บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงจากน้ำปลาได้เชื้อทั้งหมด 13 ไอโซเลท ทำการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์เคซิเนสและเจลลาทินเนส บนอาหารวุ้น ได้เชื้อ 5 ไอโซเลท ที่ผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด นำทั้ง 5 ไอโซเลท มาศึกษาการเจริญ และหาโปรติเอสในรูปของเคซิเนสแอคติวิตี โดยเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงหมายเลข 8 มีการเจริญและผลิตโปรติเอสในรูปของเคซิเนสแอคติวิตีได้ดีที่สุด จึงเลือกมาทำการทดลองหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิดและแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 100 รอบต่อนาที พบว่าในมีเดียม 73 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดนี้มีการเจริญที่วัดที่ระยะ mid log phase โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้ค่า 0.39 ภายใน 2 วัน และผลิตโปรติเอสในรูปของเคซิเนสแอคติวิตีได้ดีที่สุด คือได้ค่า specific activity 3.64 U/mg protein ภายใน 7 วันหลังการหมัก จึงใช้สภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นเป็นคอนโทรล

2. การแปรแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ทำการแปรแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนพร้อมกัน ทั้งนี้เพราะเจลลาทินเป็นสารที่ให้ทั้งคาร์บอนและไนโตรเจน

เริ่มจากการแปรความเข้มข้นของเจลลาทิน โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจนอื่น ผลการทดลองพบว่า ทั้งการเจริญและแอคติวิตีต่ำกว่าคอนโทรล แสดงว่าต้องมีผงสกัดยีสต์หรือแหล่งไนโตรเจนอื่นเพิ่มเติมมากกว่าเจลลาทินอย่างเดียว ในกรณีที่มีเจลลาทินอย่างเดียวเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลลาทินจาก 0.25 ถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดีขึ้น แต่แอคติวิตีของโปรติเอสใกล้เคียงกัน ยกเว้นโปรติเอสแอคติวิตีมีค่าต่ำมากที่ความเข้มข้นของเจลลาทินเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกเจลลาทินความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทำการทดลองเพิ่มแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองแปรแหล่งไนโตรเจน ซึ่งได้แก่ กรดแคสอะมิโน แอมโมเนียมคลอไรด์ และผงสกัดจากยีสต์ พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มเจริญได้ดีในกรดแคสอะมิโน และผงสกัดจากยีสต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เมื่อการเจริญถึงระยะ mid log phase ได้ 0.48 และ 0.39 ตามลำดับภายใน 2 วัน และโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุด 4.37 และ 3.64 U/mg protein ตามลำดับภายใน 7 วัน เช่นเดียวกัน ส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ไม่เหมาะแก่การเจริญแต่ทำให้แอคติวิตีใกล้เคียงกับ

เมื่อใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์กรดแคสอะมิโน คือ 4.02 U/mg protein ภายใน 7 วัน จึงทำการทดลองแปรความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด ในขณะเดียวกันก็พยายามลดต้นทุนการผลิต โดยทำการทดลองใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ผสมกับกรดแคสอะมิโน หรือผงสกัดจากยีสต์ เพื่อลดปริมาณการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์ซึ่งมีราคาสูง ผลการทดลองได้ปรับสูตรอาหารจากมีเดียม 73 เป็นสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบดังนี้ เจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารนี้ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 เจริญได้ดีกว่าคอลโทรล คือ วัดการดูดกลืนแสงเมื่อเจริญถึงระยะ mid log phase ได้ 0.42 ภายใน 3 วัน และวัดแอคติวิตีได้สูงสุด 3.94 U/mg protein ภายใน 5 วัน ซึ่งสูงกว่าคอนโทรล

3. จากการทดลองแปรความเข้มข้นของเกลือแร่ต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปแตสเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสูตรแล้วพบว่าความเข้มข้นของเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ทำให้การเจริญและโปรติเอสในรูปเคชิเนสแอคติวิตีของแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 สูงกว่าคอนโทรล ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.0 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยการวัดเจริญที่ mid log phase ได้ 0.44 ภายใน 3 วัน และแอคติวิตี 4.50 U/mg protein ภายใน 5 วัน

4. จากการแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ปรับสูตรอาหารและอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า pH เริ่มต้น 7.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตี โดยวัดการเจริญที่ระยะ mid log phase ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับคอนโทรล คือ 0.50 ภายใน 3 วันและได้แอคติวิตีแอคติวิตีสูงสุด 3.81U/mg protein ภายใน 7 วัน ดังนั้นสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อาจใช้แทนมีเดียม 73 คือ สูตรอาหารที่ประกอบด้วยเจลลาทิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดแคสอะมิโน 0.05 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5. จากการทดลองแปรความเป็นกรดด่างใน assay medium พบว่าเอนไซม์โปรติเอสในรูปเคชิเนส ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 นี้ เป็นอัลคาไลน์โปรติเอส ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง pH 8.0-9.0 และไม่ทำงานในสภาวะที่มีความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 7.0 ลงไป

6. ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนพบว่า แบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 มีรูปร่างเป็นแท่ง ผนังเซลล์หยักแหลมและพบออร์กาแนล ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นทึบอิเล็คตรอน สานกันเป็นตาข่ายหรือเป็นแถบ จากการศึกษาอนุกรมวิธานพบว่าแบคทีเรียชอบเค็มนี้ต้องการโซเดียมคลอไรด์อย่างต่ำ 15 เปอร์เซ็นต์ในการเจริญ ไม่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญในการเจริญ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 7.0 และสามารถย่อยเจลลาทินได้ จึงจัดแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 นี้อยู่ในกลุ่ม Halobacterium

ข้อเสนอแนะ

1. การย่นระยะเวลาการหมักน้ำปลาในขั้นตอนของการลดระยะเวลาการย่อยสลายโปรตีน ควรใส่แบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอส ซึ่งคัดเลือกไว้ลงในถังหมักในช่วงเวลาที่พบว่ามีการเพิ่มจำนวนตามธรรมชาติ นั่นคือ ในช่วง 32 ถึง 62 วันหลังการหมัก (สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์, 2531) เนื่องจากสภาวะภายในถังหมักเอื้ออำนวยให้มีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่มนี้ตามธรรมชาติอยู่แล้ว

2. การทดสอบหาโปรติเอสแอคติวิตีในการทดลองนี้ใช้เคซีอีนเป็นซับสเตรท ซึ่งเป็นซับสเตรทที่นิยมใช้ในการหาโปรติเอสแอคติวิตีโดยทั่วไป แต่เคซีอีนเป็นโปรตีนที่มีมากในน้ำนม จึงอาจมีโครงสร้างทางเคมีต่างจาก collagen ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในเนื้อปลา การวิเคราะห์หาโปรติเอสแอคติวิตีในการทดลองเกี่ยวกับการย่อยสลายเนื้อปลา ควรใช้ซับสเตรทเป็นโปรตีนที่เตรียมได้ง่ายกว่า collagen จากหางหนู (Gallop and Seifter, 1963) และเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) คล้ายกับโปรตีนในเนื้อปลา

3. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม ต้องคำนึงถึงวิธีการเก็บรักษาที่ไม่ทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรียเปลี่ยนไป เนื่องจากต้องใช้ในการผลิตเป็นเวลานาน และผลิตภัณฑ์ต้องมีคุณภาพคงที่ การเก็บเชื้อโดยการถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารวุ้นเอียงเป็นระยะ ๆ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ดังนั้นในการเก็บรักษาแบคทีเรียชอบเค็มหมายเลข 8 ควรใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อที่เหมาะสม เช่น การทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilization) เป็นต้น