บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* WU-2223L โดยการกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังรวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำภายใต้ภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสารเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดได้สูงสุดเป็น 11.33 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง (กลูโคอะมิเลส) และเอนไซม์โปรติเอสด้วย เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 16) ซึ่งจากงานวิจัยของ Moyer (1953) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสแล้วสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ด้วยนั้น ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสลดลง เพราะเอนไซม์โปรติเอสจะไปย่อยเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Usami และ Taketome, 1983) ซึ่งจากการทดลอง เติมเพ็บสแตตินซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเชื้อ WU-2223L สามารถผลิตกรดและเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยการมุ่งเน้นคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ แต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งสูงในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

ในงานวิจัยนี้ ทำการกลายพันธุ์โดยการใช้สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สลับกัน 2 ชนิดคือรังสี UV สลับกับการใช้ NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ โดยเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงออกโดยการเลี้ยงสปอร์ในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วกรองสปอร์ที่สามารถงอกในอาหารดังกล่าวอย่างรวดเร็วทิ้งไป โดยประเมินว่าสปอร์ที่งอกได้นั้นคือสปอร์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ จากนั้นนำสายพันธุ์กลายที่สุ่มเก็บมา คัดเลือกบนจานอาหารแข็ง SLST และ SLBG เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดได้สูง ตามลำดับ

เมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 11 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาศึกษาสมบัติเบื้องต้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L พบว่า สายพันธุ์กลายทั้งหมดสามารถผลิตกรดมะนาวจาก

แป้งมันสำปะหลังได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ประมาณ 2.7-4.8 เท่า โดยสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดได้สูงสุดคือสายพันธุ์ MUNU-22 สามารถผลิตกรดได้ 54.57 กรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นผลิตได้เพียง 11.33 กรัมต่อลิตร นอกจากความสามารถในการผลิตกรดแล้วยังพบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นในขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น (ตารางที่ 19) จากการตรวจพิสูจน์กรดมะนาวโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) เพื่อเปรียบเทียบชนิดของสารที่ถูกแยกออกมาได้ (ปรากฏเป็นแท่งกราฟ, peak) และปริมาณสารที่ถูกแยก ซึ่งคิดจากพื้นที่ใต้กราฟพบว่าพีคของกรดอินทรีย์ในน้ำหมักที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย ปรากฏแท่งกราฟที่เด่นชัด ณ เวลา 4.2 นาที โดยกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะปรากฏแท่งกราฟที่เวลา (retention time) 4.2 นาที เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าทั้งสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดที่เป็นกรดมะนาวจริง

จากการติดตามการเจริญ การผลิตกรด ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส การผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 และสายพันธุ์ตั้งต้น ในกาวะดังได้กล่าวมาแล้ว พบว่าทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้นจะค่อยๆเจริญ จนกระทั่งวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ จากนั้นการเจริญจะค่อนข้างคงที่ ส่วนความสามารถในการผลิตกรดมะนาว จะพบว่าในช่วง 1-3 วันแรก ตรวจพบปริมาณกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างต่ำและพบเพิ่มขึ้น จนกระทั่งสูงสุดในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณกรดจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gaden (1955) ที่รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวโดย *A. niger* เป็นแบบ type II fermentation คือ อัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดมะนาวมีค่าสูงสุดแยกออกจากกันเป็น 2 ช่วง โดยในระหว่างการเจริญจะไม่มีการผลิตกรดมะนาวหรือผลิตออกมาในปริมาณน้อย แต่หลังจากเชื้อเจริญเต็มที่แล้วจะผลิตกรดมะนาวออกมาในปริมาณมาก

ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่า สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้นจะผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยสายพันธุ์กลายจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงสุด 10.52 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ตั้งต้นจะมีแอคติวิตีสูงสุด 4.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวจะค่อยๆลดลง หลังจากวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะมิเลสต้องชักนำการสร้างด้วยสารตั้งต้น (inducible enzyme) ดังนั้น เมื่อมีแป้งเป็นตัวชักนำในช่วงแรกจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณมาก ทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ตั้งต้น แต่เมื่อแป้งถูกใช้หมดไปจะส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์

ออกมาต่ำลง นอกจากนี้อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ อาจเนื่องมาจากเชื้อมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งจะค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นและสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ

จากการติดตามค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีค่าค่อยๆลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ทั้งในสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งต้น และเมื่อติดตามปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สายพันธุ์ MUNU-22 มีการใช้แป้งอย่างรวดเร็วจนหมดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วนในสายพันธุ์ดั้งต้นนั้น ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงในอัตราที่ต่ำกว่า เนื่องจากสายพันธุ์กลาย MUNU-22 จะผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นมาก จึงทำให้สายพันธุ์นี้ย่อยแป้งได้ดีกว่า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งต้น เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าสายพันธุ์ดั้งต้นจะเจริญได้รวดเร็วกว่าและมีลักษณะโคโลนีแตกต่างจากสายพันธุ์กลาย เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสองภายใต้ภาวะสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน สายพันธุ์กลายจะสร้างเพลเลทขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์กลายมีขนาดใหญ่ มีการแตกแขนง และมีการสร้างปุ่มมากกว่าเส้นใยของสายพันธุ์ดั้งต้น ลักษณะดังกล่าวที่พบในสายพันธุ์กลาย MUNU-22 เป็นลักษณะที่ส่งเสริมการผลิตกรดมะนาว สอดคล้องกับรายงานของ Legisa และคณะ (1981) Ujcova และคณะ (1980) และ Rugsaseel และคณะ (1995)

ผลจากงานวิจัยนี้ได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ คือ สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L ด้วยวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV และสาร NTG ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ คือ สามารถผลิตกรดมะนาวและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง ในขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ต่ำ ภายใต้ภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาว โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ต้องผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นี้ จะลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน และเป็นการประหยัดเอนไซม์ที่จะต้องนำมาใช้เพื่อย่อยแป้ง ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้บางส่วน จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวต่อไปในอนาคตได้