

บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

จากการเก็บตัวอย่างดินตามแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำมาแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสพบว่ามีเชื้อราทั้งสิ้น 114 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร chitin agar เป็นเวลา 7 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) สามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อตามความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเหลว EPM ได้ดังนี้

กลุ่มเชื้อที่มี enzyme activity มากกว่า 10 mU/ml crude extract มี 4 ไอโซเลท

กลุ่มเชื้อที่มี enzyme activity มากกว่า 5-10 mU/ml crude extract มี 3 ไอโซเลท

กลุ่มเชื้อที่มี enzyme activity มากกว่า 1-5 mU/ml crude extract มี 83 ไอโซเลท

และ กลุ่มเชื้อที่มี enzyme activity น้อยกว่า 1 mU/ml crude extract มี 24 ไอโซเลท

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

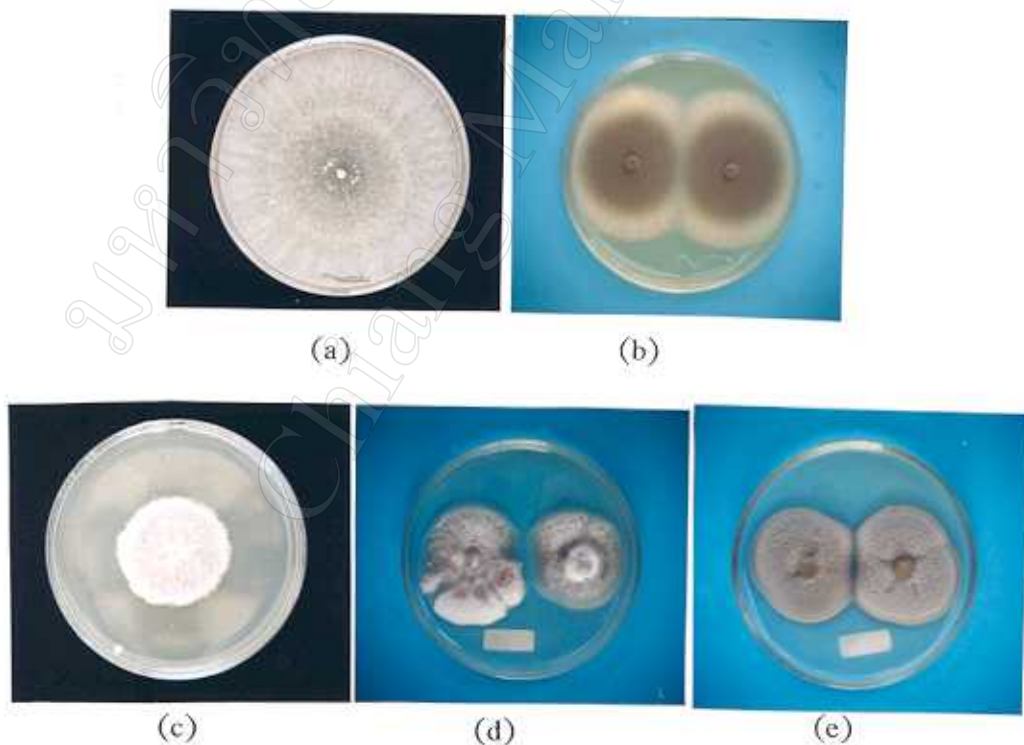
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 114 ไอโซเลทในอาหาร EPM ที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-11, S1-13, S1-15, S1-51 และ SC-91 เป็นเชื้อรา ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงที่สุด 5 อันดับแรก ลักษณะการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลทบนอาหารแข็ง MYG แสดงในภาพ 2 โดยเชื้อราไอโซเลท S1-11 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสูงที่สุดโดยมี enzyme activity เท่ากับ 11.56 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 110.6 mU/mg protein ดังแสดงในภาพ 3 ตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสจากแหล่งต่าง ๆ

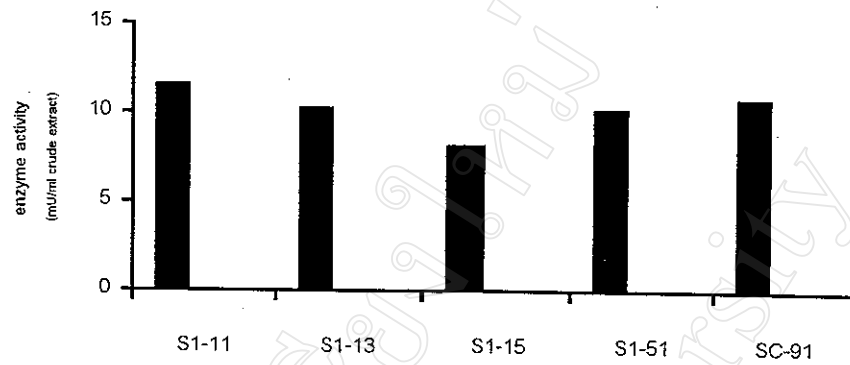
ไอโซเลท	enzyme activity mU/ml crude extract	specific activity mU/mg protein	แหล่งที่พบ
S1-11	11.6	110.6	ดินจากห้วยคอกม้า จ.เชียงใหม่
S1-13	10.2	115.9	ดินจากห้วยคอกม้า จ.เชียงใหม่
S1-15	8.1	114.3	ดินจากห้วยคอกม้า จ.เชียงใหม่
S1-51	10.1	113.0	ดินจากดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่

ตาราง 2 ตัวอย่างเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โคติเนสจากแหล่งต่างๆ(ต่อ)

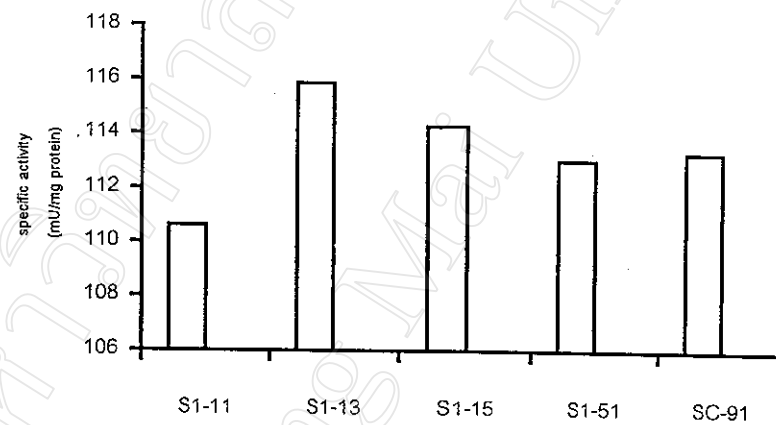
ไอโซเลต	enzyme activity mU/ml crude extract	specific activity mU/mg protein	แหล่งที่พบ
SC-91	10.8	113.3	ดินจากตอขสเทพ จ.เชียงใหม่
SC-21	5.5	95.7	ดินบริเวณที่มีเห็ดขึ้น หน้าภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
SC-52	5.0	98.1	ดินจากตอขสเทพ จ.เชียงใหม่
SX-53	3.7	80.4	ดินจากตอขสเทพ จ.เชียงใหม่
SC-13-1	3.2	86.0	ดินบริเวณอ่างแก้ว
C-5	2.3	71.8	เชื้อปนเปื้อนในอาหาร chitin agar



ภาพ 2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา 5 ไอโซเลตที่มีการผลิตเอนไซม์โคติเนสสูงที่สุดในอาหาร MYG ที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) ระยะเวลา 7 วัน (a) S1-11, (b) S1-13, (c) S1-15, (d) S1-51 และ (e) SC-91



ไอโซเลท
(a)



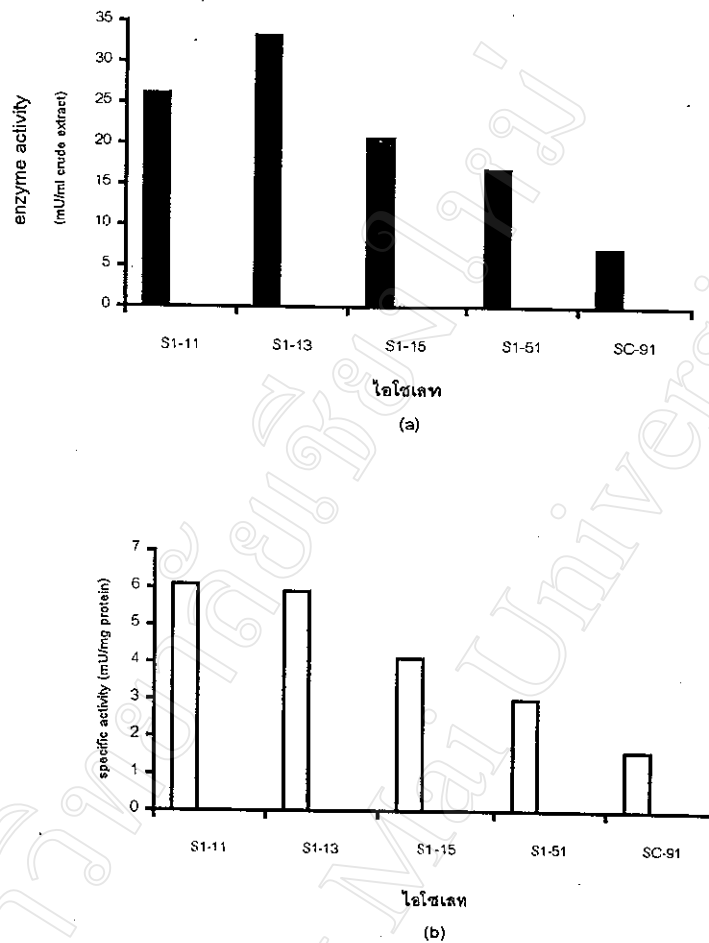
ไอโซเลท
(b)

ภาพ 3 การผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา 5 ไอโซเลทในอาหาร EPM (a) enzyme activity
(b) specific activity

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตด้วยวิธีการหมักในสภาพของแข็งดังแสดงในภาพ 4 พบว่าเชื้อราไอโซเลต S1-13 ผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดโดยมี enzyme activity เท่ากับ 33.2 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 5.9 mU/mg protein ดังภาพ 5 และ ตาราง ผนวก 3 ภาคผนวก ข จึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลต S1-13 ซึ่งแยกได้จากดินจากห้วยคอกม้า ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ มาทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสต่อไป



ภาพ 4 การเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก (อัตราส่วน 1:1 (w/w))

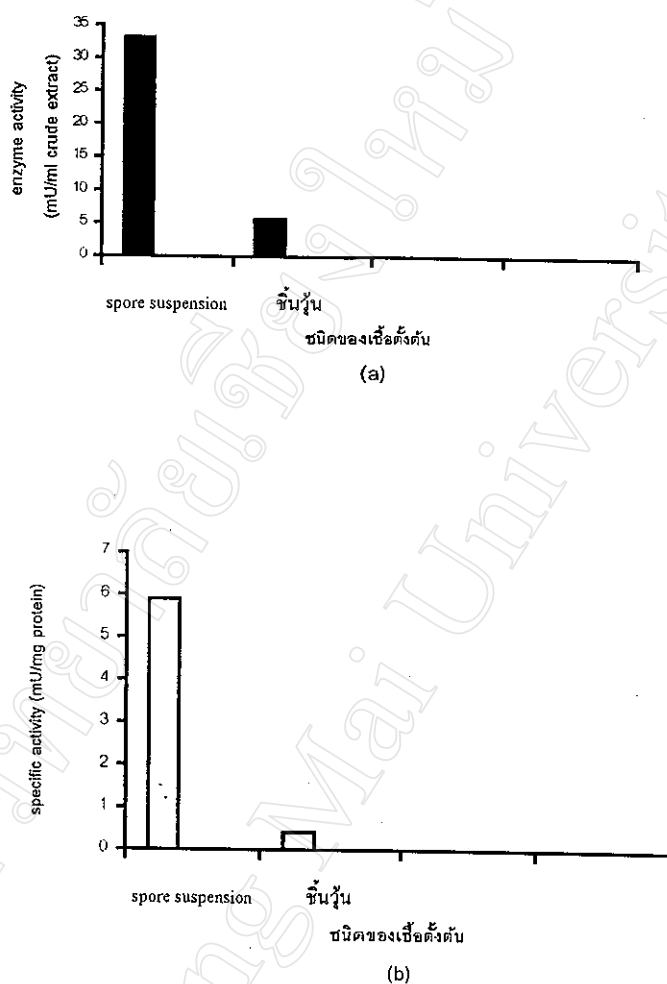


ภาพ 5 การผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อรา 5 ไอโซเลทโดยการหมักในสภาพของแข็ง (a) enzyme activity (b) specific activity

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

3.1 ชนิดของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไคติเนส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งในอาหารเปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก (5:1) ที่ใช้เชื้อตั้งต้นแบบขึ้นวุ้นและ spore suspension โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการใช้เชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension จะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสสูงกว่าแบบขึ้นวุ้น โดยมี enzyme activity เท่ากับ 33.2 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 5.9 mU/mg protein ดังภาพ 6 และตารางผนวก 4 ภาคผนวก ข

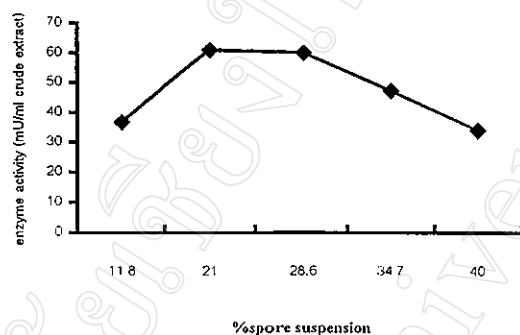


ภาพ 6 ผลของชนิดของเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

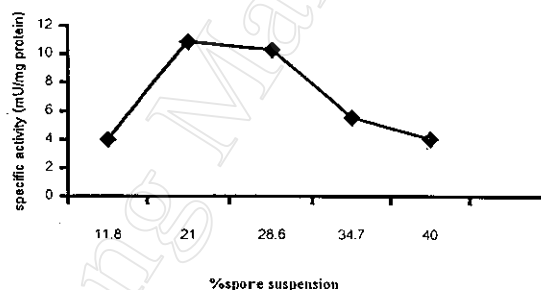
3.2 ปริมาณ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในอาหารเปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก (5:1) ในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension ที่มีปริมาณแตกต่างกัน คือ 0, 11.8, 26.0, 28.6, 34.7 และ 40% (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ml) ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 มีค่าการทำงานของเอนไซม์โคติเนสสูงที่สุดในการหมักที่มีปริมาณ spore suspension 21.0% (4 ml) pH หลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 มีค่า enzyme activity เท่ากับ 61.0 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ

10.86 mU/mg protein รองลงมาได้แก่ปริมาณ spore suspension 28.6% ซึ่งให้ค่า enzyme activity ใกล้เคียงกับปริมาณ spore suspension 21.0% โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 59.9 mU/ml crude extract แต่มีค่า specific activity ต่ำกว่าคือ 10.26 mU/mg ดังภาพ 7 และตารางผนวก 5 ภาคผนวก ข.



(a)



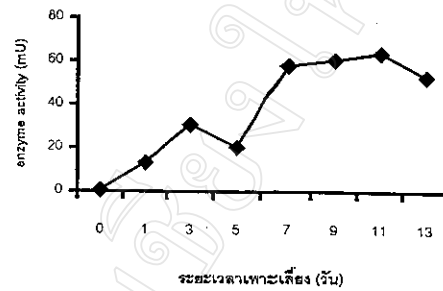
(b)

ภาพ 7 ปริมาณ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

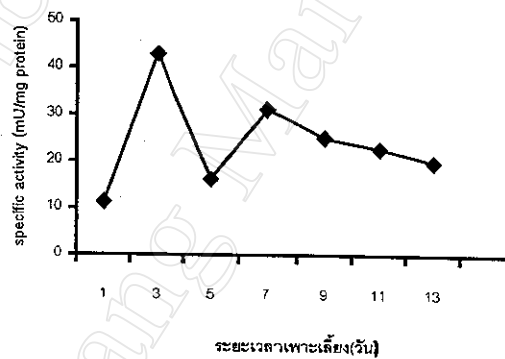
3.3 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก (5:1) ในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension 21.0% บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) มีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันคือ 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 มีค่าการทำงานของเอนไซม์โคติเนสสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน pH หลังการทดลองของอาหารเท่ากับ 4 โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 63.9 mU/ml crude

extract และ specific activity เท่ากับ 22.83 mU /mg protein ดังภาพ 8 และตารางผนวก 6 ภาคผนวก ช



(a)

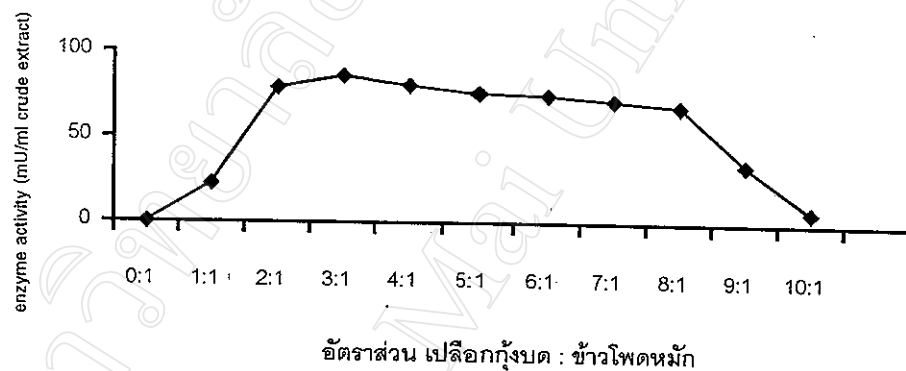


(b)

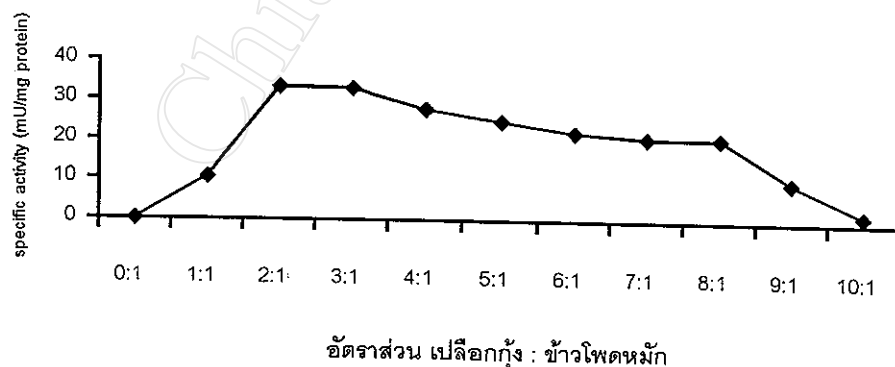
ภาพ 8 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส (a) enzyme activity (b) specific activity

3.4 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension 21.0% (4 ml) อัตราส่วนสับสเตรทระหว่างเปลือกกุ้งต่อข้าวโพดหมักแตกต่างกันคือ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อข้าวโพดหมักเท่ากับ 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 และ 10:1 (w/w) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 11 วัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มี อัตราส่วนของเปลือกกุ้งต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนักรวมสับสเตรทเท่ากับ 4 g มีค่า pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 enzyme activity เท่ากับ 85.4 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 33.0 mU/mg protein ดังภาพ 9 และ ตารางผนวก 7 ภาคผนวก ข.



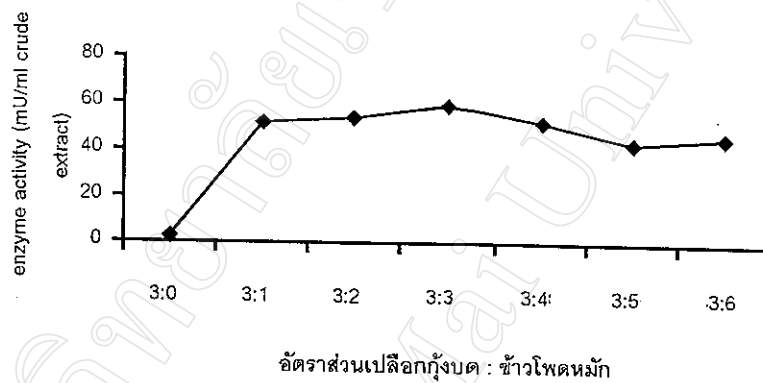
(a)



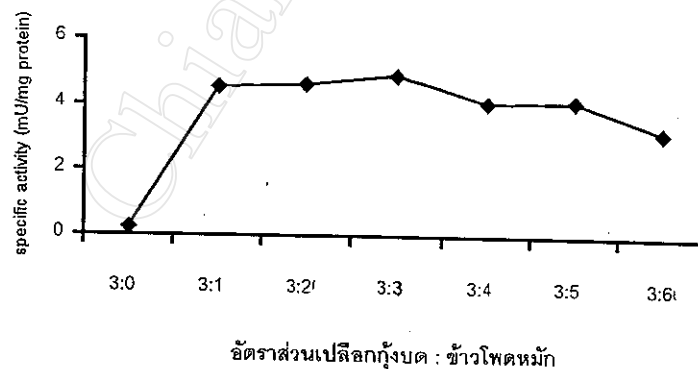
(b)

ภาพ 9 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยให้ข้าวโพดหมักคงที่ 1 g (a) enzyme activity (b) specific activity

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งโดยมีสับสเตรทเปลือกกุ้งบดคองที่ 3 g และมีข้าวโพดหมักที่แตกต่างกันตามสัดส่วนดังนี้คือ อัตราส่วนเปลือกกุ้งบดต่อ ข้าวโพดหมัก เท่ากับ 3:0, 3:1, 3:2, 3:3, 3:4, 3:5 และ 3:6 (w/w) โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 11 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 ผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มีอัตราส่วนของเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมักเท่ากับ 3:3 โดยมีน้ำหนักรวมสับสเตรทเท่ากับ 6 g pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงมีค่า 4 มีค่า enzyme activity เท่ากับ 59.3 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 4.9 mU/mg protein ดังภาพ 10 และตารางผนวก 8 ภาคผนวก ข.



(a)

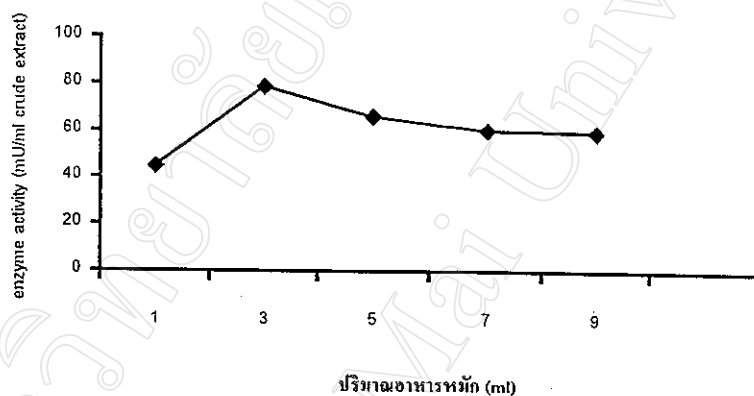


(b)

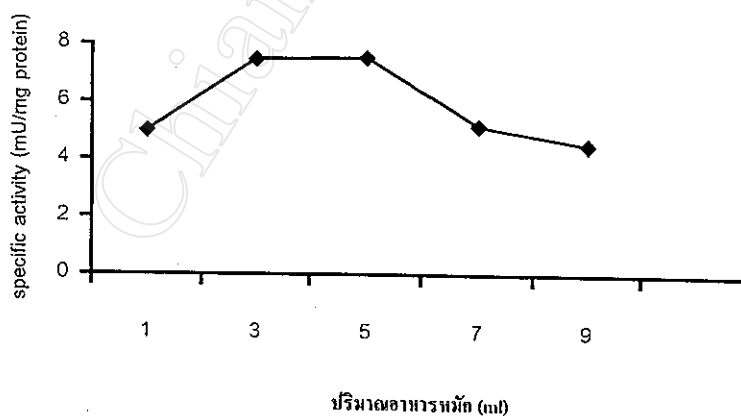
ภาพ 10 อัตราส่วนสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยใช้เปลือกกุ้งบดคองที่ 3 g (a) enzyme activity (b) specific activity

3.5 ปริมาณอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา ไอโซเลต S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension 21.0% (4 ml) อัตราส่วนสับสเตรทเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 6 g บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 11 วัน โดยมีปริมาณอาหารพื้นฐานแตกต่างกันคือ 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 ml พบว่าเชื้อราไอโซเลต S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดเมื่อปริมาณอาหารพื้นฐานเท่ากับ 3 ml pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 78.4 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 7.46 mU/mg protein ดังภาพ 11 และตารางผนวก 9 ภาคผนวก ข.



(a)

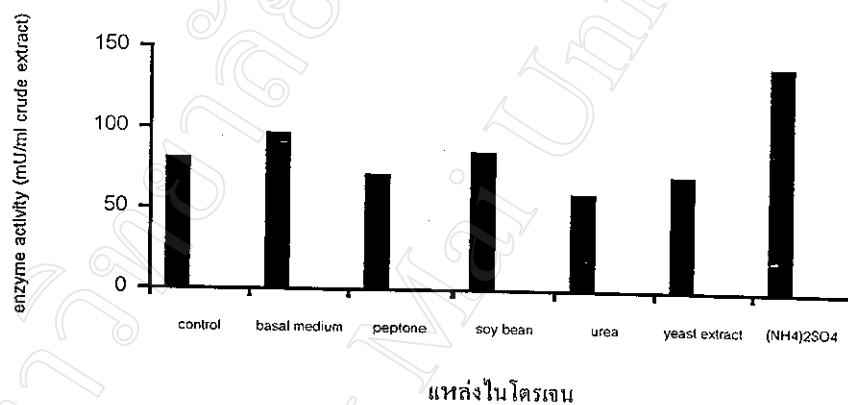


(b)

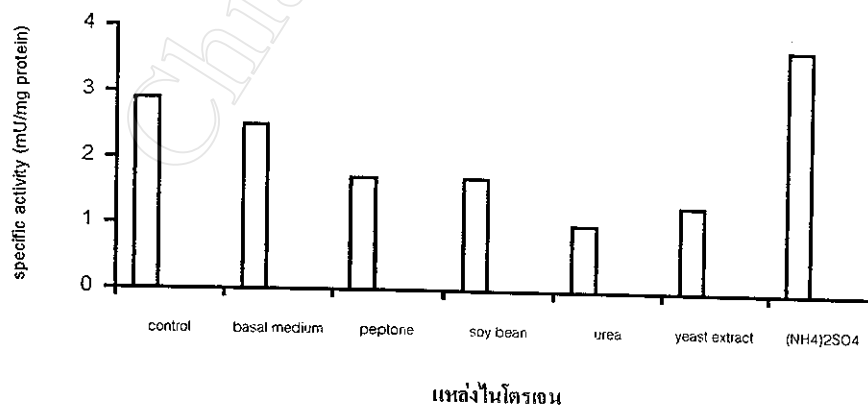
ภาพ 11 ปริมาณอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลต
S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

3.6 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension 30.8% (4 ml) อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 6 g เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 11 วัน ปริมาตรอาหารพื้นฐาน 3 ml ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด คือ 0.5% (w/v) peptone, soy bean, urea, yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ พบว่า เชื้อราไอโซเลท S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มี 0.5% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 139.1 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 3.7 mU/mg protein ดังภาพ 12 และตารางผนวก 10 ภาคผนวก ข.



(a)



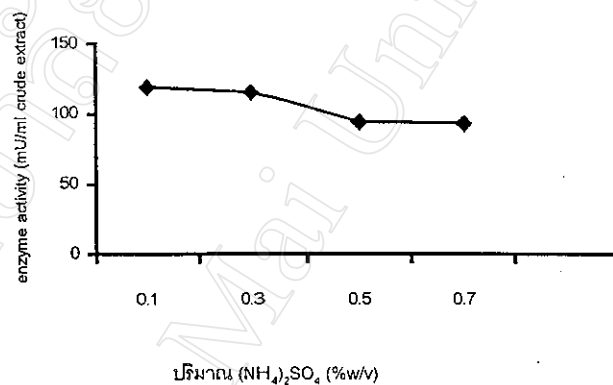
(b)

ภาพ 12 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

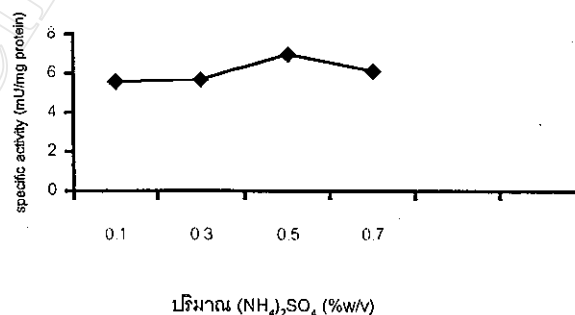
3.7 ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อรา

ไอโซเลต S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension 30.8% (4 ml) อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 6 g บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($26-28^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 11 วัน ในอาหารพื้นฐาน 3 ml ที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณต่าง ๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7% (w/v) พบว่าเชื้อราไอโซเลต S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุด เมื่อมีปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในอาหารพื้นฐานเท่ากับ 0.1% (w/v) pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 119.2 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 5.5 mU/mg protein ดังภาพ 13 และตารางผนวก 11 ภาคผนวก ข.



(a)

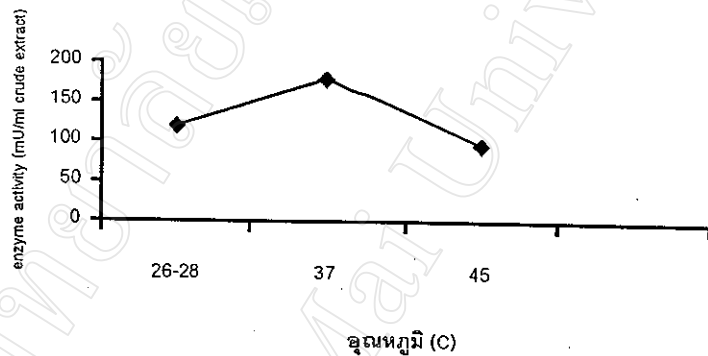


(b)

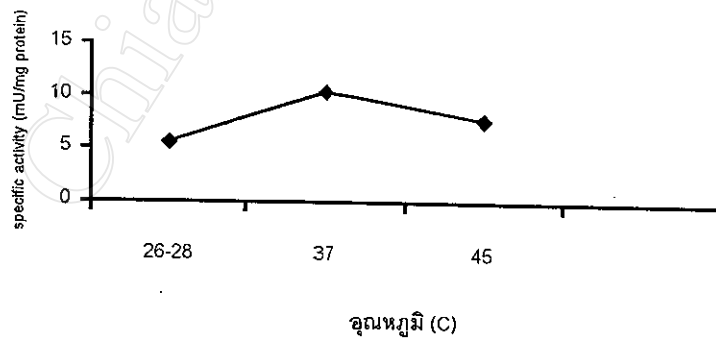
ภาพ 13 ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลต S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

3.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลต S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension 30.8% (4 ml) อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 6 g เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 11 วัน บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) 37 °C และ 45 °C พบว่า เชื้อราไอโซเลต S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 178.9 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 10.3 mU/mg protein ดังภาพ 14 และตารางผนวก 12 ภาคผนวก ข.



(a)



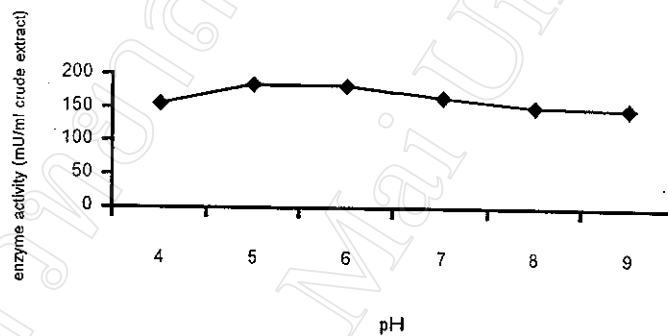
(b)

ภาพ 14 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลต S1-13

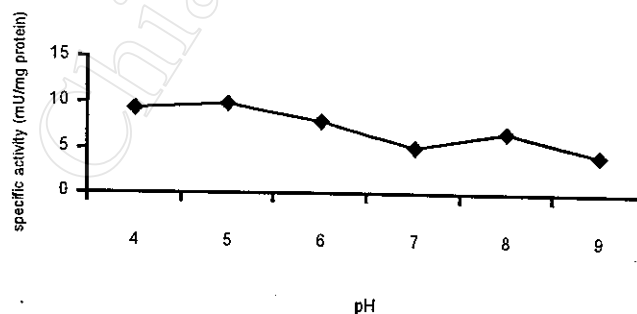
(a) enzyme activity (b) specific activity

3.9 pH เริ่มต้นของอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 โดยการหมักในสภาพของแข็งที่มีเชื้อตั้งต้นเป็นแบบ spore suspension ปริมาณ 4 ml อัตราส่วนสับสเตรท เปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 โดยมีปริมาณรวมเท่ากับ 6 g บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 11 วัน ในอาหารพื้นฐาน 3 ml ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกันคือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ pH ของอาหารหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4 โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 184.0 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 9.9 mU/mg protein ดังภาพ 15 และตารางผนวก 13 ภาคผนวก ข.



(a)



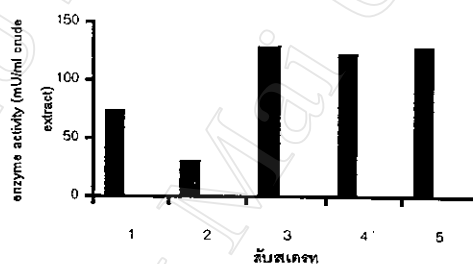
(b)

ภาพ 15 pH เริ่มต้นของอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13 (a) enzyme activity (b) specific activity

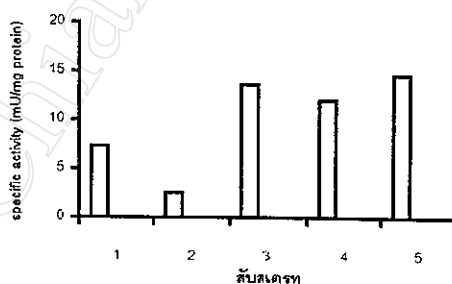
3.10 อิทธิพลของสับสเตรทที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท

S1-13

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในอาหารพื้นฐานที่มีสับสเตรทแตกต่างกัน คือ อาหารพื้นฐานที่มีเฉพาะเปลือกกุ้งบด 3 g เป็นสับสเตรท อาหารพื้นฐานที่มีเฉพาะเปลือกกุ้งบด 6 g เป็นสับสเตรท อาหารพื้นฐานที่มีเปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1 เป็นสับสเตรท อาหารพื้นฐานที่มีเปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดสด เท่ากับ 1:1 เป็นสับสเตรท และอาหารพื้นฐานที่มีเปลือกกุ้งบด ต่อข้าวโพดหมักนึ่งฆ่าเชื้อ เท่ากับ 1:1 เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 11 วัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้ใกล้เคียงกันในอาหารพื้นฐานที่มีเปลือกกุ้งบดผสมกับข้าวโพดหมัก ข้าวโพดสด และข้าวโพดหมักนึ่งฆ่าเชื้อ โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 128.2, 121.9 และ 127.6 mU/ml crude extract ตามลำดับ และมีค่า specific activity เท่ากับ 13.6, 12.0 และ 14.7 mU/mg protein ตามลำดับ ดังภาพ 16 และตารางผนวก 14 ภาคผนวก ข.



(a)



(b)

- 1 คือ เปลือกกุ้งบด 3 g
- 2 คือ เปลือกกุ้งบด 6 g
- 3 คือ เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมัก (1:1)
- 4 คือ เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดสด (1:1)
- 5 คือ เปลือกกุ้งบด ต่อ ข้าวโพดหมักนึ่งฆ่าเชื้อ (1:1)

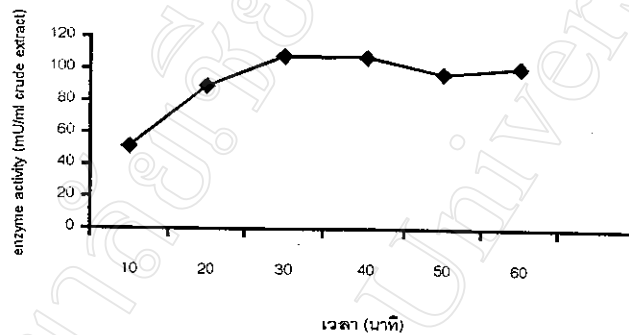
ภาพ 16 อิทธิพลของสับสเตรทที่มีต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราไอโซเลท S1-13

(a)enzyme activity (b) specific activity

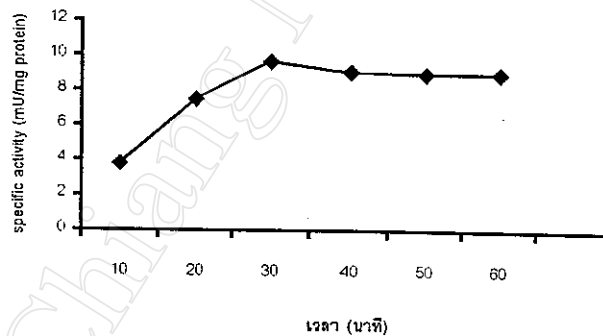
4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme

4.1 ผลของเวลาที่บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

จากตรวจวัด enzyme activity และ specific activity ของเอนไซม์โคติเนสที่ผลิตขึ้นจากเชื้อราไอโซเลท S1-13 ในระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่าที่ระยะเวลา 30 นาที เอนไซม์จะมีค่าการทำงานสูงที่สุดโดยมี enzyme activity เท่ากับ 108.3 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 9.6 mU/mg protein ดังภาพ 17 และ ตารางผนวก 15 ภาคผนวก ข.



(a)



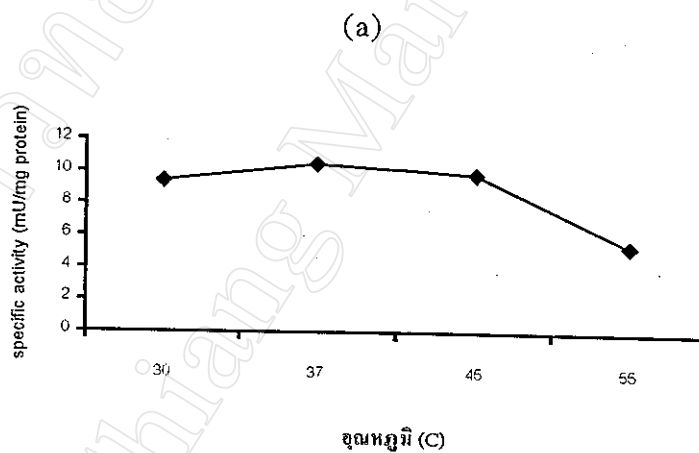
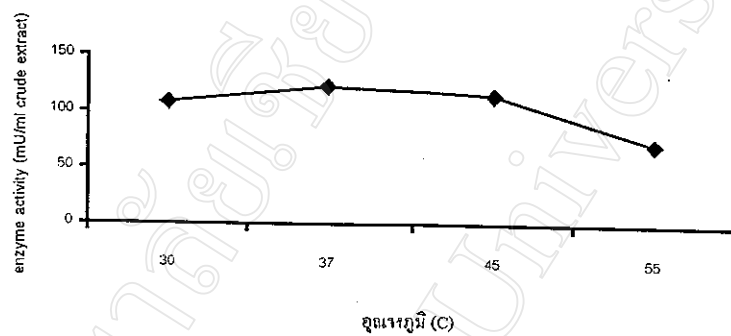
(b)

ภาพ 17 ผลของเวลาที่มีสมต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนส

(a) enzyme activity (b) specific activity

4.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

จากการตรวจวัด enzyme activity และ specific activity ของเอนไซม์โคติเนสที่ผลิตขึ้นจากเชื้อราไอโซเลท S1-13 ที่ระยะเวลาการบ่ม 30 นาที ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30, 37, 45 และ 55 °C พบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C เอนไซม์จะมีค่าการทำงานสูงที่สุดโดยมี enzyme activity เท่ากับ 122.5 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 10.5 mU/mg protein ดังภาพ 18 และตารางผนวก 16 ภาคผนวก ข.

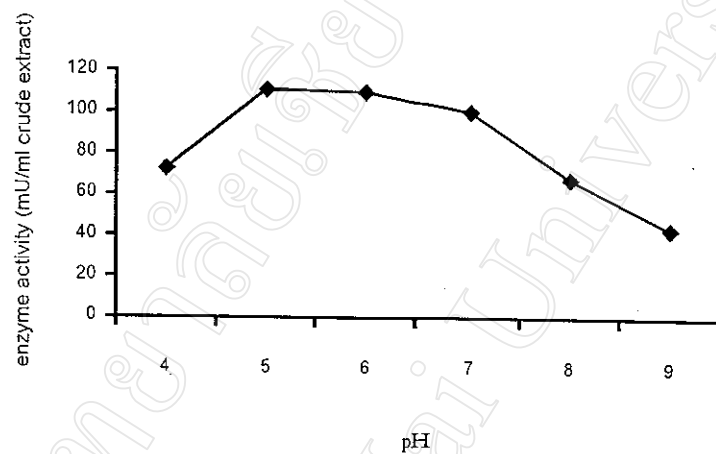


ภาพ 18 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนส

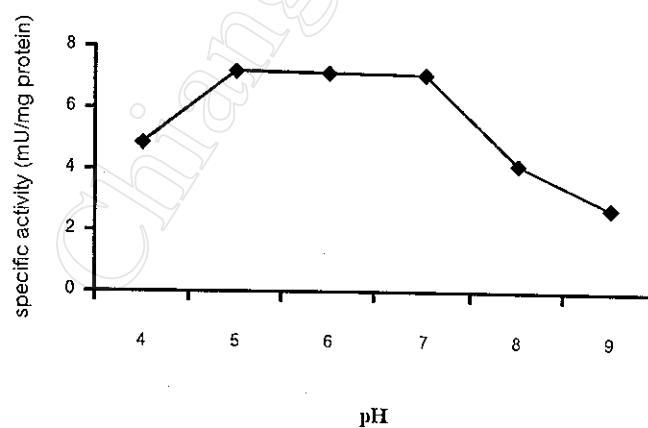
(a) enzyme activity (b) specific activity

4.3 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการตรวจวัด enzyme activity และ specific activity ของเอนไซม์โคติเนสที่ผลิตขึ้นจากเชื้อราไอโซเลท S1-13 ที่ระยะเวลาการบ่ม 30 นาที อุณหภูมิ 37 °C pH ต่างๆกันคือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่าที่ pH เท่ากับ 5 เอนไซม์จะมีการทำงานสูงที่สุดโดยมี enzyme activity เท่ากับ 110.9 mU/crude extract และ specific activity เท่ากับ 7.2 mU/mg protein ดังภาพ 19 และตารางผนวก 17 ภาคผนวก ข.



(a)



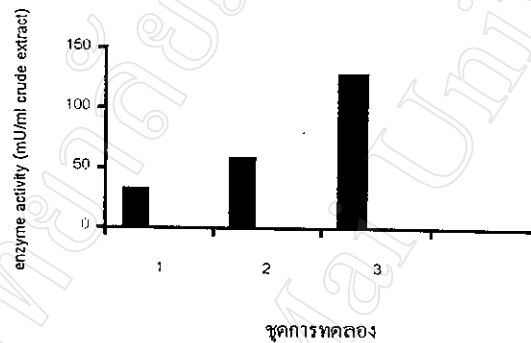
(b)

ภาพ 19 ผลของ pH ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนส

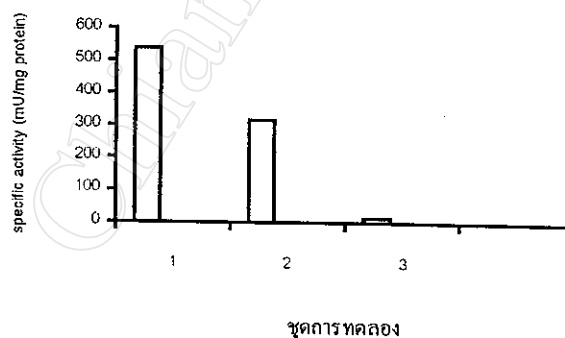
(a) enzyme activity (b) specific activity

5. การผลิตเอนไซม์ไคตินเอสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลต S1-13 ในชุดการทดลองต่างๆ คือ ในอาหารเหลว EPM ที่มี 0.5% colloidal chitin เป็นสับสเตรท ในอาหารเหลว EPM ที่มี 0.5% เปลือกกุ้งบดเป็นสับสเตรท และในอาหารพื้นฐานที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมักเป็นสับสเตรท (อัตราส่วนเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก เท่ากับ 1:1) เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการหมักในสภาพของแข็ง พบว่าเชื้อราไอโซเลต S1-13 ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเอสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงโดยวิธีการหมักในสภาพของแข็ง โดยมีค่า enzyme activity เท่ากับ 128.20 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 13.65 mU/mg protein ดังภาพ 20 และตารางผนวก 19 ภาคผนวก ข.



(a)



(b)

ชุดการทดลองที่ 1 : อาหารเหลว EPM+0.5% colloidal chitin

ชุดการทดลองที่ 2 : อาหารเหลว EPM+0.5% เปลือกกุ้งบด

ชุดการทดลองที่ 3 : การเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง

ภาพ 20 การผลิตเอนไซม์ไคตินเอสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง

(a) enzyme activity (b) specific activity

6. การบ่งชนิดของเชื้อราไอโซเลท S1-13

จากการนำเชื้อราไอโซเลท S1-13 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek's solution agar ที่มี 20% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าโคโลนีของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร เมื่อตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีลักษณะบางใสและเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร malt extract agar เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าโคโลนีของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-5 เซนติเมตร เส้นใยสีเขียวเข้ม สามารถเจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 - 55 °C และเจริญได้ดีที่ 37 °C เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่มีกำลังขยาย 1,000 เท่าและกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พบว่า vesicle มีลักษณะเป็นคนโท มี sterigma ขึ้นเดี่ยวขึ้นคลุม vesicle ประมาณ $\frac{3}{4}$ โคนิเดียมีลักษณะรีเกือบกลม สีเขียว conidial head เป็นแท่งแน่นสีเขียวเข้ม ไม่พบ cleistothecium (ภาพ 21) เมื่อเปรียบเทียบกับฐานที่พบกับหนังสือ The Genus *Aspergillus* (Raper and Fennell, 1965) พบว่าเป็นกลุ่ม *Aspergillus fumigatus* โดยมีลำดับทางอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Barnett and Hunter, 1987)

Superkingdom	<i>Eukaryonta</i>
Kingdom	<i>Myceteae</i>
Division	<i>Amastigomycotina</i>
Subdivision	<i>Deuteromycotina</i>
Class	<i>Deuteromycetes</i>
Subclass	<i>Hyphomycetidae</i>
Order	<i>Moniliales</i>
Family	<i>Moniliaceae</i>
Genus	<i>Aspergillus</i>
Species	<i>A. fumigatus</i> S1-13



(a)



(b)



(c)

ภาพ 21 *Aspergillus fumigatus* S1-13 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารอุณหภูมิต่างๆ (บนข้าวไปขาว;
 20, 26-28, 37 °C ล้างข้าวไปขาว; 45, 50-55 °C)
 (a) อายุ 7 วัน บนอาหาร MYG : (b) อายุ 7 วัน บนอาหาร Malt extract agar (ข้าว)
 อายุ 2 สัปดาห์ บนอาหาร Czapek's solution agar (ขาว): (c) เส้นใยและสปอร์
A. fumigatus S1-13 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า