินเอสสูงสุดเท่ากับ 26.33 mU/ml crude extract มีค่า specific activity 2.20 mU/mg protein ผลการทดลองตาราง 9 และภาพ 4 ดังนั้นเราจึงเลือกเปลือกกุ้งสกัดเป็นสับสเตรทในการหมักต่อไป

ตาราง 9 Chitinase activity และ specific activity ของเชื้อราไอโซเลท SP6เพาะเลี้ยงใน
เปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับเปลือกกุ้งสด

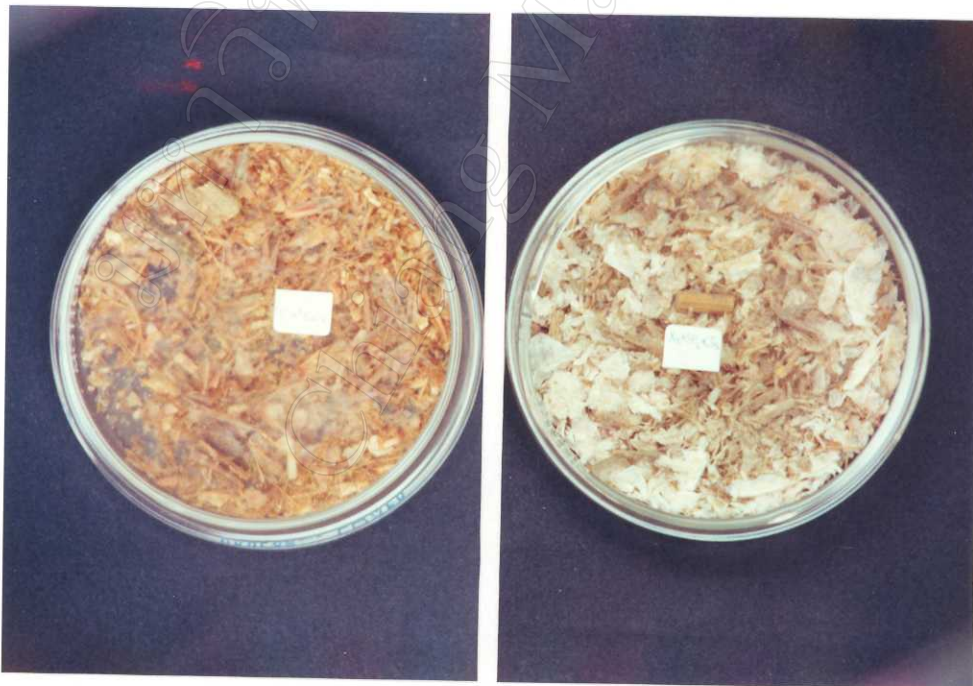
ชุดการทดลอง	chitinase activity		specific activity
	(mU/ml crude extract)	(mU/gIDS)	(mU/mg protein)
Xs+SP6	6.17	3.08	0.20
Xs+SP6+LAB	0	0	0
Xs+SP6+กรดแลคติก	6.32	3.16	0.30
Xs+SP6+CSs	12.79	3.19	0.60
Xt+SP6	4.21	2.10	0.30
Xt+SP6+LAB	18.51	9.25	1.60
Xt+SP6+กรดแลคติก	10.38	5.19	0.90
Xt+SP6+CSs*	26.33	6.58	2.20

หมายเหตุ Xs = เปลือกกุ้งบดมาเชื้อ

LAB = *Lactobacillus* sp. PJ15

Xt = เปลือกกุ้งสดมาเชื้อ

CSs = ข้าวโพดหมักมาเชื้อ



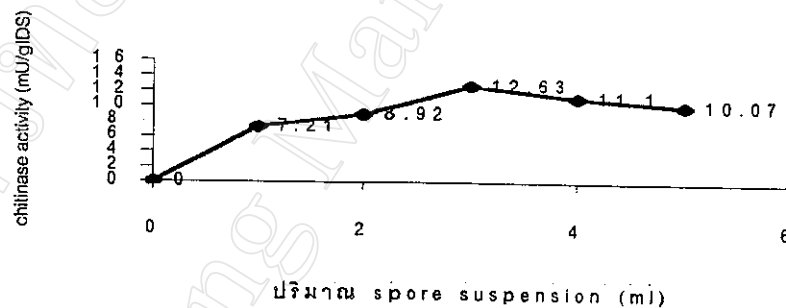
ภาพ 4 เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 ในเปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับเปลือกกุ้งสด

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินเนสของเชื้อราไอโซเลท SP6

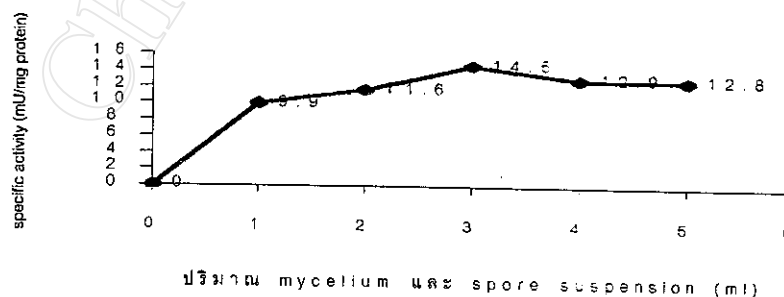
จากการนำเชื้อราไอโซเลท SP6 ทดสอบการผลิตโคตินเนสโดยเปรียบเทียบการใช้เปลือกกุ้งบดกับการใช้เปลือกกุ้งสกัดเป็นสับสเตรทเราพบว่าชุดการทดลองที่ใช้เปลือกกุ้งสกัดผสมกับข้าวโพดหมักเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 ให้ค่าการทำงานของโคตินเนสสูงที่สุด เราจึงนำชุดการทดลองดังกล่าวมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินเนสของเชื้อราไอโซเลท SP6 ดังนี้

4.1 ปริมาณ mycelium และ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินเนส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 โดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดและข้าวโพดหมักในอัตราส่วน 2 g : 2 g มีเชื้อตั้งต้นแบบ mycelium และ spore suspension ปริมาตรแตกต่างกันคือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วันพบว่าเชื้อราไอโซเลท SP6 มีค่าการทำงานของโคตินเนสสูงที่สุดในการหมักที่มีปริมาณ mycelium และ spore suspension 3 ml pH หลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.7 มีค่า chitinase activity เท่ากับ 12.63 mU/ gIDS และ specific activity เท่ากับ 14.50 mU/mg protein ภาพ 5 และ ตาราง 17



(a) chitinase activity

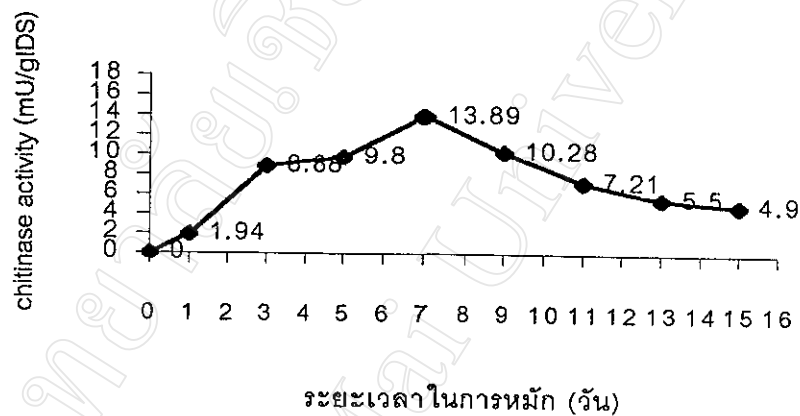


(b) specific activity

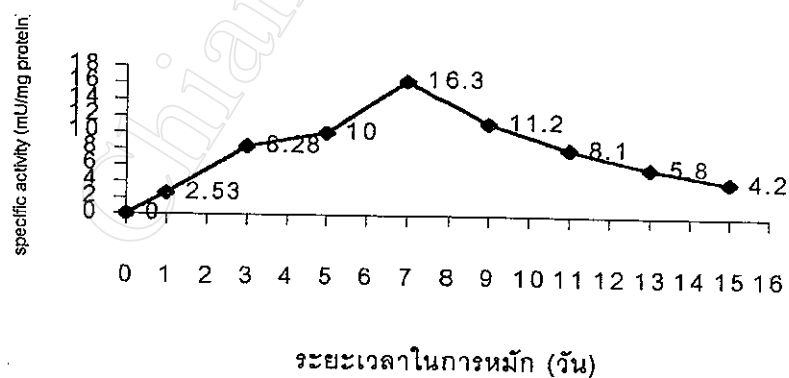
ภาพ 5 ปริมาณ mycelium และ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินเนสของเชื้อราไอโซเลท SP6 (a) chitinase activity (b) specific activity

4.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักในอาหารแข็งต่อการผลิตไคตินเนส

จากการเพาะเลี้ยง เชื้อราไอโซเลต SP6 โดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสัปดาห์ผสม ข้าวโพดหมักอัตราส่วน 2 g : 2 g ที่มีเชื้อตั้งต้นแบบ mycelium และ spore suspension 3 ml บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C มีระยะเวลาในการหมักอาหารแข็งแตกต่างกันคือ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วัน ตามลำดับ พบว่าระยะเวลาในการหมักอาหารแข็งที่ทำให้ไคตินเนสสูงที่สุดคือ 7 วัน pH หลังการทดลองของอาหารแข็งเท่ากับ 7.5 โดย chitinase activity เท่ากับ 13.89 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 16.30 mU/mg protein ภาพ 6 และ ตาราง 18



(a) chitinase activity

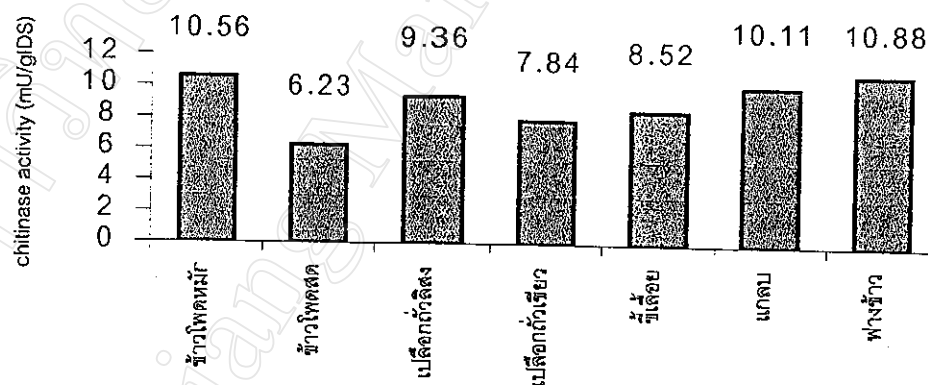


(b) specific activity

ภาพ 6 ระยะเวลาที่เหมาะสมของการหมักในอาหารแข็งต่อการผลิตไคตินเนสของ เชื้อราไอโซเลต SP6 (a) chitinase activity (b) specific activity

4.3 วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินของเชื้อราไอโซเลท SP6

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 มีเชื้อตั้งต้นแบบ mycelium และ spore suspension 3 ml ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรแตกต่างกัน คือ เปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดหมัก, เปลือกกุ้งสกัดต่อข้าวโพดสด, เปลือกกุ้งสกัดต่อเปลือกถั่วลิสง, เปลือกกุ้งสกัดต่อเปลือกถั่วเขียว, เปลือกกุ้งสกัดต่อขี้เถ้า, เปลือกกุ้งสกัดต่อแกลบ และเปลือกกุ้งสกัดต่อฟางข้าว อัตราส่วน 2 g : 2 g ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท SP6 สามารถผลิตไคตินเนสได้สูงที่สุดในอาหารแข็งเปลือกกุ้งผสมกับฟางข้าว มีค่า chitinase activity เท่ากับ 10.88 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 14.36 mU/mg protein ภาพ 7 และ ตาราง 19

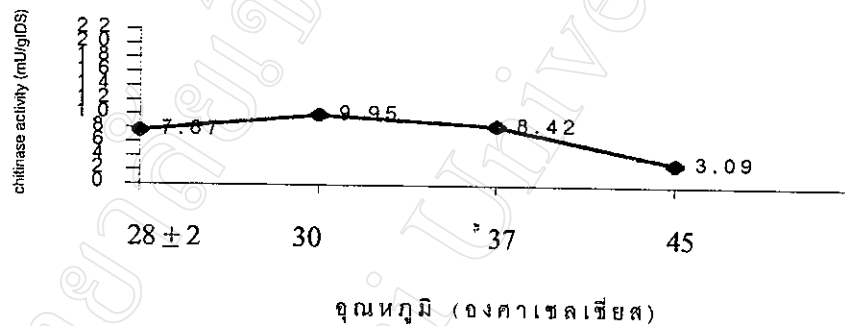


วัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ที่เติมในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัด

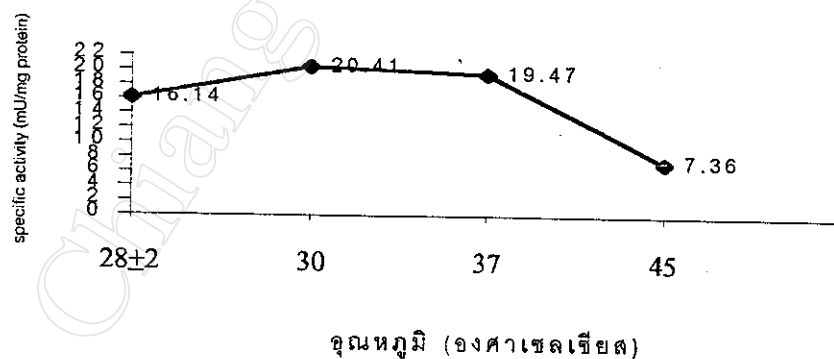
ภาพ 7 การผลิตไคตินเนสของ *Aspergillus fumigatus* SP6 เลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัด และเติมวัสดุเหลือทิ้งต่างๆ ที่เหมาะสม

4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของเชื้อราไอโซเลท SP6

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 โดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสัปดาห์ผสม ฟางข้าวอัตราส่วน 2 g : 2 g มีเชื้อตั้งต้นเป็น mycelium และ spore suspension 3 ml เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 30°C , 37°C และ 45°C พบว่าเชื้อราไอโซเลท SP6 สามารถผลิตไคตินเนสได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C pH ของอาหารหลังการหมัก เท่ากับ 7.0 โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 9.95 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 20.41 mU/mg protein ภาพ 8 และ ตาราง 20



(a) chitinase activity



(b) specific activity

ภาพ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเนสของเชื้อราไอโซเลท SP6 (a) chitinase activity (b) specific activity

4.5 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสทั้งหมดยกกับการเติมอาหารพื้นฐานลงในอาหารแข็ง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 มีเชื้อตั้งต้นเป็น mycelium และ spore suspension 3 ml อัตราส่วนสับสเตรทเปลือกกุ้งสกัดต่อฟางข้าว 2 g : 2 g ซึ่งเปรียบเทียบกับสับสเตรทที่มีการเติมอาหารพื้นฐานลงไป 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท SP6 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดผสมฟางข้าวไม่มีการเติมอาหารพื้นฐานมี chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 19.40 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 36.96 mU/mg protein แสดงในตาราง 10 และภาพ 9

ตาราง 10 chitinase activity และ specific activity ของเชื้อราไอโซเลท SP6 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดผสมฟางข้าวเปรียบเทียบกับสับสเตรทที่มีการเติมอาหารพื้นฐาน

ชุดการทดลอง	chitinase activity (mU/gIDS)	specific activity (mU/mg protein)
SP6+เปลือกกุ้งสกัด+ฟางข้าว	19.40	36.96
SP6+เปลือกกุ้งสกัด+ฟางข้าว+อาหารพื้นฐาน	18.04	40.10

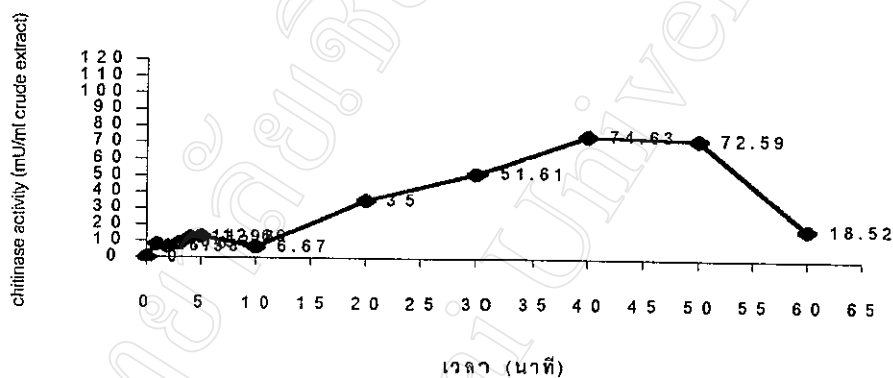


ภาพ 9 เพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดผสมฟางข้าว

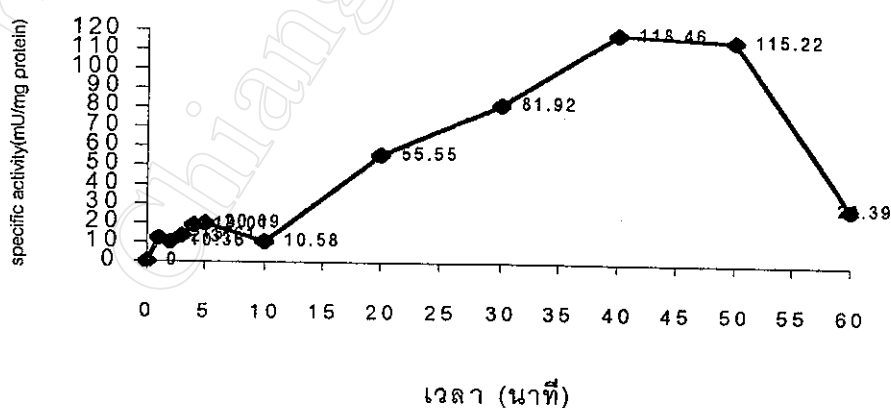
5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

5.1 ผลของเวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

การตรวจวัด chitinase activity และ specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *ไอโซเลท SP6* ในระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน คือ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าที่ระยะเวลา 40 นาที มี chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 74.63 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 118.46 mU/mg protein ภาพ 10 และตาราง 21



(a) chitinase activity

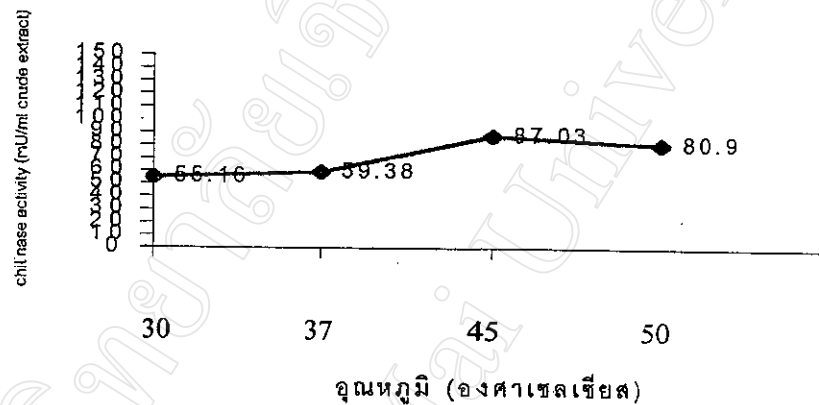


(b) specific activity

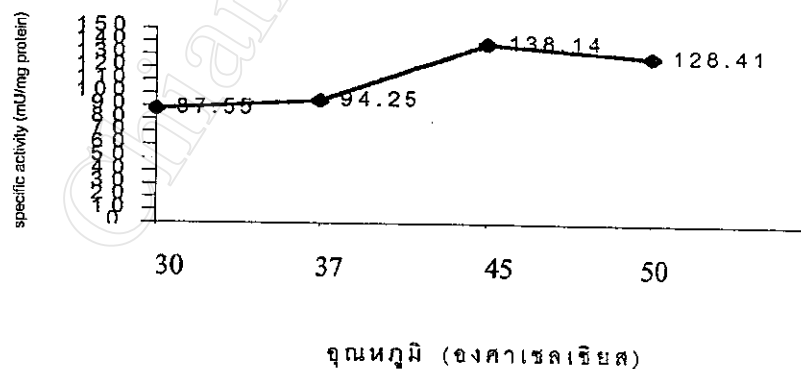
ภาพ 10 ผลของเวลาที่ใช้บ่มไคตินเนสกับสับสเตรทที่เหมาะสม (a) chitinase activity
(b) specific activity

5.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

การตรวจวัด chitinase activity และ specific activity ที่ผลิตจากเชื้อราไอโซเลท SP6 ใช้เวลาการบ่ม 40 นาที ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30°C, 37°C, 45°C และ 50°C ตามลำดับพบว่าที่อุณหภูมิ 45°C มี chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 87.03 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 138.14 mU/mg protein ภาพ 11 และตาราง 22



(a) chitinase activity

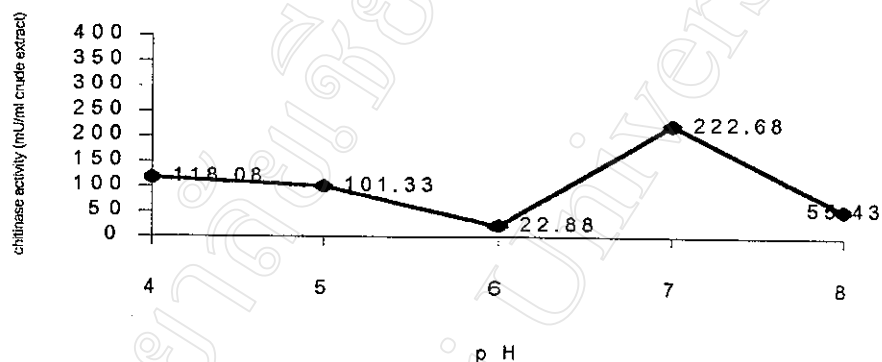


b) specific activity

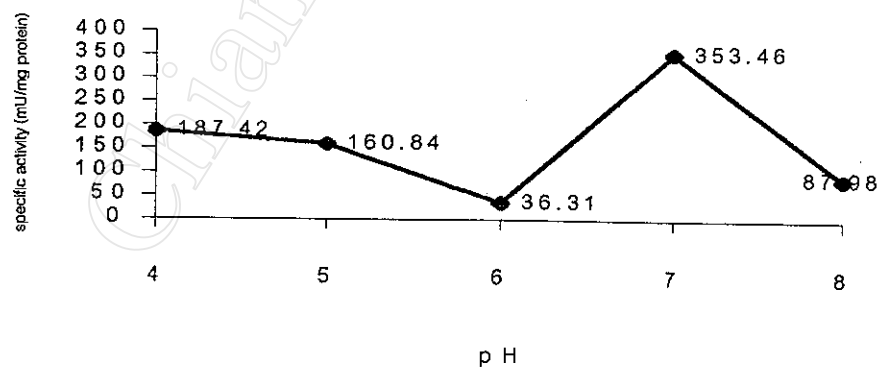
ภาพ 11 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไคตินเนสที่เหมาะสม (a) chitinase activity
(b) specific activity

5.3 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

การตรวจวัด chitinase activity และ specific activity ของเอนไซม์ไคตินเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *ไฮโซเลท* SP6 ในระยะเวลาการบ่มที่ 40 นาที อุณหภูมิ 45°C pH ต่างๆ กันคือ 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่าที่ pH เท่ากับ 7.0 มี chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 222.65 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 353.46 mU/mg protein ภาพ 12 และตาราง 23



(a) chitinase activity



(b) specific activity

ภาพ 12 ผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของไคตินเนสที่เหมาะสม (a) chitinase activity
(b) specific activity

6 การป่งชนิดของเชื้อราไอโซเลท SP 6

จากการนำเชื้อราไอโซเลท SP6 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek's solution agar เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าโคโลนีของเชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.5 cm เมื่อตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พบว่าเส้นใยมีลักษณะบางใส ก้านสปอร์มีสีเขียว กลุ่มสปอร์มีสีน้ำตาล ลักษณะรูปร่างของกลุ่มก้านสปอร์และสปอร์ (conidial head) เป็นทรงกระบอก เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MYG ที่อุณหภูมิ 20°C, อุณหภูมิห้อง (28 ± 2°C), 37°C, 45°C และ 50°C พบว่าทั้ง 5 อุณหภูมิมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (cm.) และลักษณะของโคโลนี ตาราง 11

ตาราง 11 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และลักษณะของโคโลนีของ *Aspergillus fumigatus* SP6

อุณหภูมิ (°C)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโคโลนี (cm.)	ลักษณะของโคโลนี
20	1.5	เส้นใยสีขาวสปอร์สีเขียว ลักษณะการแผ่ของโคโลนีเรียบ
อุณหภูมิห้อง (28±2)	8.7	เส้นใยสีขาวสปอร์สีเขียวสปอร์มีปริมาณมาก ลักษณะการแผ่ของโคโลนีเรียบ
37	8.7	เส้นใยสีขาวสปอร์สีเขียวสปอร์มีปริมาณมาก ลักษณะการแผ่ของโคโลนีเรียบ
45	2.6-3.3	เส้นใยสีขาวสปอร์สีเขียว ลักษณะการแผ่ของโคโลนี เป็นชั้นๆ ลักษณะ substrate mycelium จีบรอบทิศ
50	เชื้อราไม่เจริญเติบโต	-

เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบน slide culture พบว่า vesicle มีลักษณะเป็นคนโท มี sterigma ชั้นเดียวชั้นคลุม vesicle โคโคนีเดียมีลักษณะรีเกือบกลมโคโคนีเดียมี 4 สปอร์ต่อกันเป็นชั้น มีสีเขียว ไม่พบ cleistothecium (ภาพ 13) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับหนังสือ The Genus *Aspergillus* (Raper and Fennell, 1965) พบว่าเป็นกลุ่ม *Aspergillus fumigatus* โดยมีคำค้นอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Barnett and Hunter, 1987)

Superkingdom *Eucaryota*

Kingdom *Myceteae*

Division *Amastigomycotina*

Subdivision *Deuteromycotina*

Class *Deuteromycetes*

Subclass *Hyphomycetidae*

Order *Moniliales*

Family *Moniliaceae*

Genus *Aspergillus*

Species *A. fumigatus* SP6



10 μ m

ภาพ 13 เส้นใยและสปอร์ *Aspergillus fumigatus* SP6 ภายใต้งด้องจุลทรรศน์และภายใต้
กล้อง stereo