

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกและคัดเลือกรเชื้อราจากตัวอย่างดิน และเห็ดแห้งปนเปื้อนเชื้อรา ใช้ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ได้เชื้อราทั้งหมด 64 ไอโซเลท รวมกับเชื้อราที่คัดเลือกได้จากหน่วยเก็บเชื้อ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 6 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 70 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็น thermotolerant เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-45 °C Gomes *et al.* (2000) ได้คัดแยกเชื้อ actinomycetes 5 ไอโซเลทจากดินบริเวณใต้ดิน cerrado ในประเทศบราซิล โดยคัดแยกด้วยอาหาร chitin agar พบกิจกรรมของ chitinolytic enzyme คือ exochitinase และ chitinase De Boer *et al.* (1998) คัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณชายหาดที่มีกิจกรรมของไคตินเอส คัดแยกเชื้อใน water agar ผสม colloidal chitin จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่คือ *Pseudomonas* spp. และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในปริมาณต่ำคือ *Xanthomonas* spp. และ *Cytophaga* spp.

นำเชื้อราทั้ง 70 ไอโซเลท ทดสอบการผลิตไคตินเอสในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ที่มี 0.5% colloidal chitin เป็นสับสเตรท เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับการใช้ *Lactobacillus* sp. PJ15 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคุณไพรินทร์ บุตรกระจำ (2543) เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อราใน EPM เพียงอย่างเดียว กับการเพาะเลี้ยงเชื้อราร่วมกับ *Lactobacillus* sp. PJ15 ใน EPM พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อรา 8 ไอโซเลทคือ CK10, CK56, A4, SP4, SP5, SP6, SP7 และ SP9 ในอาหารเหลว EPM ร่วมกับ *Lactobacillus* sp. PJ15 ให้ค่า chitinase activity สูงอยู่ในช่วง 85.86-171.57 mU/ml จากการศึกษา Lactic acid bacteria (LAB) ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกและจากคุณสมบัตินี้สามารถย่อยสลาย colloidal chitin ที่เป็นสับสเตรทใน EPM ให้ได้ โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุพวก แคลเซียมคาร์บอเนต แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ซิลิกา และซัลเฟอร์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่ช่วยทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีและทำให้ผลิตไคตินเอสออกมาได้มาก เป็นปัจจัยที่ทำให้การทำงานของไคตินเอสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อราใน EPM เพียงอย่างเดียว Zakaria *et al.* (1998) ได้นำ LAB มาใช้ในกระบวนการหมักแบบ batch โดยใช้ scampi waste ผสมกับกากโคสบรรจุในถังหมักที่มีการหมุนเวียนอากาศ เชื้อที่ใช้ในการหมักคือ *Lactobacillus paracasei* A3 ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน มี pH เท่ากับ 5.0 และหลังจากมีการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่า แคลเซียมที่ได้จาก scampi waste จะมีคุณสมบัติละลายได้รวดเร็ว

เมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้น ของแข็งที่สกัดได้น้ำหนักแห้งคือ ไคติน 17.5% โปรตีน 77.5% และแคลเซียม 61.0% ของเหลวเหลือทิ้งภายหลังการหมักสามารถนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ได้

การศึกษากิจกรรมผลิตไคตินเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดเปรียบเทียบกับอาหารแข็งกระดองปูบดของเชื้อรา 8 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราไอโซเลท SP6 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 10.31 mU/gIDS และ specific activity เท่ากับ 5.00 mU/mg protein การที่เปลือกกุ้งมีการทำงานของไคตินเนสมากกว่าอาจมาจากเปลือกกุ้งมีความหนาแน่นน้อยกว่าและมีขนาดที่ใหญ่ทำให้มีช่องว่างของอากาศมากกว่ากระดองปูจึงทำให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี และสร้างไคตินเนสได้มากกว่ากระดองปู มีการศึกษาในแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* K-187 โดยใช้เปลือกกุ้งและกระดองปู 4.75% และส่วนประกอบของ carboxymethyl cellulose 0.75%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.3% และ yeast extract 0.35% เป็นสับสเตรทในการผลิตไคตินเนส (Wang *et al.*, 1999)

เมื่อเลือกเปลือกกุ้งบดเป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 เพื่อผลิตไคตินเนสที่มีการผสม *Lactobacillus* sp. PJ15 หรือ กรดแลกติก หรือ ข้าวโพดหมักมาเชื้อ หรือไม่มาเชื้อ แบ่งเป็นชุดการทดลองต่างๆ พบว่า ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเชื้อในเปลือกกุ้งบด, เชื้อราเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus* sp. PJ15 ในเปลือกกุ้งบด, เชื้อราเพาะเลี้ยงในเปลือกกุ้งบดเติมกรดแลกติก และเชื้อราเพาะเลี้ยงในเปลือกกุ้งบดเติมข้าวโพดหมักมาเชื้อ มีค่า chitinase activity สูงอยู่ในช่วง 1.35-14.14 mU/ml แล้วทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้เปลือกกุ้งบดกับเปลือกกุ้งสกัดเป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ชุดการทดลองดังกล่าว พบว่าชุดการทดลองที่ใช้เปลือกกุ้งสกัดผสมข้าวโพดหมักมาเชื้อเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SP6 ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 26.33 mU/ml และ specific activity เท่ากับ 2.20 mU/mg protein การที่เปลือกกุ้งสกัดมีการทำงานของเอนไซม์มากกว่าเปลือกกุ้งบดเนื่องจาก ไคตินเนสสามารถย่อยสลายเปลือกกุ้งสกัดที่ผ่านการ treat ซึ่งกำจัดโปรตีนและเกลือแร่ออกไปแล้ว ทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินเนสต่อเปลือกกุ้งสกัดได้ end-product มากกว่าเปลือกกุ้งบด จึงทำให้วัดค่า chitinase activity ได้สูงกว่า ซึ่งในเปลือกกุ้งยังเต็มไปด้วยโปรตีนและแร่ธาตุอยู่มากจึงทำให้การย่อยสลายไคตินในเปลือกกุ้งลำบากเพราะจำเป็นต้องมีเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น โปรตีเอส (protease) ช่วยย่อยโปรตีนในเปลือกกุ้งให้ได้ไคตินออกมาก่อนแล้วไคตินเนสจึงจะสามารถเริ่มทำงาน และการมีข้าวโพดหมักเป็นอาหารเสริมช่วยทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราดีขึ้นส่งผลต่อการผลิตไคตินเนสออกมาได้มากขึ้นด้วย Chinadit *et al.* (1998) ใช้สารเคมีในการกำจัดโปรตีนและเกลือแร่จากเปลือกกุ้งเพื่อให้ได้ไคตินในสถานะที่แตกต่างกัน โดยใช้ 4% NaOH ในการกำจัดโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้ 1M HCl

กำจัดแร่ธาตุที่อุณหภูมิต่างๆ และกวนตลอดเวลาในระหว่างการกำจัด พบว่าสกัดไคตินได้ 34% (170 g) จากการใช้เปลือกกุ้ง 500 g

เมื่อเปรียบเทียบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ผสมเข้าในระบบหมัก บ่มที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าวัสดุเหลือทิ้งฟางข้าวให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 10.88 mU/gIDS ส่วนในข้าวโพดหมักให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 10.11 mU/gIDS จากค่า chitinase activity ของฟางข้าว และข้าวโพดหมักให้ค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นพกาญจน์ (2543) เพาะเลี้ยง *Aspergillus fumigatus* SI-13 ที่แยกได้จากหัวขอม้าอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธี SSF พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินเอส เพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานที่มี 0.1% แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณความชื้น 53.80% ที่ pH 5.0 อัตราส่วนเปลือกกุ้ง บดต่อข้าวโพดหมักเท่ากับ 1 : 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 11 วัน โดยมีเชื้อตั้งต้นเป็น spore suspension 30.8% มีค่า chitinase activity เท่ากับ 110.90 mU/ml Smits *et al.* (1996) ศึกษาการเจริญของ *Trichoderma reesei* QM9419 เพาะเลี้ยงในรำข้าวสาลีด้วยวิธี solid state fermentation ; SSF ให้อุณหภูมิและความชื้นคงที่ ภายหลังการหมัก 125 ชั่วโมง วัดองค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปในรำข้าวสาลี ดังนี้ ปริมาณ glucosamine อัตราการใช้ออกซิเจน อัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ และ เอนไซม์ 4 ชนิดคือ CMCase, amylase, xylanase และ protease พบว่า อัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นกับองค์ประกอบของรำข้าวสาลีที่เปลี่ยนไปและน้ำหนักของรำข้าวสาลีที่หายไป ปริมาณการใช้ glucosamine ขึ้นกับอัตราการเจริญและการหายใจของเชื้อรา การลดลงของอัตราการใช้ออกซิเจนและการเริ่มอัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อมี glucosamine สูงกว่า 50% และเมื่อปริมาณ glucosamine สูงสุด อัตราการใช้ออกซิเจนและอัตราการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะลดลง ปริมาณของ glucosamine มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของ xylanase และ protease แบบคงที่

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสของเชื้อราไอโซเลท SP6 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งสกัดผสมฟางข้าวมีเชื้อตั้งต้นในรูป mycelium และ spore suspension ปริมาตร 3 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 19.40 mU/gIDS ซึ่งไม่ได้มีการเติมอาหารพื้นฐานลงในระบบ แต่ถ้าเปรียบเทียบค่า chitinase activity ระหว่างอาหารแข็งที่มีการเติมอาหารพื้นฐาน (18.04 mU/gIDS) กับอาหารแข็งไม่เติมอาหารพื้นฐาน (19.40 mU/gIDS) จะพบว่าอาหารแข็งไม่เติมอาหารพื้นฐานจะให้ค่า chitinase activity เพิ่มขึ้น 1.36 mU/gIDS Suresh and Chandrasekaran (1998) ศึกษาการผลิตไคตินเอสจากเปลือกกุ้งโดย เชื้อราในทะเล *Beauveria bassiana* BTMF S10 แบบ SSF พบว่าเชื้อสามารถผลิตไคตินเอสได้สูงสุด 248.0 U/gIDS ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยอัตราส่วนของเปลือกกุ้งต่อน้ำทะเลเท่ากับ 5 : 1, 1% NaCl,

2.5% KH_2PO_4 ขนาดของเปลือกกุ้ง 425-600 μm pH 9.5 บ่มที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นเวลา 5 วันจากการศึกษาพบว่า การเติม yeast extract ทำให้การผลิตไคตินเอสลดลง

สภาวะที่เหมาะสมต่อ crude enzyme ของไคตินเอสเชื้อรา *Aspergillus* SP6 เมื่อบ่มสับสเตรทกับเอนไซม์ใน water bath อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 40 นาที ที่ pH 7.0 ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 222.68 mU/ml ซึ่งการหาสภาวะที่ทำงานได้ดีของ crude enzyme ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสสูงขึ้นประมาณ 2.87 เท่า (เปรียบเทียบกับ chitinase activity ที่วัดได้จากอาหารแข็งไม่เติมอาหารพื้นฐาน) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี submerged fermentation ; SMF และวิธี SSF พบว่าการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี SSF ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงกว่าวิธี SMF George *et al.* (1997) ศึกษาการผลิต protease เปรียบเทียบระหว่างวิธี SMF และ SSF พบว่า protease ที่ผลิตด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* ด้วยวิธี SMF ในสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักวัดกิจกรรมของ protease ได้ 800,000 U/ 20 l of medium และเมื่อวัดกิจกรรมของ protease จากวิธี SSF พบว่าสูงถึง 250,000 U/g