



การคัดแยกจุลินทรีย์และผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเพื่อใช้ในงานอาหารสัตว์

Isolation of microorganisms and production of invertase enzymes for forage.

อริสรา มณีกลัด¹, ศุภคม คล้ายโตนด¹, บาจริย์ ฉัตรทอง², ชัยณรงค์ วงศ์สรศรี³ และชรรค์ชัย ต้นเมฆ^{1*}

¹มหาวิทยาลัยพะเยา ²มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ³ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เชียงราย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์และผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเพื่อใช้ในงานอาหารสัตว์ โดยเก็บตัวอย่างผิวกากคั่วแยกหาเชื้อ *Aspergillus section Nigri* บนอาหาร AFPA ได้ 24 ไอโซเลท และทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเบื้องต้นบนอาหาร SS medium ได้เชื้อที่เจริญได้ดี 5 ไอโซเลท จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ 1) แหล่งไนโตรเจน พบว่า NH₄Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด 2) pH ที่เหมาะสมคือ pH 7

บทนำ

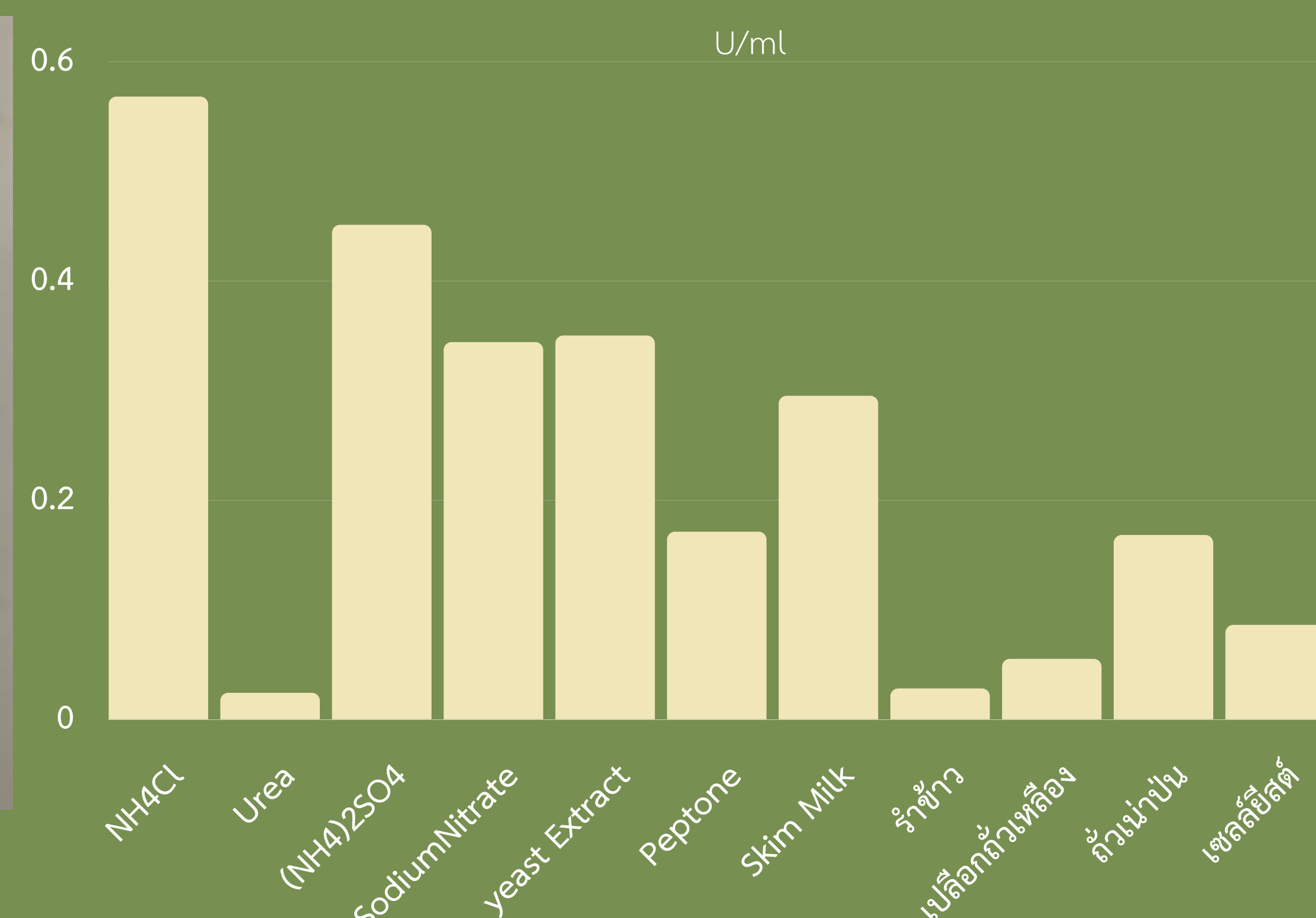
การผลิตน้ำผึ้งตามข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรน้ำผึ้งจะต้องมีน้ำตาลซูโครสไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนักการให้น้ำตาลซูโครส(น้ำตาลทราย)แก่ผึ้งในช่วงที่อาหารขาดแคลนปริมาณมากจะส่งผลให้มีซูโครสตกค้างในน้ำผึ้งสูงเกินมาตรฐานเกษตรกรจึงทำการใช้ความร้อนหรือกรดเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างน้ำตาลให้ผึ้งใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น (กลูโคสและฟรุคโตส) ทำให้เกิดสารไฮดรอกซีเมทิลฟิวรัล(Hydroxymethyl furfural; HMF) ที่จะเป็นอันตรายแก่ผึ้ง (Jachimowicz, 1975) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำงานได้ในอุณหภูมิต่ำเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำเชื่อม ที่ผึ้งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น

วิธีการทดลอง

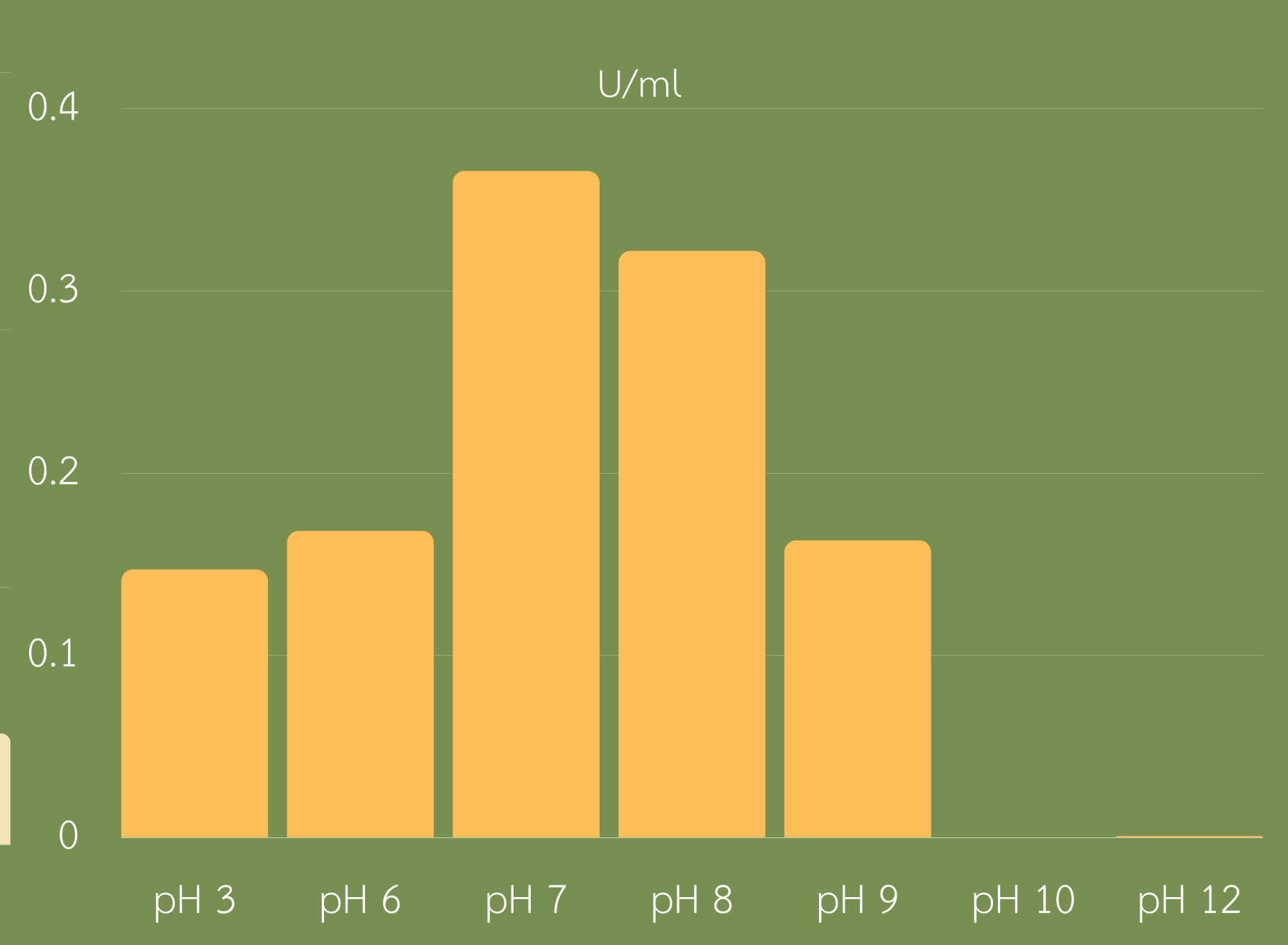
คัดแยกเชื้อ *Aspergillus section Nigri* จากตัวอย่างผิวกากคั่วบนอาหาร AFPA และทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเบื้องต้นบนอาหาร Semi-synthetic medium (SS medium) (Danmek et al. 2014) สูตรคิดแปลงที่มี 1% Sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อที่เจริญได้ดีนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็งตามวิธีการของ (Danmek et al. 2014; Klich, 2002) และทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสในอาหารเหลวสูตร Invertase production medium (IP medium) และตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีของ Miller. (1959) ก่อนจะนำเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ผลิตได้ดีที่สุดไปทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ 2 ปัจจัย คือ แหล่งไนโตรเจน ดังนี้ NH₄Cl, Urea, (NH₂)₄SO₄, NaNO₃, yeast extract, peptone, skim milk, รำข้าว, เปลือกถั่วเหลืองบด, ถั่วเน่าบดละเอียด และเซลล์ยีสต์ ตามลำดับ และ ความเป็นกรด-ด่าง โดยเริ่มตั้งแต่ pH 3, 6, 7, 8, 9, 10 และ 12 ตามลำดับ

ผลการทดลอง

เชื้อราที่คัดแยกได้ได้นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อรา *Aspergillus section nigri* ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลท และเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เบื้องต้น พบว่ามีเชื้อรา *Aspergillus section nigri* ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีที่สุด นำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวสูตร IP medium พบว่าเชื้อราส่วนมากมีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ดี โดยเชื้อราไอโซเลทที่ 3 (ภาพที่ 1) มีการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงที่สุด 0.87 U/ml เมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ 2 ปัจจัย พบว่า แหล่งไนโตรเจน NH₄Cl เหมาะสมที่สุดในหาการผลิตเอนไซม์ (กราฟที่1) และ ความเป็นกรด-ด่าง ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดคือ pH 7 (กราฟที่ 2) จากผลจะเห็นว่าเมื่อ pH ในอาหารเริ่มเป็นกรดหรือด่างมากขึ้นการผลิตเอนไซม์จะลดน้อยลง ตามลำดับ สอดคล้องกับ Uma และคณะ.(2010) ที่ผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ดีที่ pH 6.0 และ Oyedeki และคณะ.(2017) ที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* IBK1 ได้ดีที่ pH 5.0



กราฟที่ 1 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์



กราฟที่ 2 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์

สรุปผลการทดลอง

ผลการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสจากเชื้อรา *Aspergillus section nigri* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับสภาพน้ำตาลทรายเพื่อผลิตน้ำเชื่อมสำหรับเลี้ยงผึ้งโดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเบื้องต้น คือ pH 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่ทำให้เกิดสารประกอบ HMF ที่เป็นอันตรายต่อผึ้ง

เอกสารอ้างอิง

- Danmek, K., Intawicha, P., Thana, S., Sorachakula, C., Meijer, M. & Samson, R. A. (2014). Characterization of cellulase producing from *Aspergillus melleus* by solid state fermentation using maize crop residues. African journal of microbiology research, 8(24), 2397-2404.
- Jachimowicz T, El Sherbiny G (1975) Zur Problematik der Verwendung von Invertzucker für die Bienenfütterung. Apidologie 6(2):121-143.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht. The Netherlands. p.116.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.
- Oyedeki, O., Bakare, M. K., Adewale, I. O., Olutiola, P. O., & Omoboye, O. O. (2017). Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 9, 218-223.
- Uma, C. ; Gomathi, D. ; Muthulakshmi. C. and Gopalakrishnan, V.K., (2010). Production, Purification and Characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* using Fruit Peel Waste as Substrate. Advances in Biological Research 4 (1): 31-36.