

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตโคติเนสได้สูงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างต่างๆ ได้เชื้อราทั้งหมด 106 ไอโซเลท นำเชื้อราทั้ง 106 ไอโซเลทมาทดสอบการผลิตโคติเนสในอาหารเหลวพบว่า 20 ไอโซเลทที่ให้ activity สูงสุดตามลำดับได้แก่ CK₅₀, CK₄₄, CK₁₇, CK₁₃, CT₄₂, CT₃₇, CT₁₂, CR₄₁, CK₄₅, CK₉, CK₃₃, CK₃, CT₄₃, CK₂₅, CK₃₉, CT₂₈, CK₃₀, CT₃ และ CT₃₄ เมื่อนำทั้ง 20 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการผลิตโคติเนสในอาหารแข็งเปลือกกุ้งร่วมกับเชื้อราที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าไอโซเลท CK₄₄ ให้ค่า enzyme activity สูงสุดเท่ากับ 81.5 mU/ml

การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราไอโซเลท CK₄₄

เมื่อเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท CK₄₄ บนอาหารแข็งชนิดต่างๆ พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหาร MYG agar อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 30°C และ pH 8 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อราโดยดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อมีผนังกันตามขวาง มีการสร้างโคนิเดียบนอาหาร หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วัน โคนิเดียมีรูปร่างกลม ฐานตัด สีค่อนข้างใส เป็นเซลล์เดี่ยวเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ (basipetal chain) เมื่อนำมาจัดลำดับทางอนุกรมวิธานตามหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Basipetospora* sp

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคติเนสของ *Basipetospora* sp CK₄₄

พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ประกอบด้วยเปลือกกุ้ง 5 กรัม และอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน 10 มล. (ความชื้นเริ่มต้น 67%) โดยอาหารพื้นฐานนี้มีแหล่งไนโตรเจนคือ NaNO₃ 2% w/v แหล่งคาร์บอนคือ colloidal chitin 1% w/v pH 5.0 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 16 วัน จากนั้นสกัดด้วย 0.2M phosphate buffer pH 7.0 นาน 1 ชั่วโมง เชื้อตั้งต้นที่ใช้คือ เชื้อราที่เจริญใน PDA slant อายุ 7 วัน เตรียมเป็น spore suspension ใช้ 1 มล. ของ spore suspension ต่ออาหารแข็งเปลือกกุ้ง 1 ขวดในสภาวะที่เหมาะสม *Basipetospora* sp CK₄₄ ผลิตโคติเนสได้ 26.3 mU/ml มีค่า specific activity 22.61x10⁻⁴ mU/mg

คุณสมบัติของไคตินเนสที่ผลิตโดย *Basipetospora* sp CK₄₄

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 40°C เอนไซม์สามารถย่อย colloidal chitin, ball-milled chitin และ swollen chitin ได้ โดยสามารถย่อย colloidal chitin ได้ดีที่สุด

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

การตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0-40% saturation แล้วนำ supernatant ที่ได้มาตกตะกอนอีกครั้งที่ 40-60% saturation พบว่าทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 214.73 เท่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์