

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกและคัดเลือกจากตัวอย่างดินและอาหารบางชนิดจำนวน 20 ตัวอย่างได้เชื้อราทั้งหมด 114 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนส ได้สูงที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก (5:1 w/w) โดยมี enzyme activity เท่ากับ 33.2 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 5.9 mU/mg protein จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท S1-13 บนอาหารแข็ง MYG เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเชื้อราไอโซเลท S1-13 มีคุณสมบัติเป็น thermotolerant เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-55 °C และเจริญได้ดีที่ 37 °C โคโลนีสีขาวเข้มเกือบเทาเมื่ออายุ 7 วัน จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Aspergillus fumigatus* group

ชนิดของเชื้อตั้งต้นเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้มีการผลิตสารที่ต้องการการเลือกใช้เชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตสูง เช่น การผลิต α -mannosidase ของเชื้อราไอโซเลท AD-3S โดยการหมักในสภาพของแข็งใช้เชื้อตั้งต้นในรูปของ spore suspension (Koomnok et al., 1996) การผลิต pectinase จากเชื้อ *Aspergillus niger* ก็ใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension (Solis-Pereyra et al., 1996) เช่นเดียวกับการผลิตเอนไซม์โคติเนส จาก *A. fumigatus* S1-13 พบว่าเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมได้แก่ การใช้ spore suspension โดยทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml การใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension เหมาะสำหรับการหมักในระบบขนาดเล็กเพราะมีความสะดวกมากกว่าและสามารถเตรียมเชื้อตั้งต้นได้ในรูปของอาหารวุ้นแข็งเชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ยังเหมาะสำหรับการหมักซึ่งใช้เวลานาน เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อระบบการหมักได้ดี รวมทั้งยังช่วยลดการสูญเสียความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ระหว่างการหมักได้อีกด้วย (Suresh and Chandrasekaran, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อตั้งต้นแบบชิ้นวุ้นไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบการหมักในสภาพของแข็ง เนื่องจากมีขนาดใหญ่ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสับสเตรทน้อย (Papagianni et al., 1999) นอกจากนี้ พบว่าการใช้ปริมาณ spore suspension 21.0 % กับ 28.6 % จะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์โคติเนสใกล้เคียงกัน (ภาพ 7) เลือกใช้ปริมาณ spore suspension 21.0 % ในการเพาะเลี้ยง *A. fumigatus* S1-13 เพื่อผลิตเอนไซม์โคติเนส เนื่องจากเป็นการลดต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการเตรียมเชื้อตั้งต้นและยังให้ค่า specific activity สูงกว่าอีกด้วย

จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของ *A. fumigatus* S1-13 พบว่าปริมาตรรวมสุดท้ายของสับสเตรทในแต่ละชุดการทดลองจะไม่เท่ากัน มีผลทำให้ปริมาณ spore suspension ที่คิดเป็นเปอร์เซ็นต์มีค่าเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งปริมาณความชื้นในแต่ละชุดการทดลองก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้นในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสจึง

ควรทำการทดลองในอัตราส่วนของเปลือกกุ้งบดต่อข้าวโพดหมัก ที่มีปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากัน ด้วย เพื่อควบคุมปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณ spore suspension, ปริมาณความชื้นให้เท่ากัน

Lactic acid bacteria มีความสามารถในการช่วยย่อยสลายเปลือกกุ้งให้เป็นโปรตีนและโคติน เพื่อให้จุลินทรีย์อื่นสามารถใช้โคตินได้ง่ายขึ้น (Hall and De-silva, 1992) จากการทดลองของคุณไพรินทร์ บุตรกระจำง นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยทำการแยก lactic acid bacteria จากข้าวโพดหมักของศูนย์วิจัยและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ จ. เชียงใหม่ พบว่ามี lactic acid bacteria 2 ไอโซเลท การเติมข้าวโพดหมักลงในระบบเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์โคติเนสช่วยให้ *A. fumigatus* S1-13 สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้เพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลองที่ 3.10 พบว่า enzyme activity ที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากอนุภาคของข้าวโพดหมักช่วยให้เกิดช่องว่างและมีการถ่ายเทอากาศภายในระบบมากกว่าจะเป็นผลจาก lactic acid bacteria ในข้าวโพดหมักเนื่องจากจะเห็นได้ว่า ในระบบหมักที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมักเป็นสับสเตรท มีค่า enzyme activity ใกล้เคียงกับระบบที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดสดและระบบที่มีเปลือกกุ้งบดและข้าวโพดหมักหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นสับสเตรท โดยมี enzyme activity เท่ากับ 128.20, 121.95 และ 127.60 mU/ml crude extract ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองระบบหลังเป็นระบบที่ไม่มี lactic acid bacteria อยู่ในสับสเตรท ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ enzyme activity จึงไม่น่าจะเป็นผลมาจาก lactic acid bacteria ในข้าวโพดหมัก

ชนิด และ ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของ *A. fumigatus* S1-13 ผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงที่สุด 110.9 mU/ml crude extract มีค่า specific activity เท่ากับ 7.2 mU/mg protein ซึ่งมากกว่ารายงานของนาริลักษณ์ (2542) ที่พบว่าในสภาวะที่เหมาะสม เชื้อรา *Basipetospora* sp. CK 44 ผลิตเอนไซม์โคติเนสได้ 34.5 mU/ml crude extract และมีค่า specific activity เท่ากับ 14.5×10^{-4} mU/mg protein เมื่อเพาะเลี้ยงโดยวิธีการหมักในสภาพของแข็ง

จากการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์โคติเนสพบว่า เอนไซม์มีค่า enzyme activity สูงที่สุดเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที (ภาพ 17) แต่พบว่าความชันของกราฟเริ่มลดลงที่เวลาดังกล่าว และในช่วงเวลา 0 ถึง 10 นาทีแรกของการบ่มเอนไซม์พบว่ากราฟมีความชันมากที่สุด จึงควรทำการทดลองในช่วงเวลาดังกล่าวโดยละเอียดอีกครั้ง เพื่อหาระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด

การศึกษาการผลิตเอนไซม์โคติเนสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในสภาพของแข็ง ควรทำการทดลองโดยใช้อาหารพื้นฐานที่มีองค์ประกอบเหมือนกัน จึงจะสามารถเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โคติเนสของ *A. fumigatus* S1-13 ได้อย่างแท้จริง

ภายหลังการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โคติเนสของ *A. fumigatus* S1-13 พบว่า *A. fumigatus* S1-13 ผลิตเอนไซม์โคติเนสได้สูงขึ้นโดยมี enzyme activity เท่ากับ 110.9 mU/ml crude extract และ specific activity เท่ากับ 7.2 mU/mg protein เมื่อทำการคำนวณโดยเปรียบเทียบต่อ 1 g initial dry substrate (gIDS^{-1}) พบว่า enzyme activity มีค่าเท่ากับ 74

mU/gIDS ขณะที่ Suresh and Chandrasekaran (1999) ทำการเพาะเลี้ยง *Beauveria bassiana* โดยการหมักในสภาพของแข็งมีค่า enzyme activity เท่ากับ 246.6 U/gIDS

A. fumigatus เป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษ เช่น gliotoxin ได้ (Yamada *et al.*, 2000) หรือสารพิษที่ทำให้เกิดโรค Aspergillosis (Chumpitazi *et al.*, 2000) จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณภาพอาหาร อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การนำข้าวโพดหมักมาผสมกับเปลือกถั่วบดเพื่อใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้ซึ่งอาจเป็นผลมาจากทำให้ระบบการถ่ายเทอากาศของการหมักดีขึ้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้หากใช้จุลินทรีย์ชนิดที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ลับสเตอร์ที่เหลือจากการหมักซึ่งจะมีคุณค่าเพิ่มมากขึ้นจากโปรตีนและ amino sugar ในเปลือกถั่วบด อาจนำไปใช้ผสมเป็นอาหารสัตว์ได้ ซึ่งเป็นการช่วยลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลและลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์ด้วย