

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

จากการแยกเชื้อราจากตัวอย่างต่างๆ พบว่ามีเชื้อราที่สามารถเจริญได้บน chitin overlay agar ได้จำนวน 106 ไอโซเลท Jeuniaux (1996) รายงานว่าจุลินทรีย์ทั้ง Eucaryote และ Procaryote ส่วนใหญ่ที่เจริญบนอาหารที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลว Enzyme production medium (EPM) ที่มี 0.5 % ไคตินเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ จากการแยกเชื้อราจากตัวอย่างต่างๆ พบว่าแยกได้จากตัวอย่างที่เป็นเปลือกกุ้งที่นำไปฝังดินไว้ในบริเวณต่างๆ ได้มากที่สุด อาจเป็นเพราะไคตินในเปลือกกุ้ง มีส่วนช่วยกระตุ้นให้เชื้อราสามารถผลิตไคตินเนสได้ โดยเฉพาะเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ ซึ่งให้ค่าการทำงานสูงสุดในอาหารแข็ง เปลือกกุ้งก็เป็นเชื้อราที่แยกมาจากเปลือกกุ้งที่นำไปฝังดินเช่นกัน การนำเปลือกกุ้งไปฝังดินในงานวิจัยครั้งนี้จะห่อด้วยผ้าขาวบางซึ่งมีคุณสมบัติเป็น polysaccharide ซึ่งเชื้อราบางชนิดสามารถย่อยสลายและนำไปใช้เป็นอาหารได้ ดังนั้นเมื่อนำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เชื้อที่ได้อาจมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย polysaccharide ได้มากกว่าการย่อยสลายไคตินเนส ดังนั้นในงานวิจัยครั้งต่อไปอาจเปลี่ยนมาใช้ถุงน่องแทน เนื่องจากถุงน่องมีคุณสมบัติเป็นไนลอน ซึ่งเชื้อราไม่สามารถย่อยสลายได้ เชื้อราที่แยกได้จึงเป็น เชื้อราที่ย่อยสลายเปลือกกุ้งได้เพียงอย่างเดียว

ลักษณะของเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ มีเส้นใยสีเหลืองฟู เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีความกว้าง 2.45 μm มีผนังกันตามขวาง มีการสร้างโคนิเดีย ซึ่งมีรูปร่างกลม ฐานตัด สี่ค่อนข้างโตเป็นเซลล์เดี่ยวเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ (basipetal chain) เมื่อนำมาจัดลำดับทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Basipetospora* sp. และจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ เช่น PDA ,MYG, Chitin agar และ Chitin overlay agar พบว่าเชื้อราเจริญบนอาหารแข็ง MYG ได้ดีกว่า chitin agar อาจเป็นเพราะ MYG agar มี malt extract และ yeast extract ซึ่งถูกใช้ได้ง่ายกว่าไคติน ทำให้เชื้อราเจริญได้ดีกว่า

เมื่อศึกษาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไคตินเนสได้สูงสุดในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง พบว่าเชื้อราเริ่มมี enzyme activity ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ 16 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่และลดลงในที่สุด Suresh and Chandrasekaran (1998) รายงานว่าเมื่อเชื้อรามีการเจริญเต็มอาหาร จะทำหน้าที่เป็นปัจจัยจำกัดในการสร้าง biomass เมื่อ biomass ถูกสร้างน้อยลง ก็ทำให้มีการใช้อาหารน้อยลงและผลิตเอนไซม์น้อยลงด้วย

เชื้อตั้งต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ผลิตสารที่ต้องการ การเลือกใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตสูง จากการทดลองเชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension จากอาหารวุ้นเหียงเหมาะสมที่สุด อาจเป็นเพราะเชื้อตั้งต้นในรูปสปอร์มีข้อได้เปรียบตรงสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเชื้อตั้งต้นในรูป vegetative (เลี้ยงใน EPM) การใช้เชื้อตั้งต้นจากอาหารแข็งเปลือกกุ้งให้ค่า enzyme activity ต่ำอาจเนื่องจากเราใช้ปริมาณเชื้อน้อยเกินไป

แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสร้างไคตินัส Russell *et al.* (1994) รายงานว่า การ sterile chitin โดยการ autoclave หรือการต้มจะทำให้เกิด glucosamine และ NAG ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชักนำให้มีการผลิตไคตินัสได้ Vasseur *et al.* (1990) รายงานว่า product ที่ได้จากการย่อยไคตินจะทำหน้าที่เป็นทั้ง inducer และ repressor ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของ product ในอาหาร จากการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ colloidal chitin 1.0 % (w/v) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cirano *et al.* (1991) และ Vyas and Deshpande (1989) ซึ่งพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไคตินัสคือ ไคติน 1.0 %

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการผลิตไคตินัสเนื่องจากจะช่วยให้มีการเจริญเติบโตขึ้น (Vyas and Deshpande, 1989) Suresh and Chandrasekaran (1998) รายงานว่า yeast extract จะลดการสร้างไคตินเนื่องจากเชื้อราสามารถใช้ yeast extract ได้ง่ายกว่าไคติน ในการทดลองครั้งนี้พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินัสคือ NaNO_3 2.0% ซึ่งสอดคล้องกับ Russell *et al.* (1994)

ความชื้นมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในอาหารแข็ง ใน SSF ความชื้นจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากมีการระเหยของน้ำ ในอาหารที่มีความชื้นสูงจะเหมาะแก่การสร้างสปอร์ ความชื้นต่ำจะเหมาะแก่การงอกของสปอร์ หรือการเจริญของ mycelium a_w ของอาหารมีผลต่อการส่งสารผ่านเข้าออกเซลล์รวมถึงเอนไซม์ ดังนั้น a_w ในอาหาร จึงมีผลต่อการผลิตและส่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ด้วย จากการทดลองพบว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินัสเท่ากับ 67% คือใช้เปลือกกุ้ง 5 กรัม ผสมกับ BSM 10 มล. ซึ่งต่างจากรายงานของ Suresh and Chandrasekaran (1998) พบว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือใช้เปลือกกุ้ง: น้ำทะเล 5:1 (W/V) ซึ่งทั้งนี้อาจขึ้นกับชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิและ pH ในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินัสกับเชื้อราชนิดอื่น พบว่ามีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ดังตาราง 14

ตาราง 14 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคติเนสของจุลินทรีย์บางชนิดกับ

Basipetospora sp CK₄₄

species	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Reference
<i>Stachybotrys elegans</i>	5.0	-	Russell <i>et al.</i> ,1994
<i>Myrothecium verucaria</i>	5.0	-	Vyas and Deshpande ,1989
<i>Trichoderma hazianum</i>	5.6	28	Kapat <i>et al.</i> ,1997
<i>Beaurevia basiana</i>	9.5	27	Suresh and Chandrasekaran, 1998
<i>Basipetospora</i> sp CK ₄₄	5.0	Room temperature	นารีลักษณ์ 2540

คุณสมบัติของโคติเนสจาก *Basipetospora* sp CK₄₄ มีการทำงานดีที่สุดที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที ซึ่งพบว่าสอดคล้องกับรายงานของพลับพลึง (2540) คือสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จาก *Streptomyces* sp.MK6-16 เท่ากับ pH 5.0 , 40 °C เช่นกัน

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 32.5 mU/ml specific activity เท่ากับ 1.83×10^{-3} mU/mg ซึ่งเมื่อเทียบกับตอนคัดเลือกรั้งแรก (81.5 mU/ml) พบว่าค่า enzyme activity ลดลงมาก อาจเนื่องจากการเก็บรักษาเชื้อราที่ไม่เหมาะสม ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บรักษาเชื้อราไว้ในอาหารวุ้นเลี้ยง PDA ที่ 4°C ซึ่งอาจทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราเปลี่ยนแปลงไปได้ การเก็บรักษาเชื้อราควรเก็บในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วหรือในกลีเซอรอล เพราะพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อจะเปลี่ยนแปลงได้น้อยกว่า สาเหตุของการลดลงของ enzyme activity อีกอย่างหนึ่ง อาจเนื่องมาจากเปลือกกึ่งที่ใช้ในการเตรียมอาหารในขั้นตอนของการคัดเลือกรั้งกับขั้นตอนของการหาสภาวะที่เหมาะสม เป็นเปลือกกึ่งที่ได้มาจากแหล่งที่ต่างกัน และการเตรียมเปลือกกึ่ง เช่น การอบแห้ง การบดที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ได้ค่า enzyme activity ต่างกัน เนื่องจากเปลือกกึ่งอาจมีปริมาณโปรตีน ความชื้น และขนาดของ particle ที่ต่างกัน ซึ่ง Pandey (1991) รายงานว่า ขนาดของ particle ของสับสเตรทมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยพบว่าการที่สับสเตรทมีขนาดที่เหมาะสมจะทำให้มีการแพร่ของออกซิเจนผ่านเข้าออกได้สะดวก รวมถึงมีพื้นที่ผิวสำหรับการเจริญของเชื้อราได้อย่างดี

ค่า specific activity ในงานวิจัยครั้งนี้ค่อนข้างต่ำมากอาจเนื่องจาก crude enzyme ที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูง เนื่องจากโปรตีนในเปลือกกึ่ง เปลือกกึ่งที่ได้มาจากแหล่งที่ต่างกัน มีวิธีการแกะ

เนื้อกึ่งออกจากเปลือกต่างกันเพราะความชำนาญของแต่ละคนไม่เหมือนกัน ซึ่งจากสาเหตุเหล่านี้ทำให้เราไม่สามารถควบคุมปริมาณโปรตีนของเปลือกกึ่งที่นำมาเตรียมเป็นอาหารให้เท่ากันได้ ดังนั้นค่า specific activity ในงานวิจัยครั้งนี้จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ในแต่ละการทดลอง

เมื่อตกตะกอนน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของ *Basipetospora* sp CK₄₄ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการตกตะกอนในครั้งแรกที่ 0-40% saturation เป็นการแยกตะกอนของโปรตีนชนิดอื่นออกไป (สารละลายตะกอนมี enzyme activity เท่ากับ 0%) และนำ supernatant มาตกตะกอนอีกครั้งที่ 40-60 %saturation ซึ่งเป็นการตกตะกอนโปรตีนที่เป็นเอนไซม์โคติเนส (สารละลายตะกอนมี enzyme activity 100%) ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 214.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ ในงานวิจัยครั้งต่อไป น่าจะมีการนำเอนไซม์ที่ได้มาทำ dialysed เพื่อแยก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ออกจากสารละลายเอนไซม์ เนื่องจาก $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์อาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์