บทที่ 4

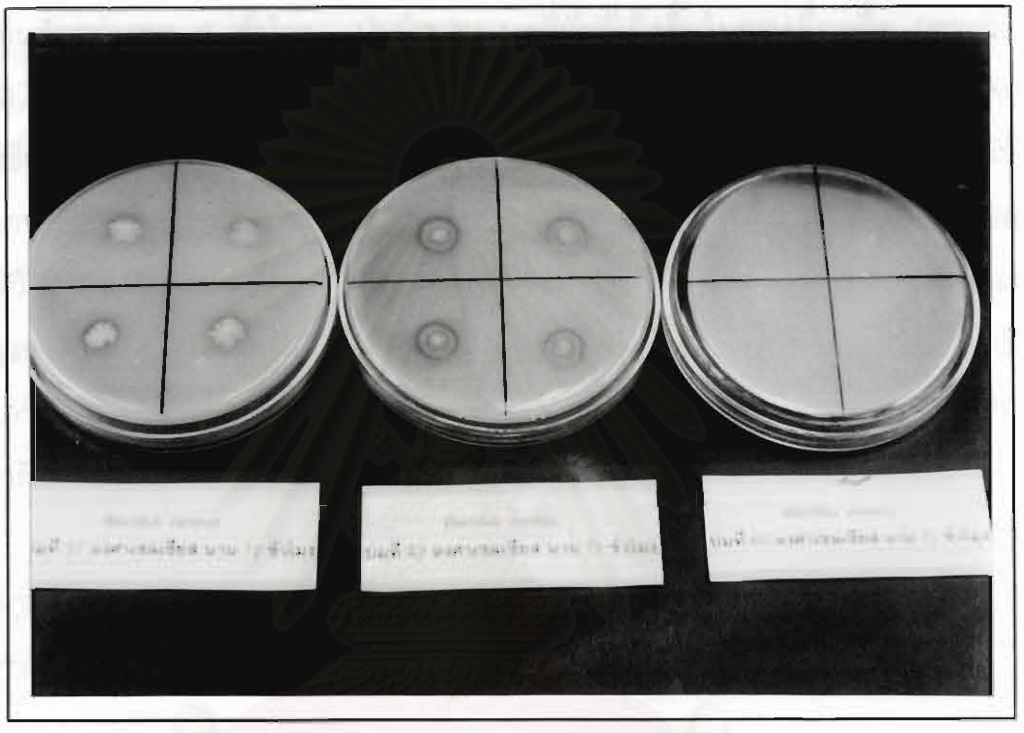
ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญและการผลิตไคทิเนสจาก *Bacillus* sp.

นำเชื้อไปจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งสูตร chitin medium (ข้อ 3.1.1.2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 42 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นแข็งสูตร chitin medium ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เท่านั้น วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 10-11 มิลลิเมตร แต่ลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ คือ เชื้อที่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โคโลนีมีลักษณะนูน เรียบ เป็นรอยหยักแผ่ออกจากศูนย์กลาง ส่วนเชื้อที่บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส โคโลนีมีลักษณะนูน เรียบ เป็นวงกลม นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีอย่างชัดเจนที่เวลา 24 ชั่วโมง ทั้ง 2 อุณหภูมิ และมีขนาดที่เท่า ๆ กัน ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. สามารถขับไคทิเนสออกนอกเซลล์แล้วไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทินให้เป็น chitooligosaccharides สายสั้นๆ ทำให้ความขุ่นลดลง

4.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

จำแนกชนิดของแบคทีเรียในระบบเอพีไอ โดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research : TISTR Culture Collection) ผลที่ได้สรุปว่า *Bacillus* sp.ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น *Bacillus cereus* (ภาคผนวกที่ 1)



รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญและการผลิตไคทิเนสของ *Bacillus* sp. ในอาหารวุ้นแข็งที่มี คอลลอยดัลไคทินอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่อุณหภูมิ 37 42 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส

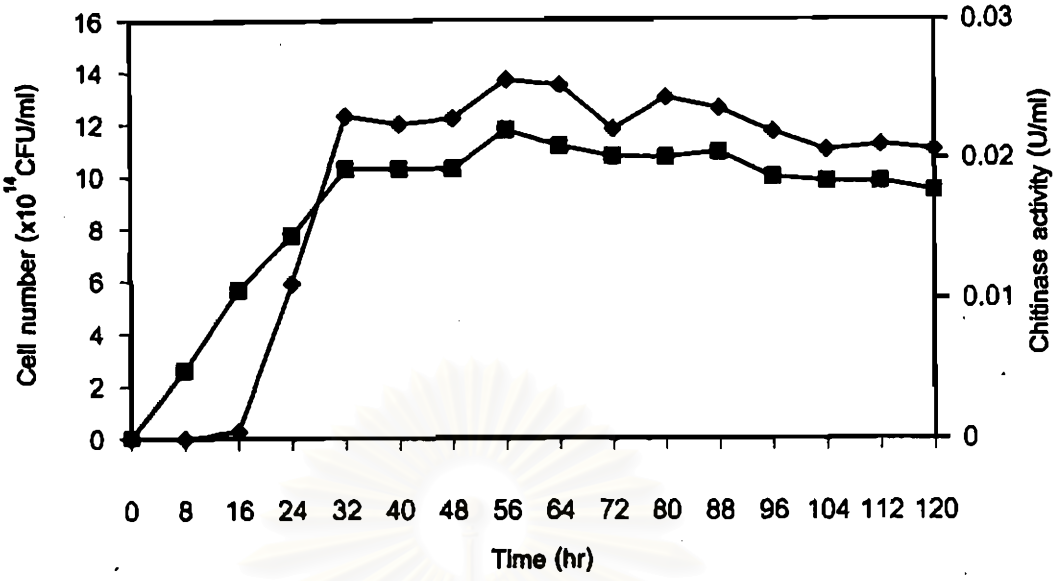
จากการศึกษาลักษณะการเจริญและการผลิตไคทิเนสของ *Bacillus cereus* เพื่อที่จะหาภาวะที่แบคทีเรียจะมีแอคติวิตีของไคทิเนสสูงสุด โดยเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* ใน chitin medium (ข้อ 3.1.1.2) pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อ (ตามวิธีข้อ 3.1.6) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเก็บส่วนใสไปหาแอคติวิตีของไคทิเนสตามวิธีข้อ 3.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 8ก. พบว่า *Bacillus cereus* สามารถเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อเวลา 32 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับช่วงที่เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด (0.019 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และพบแอคติวิตีของไคทิเนสก่อนสังเกตเห็นการเจริญของเซลล์และมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเวลา 32 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด (0.245 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในช่วงการเจริญที่ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 8ข.)

ในการศึกษาต่อๆ ไป จึงเลี้ยง *Bacillus cereus* ในภาวะของ chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ไคทิเนสแอคติวิตีสูง และมีปริมาณเอนไซม์มากเพียงพอต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์

4.4 สมบัติของเอนไซม์อย่างหยาบที่แยกได้จาก *Bacillus cereus*

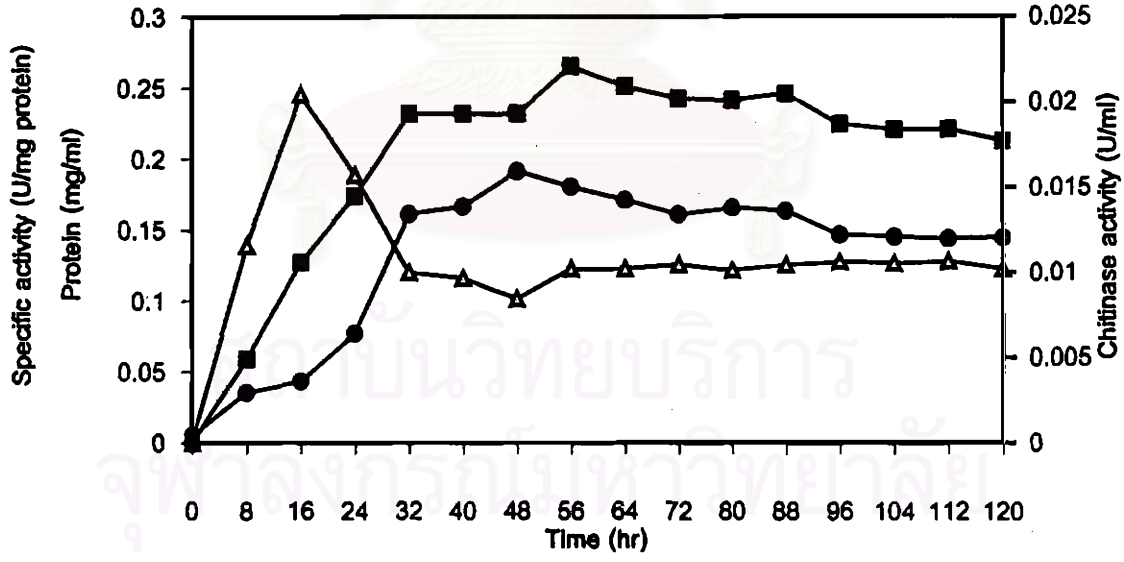
4.4.1 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

เลี้ยงเซลล์ใน chitin medium ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเอาเซลล์ออกไป นำสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของไคทิเนสตามข้อ 3.2 โดยเปลี่ยนภาวะการวัดแอคติวิตีจาก pH 5 เป็น pH 3-8 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.6) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 พบว่าเอนไซม์อย่างหยาบทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกรด-กลาง และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ส่วนที่ pH 8.0 แอคติวิตีลดลงเหลือเพียง 42.76 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีสูงสุด



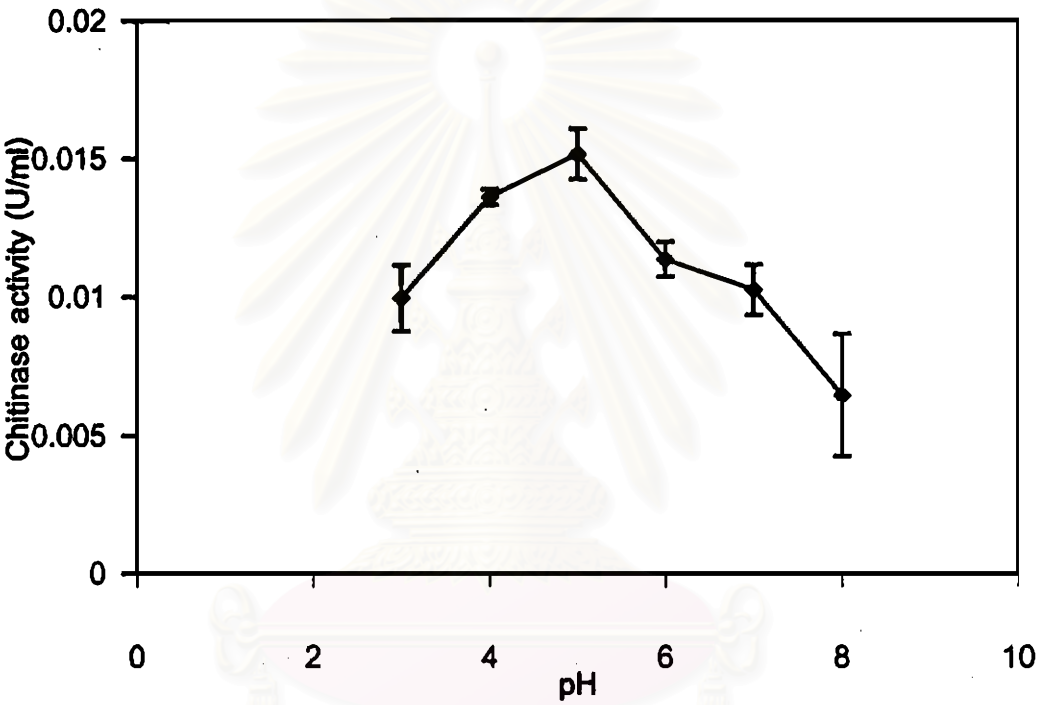
รูปที่ 8ก. รูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

◆ จำนวนโคโลนี ■ แอคติวิตีของไคทิเนส



รูปที่ 8ข. รูปแบบของโปรตีน แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของไคทิเนสผลิตจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

● โปรตีน ■ แอคติวิตีของไคทิเนส ▲ แอคติวิตีจำเพาะ



รูปที่ 9 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ในภาคผนวกที่ 5 ข้อ1.1-1.6 (วิธีทำข้อ 3.4) (n=2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบที่เตรียมได้ไปวัดแอคติวิตีของไคทิเนสตามข้อ 3.2 แต่เปลี่ยนภาวะการทดลองจากอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิ 25-70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่าเอนไซม์อย่างหยาบทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส

4.5 การเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน

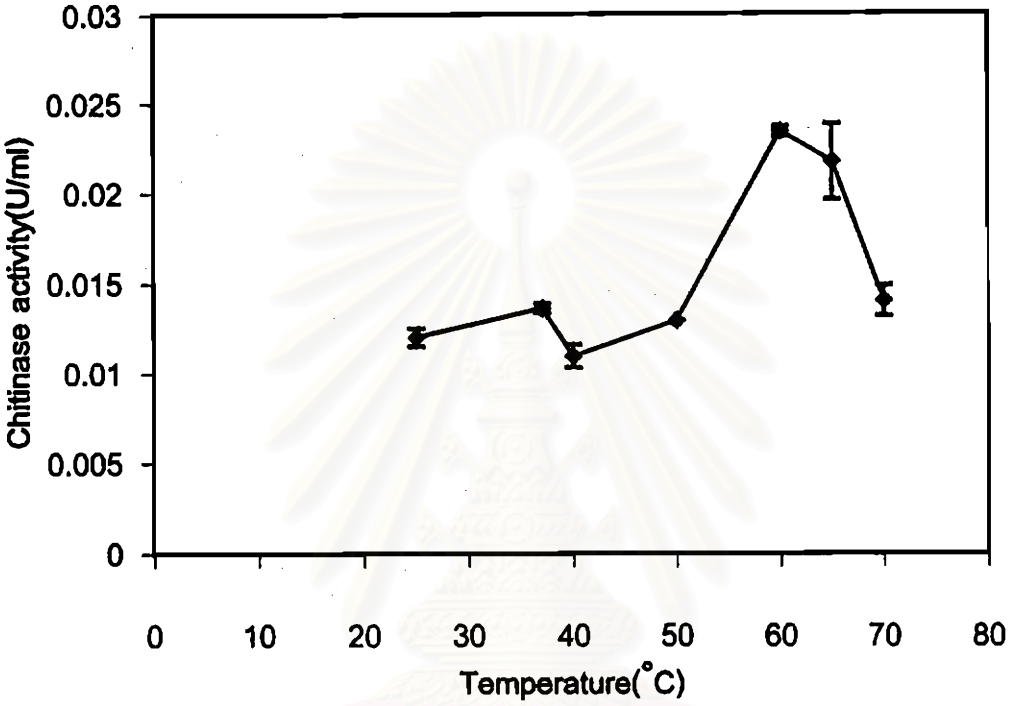
นำสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านขั้นตอนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 3.5และในรูปที่ 6

4.5.1 ผลการกรองชนิดอัลทรา

เติมสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบลงในเครื่องกรองชนิดอัลทรา (MW cut off 10,000 ดาลตัน) พบว่าไม่พบแอคติวิตีของไคทิเนสในสารละลายส่วนที่ผ่านออกมาจากเครื่องกรองแต่พบว่าความบริสุทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือ 0.80 เท่า ผลผลิตเอนไซม์เหลือ (yield) 62.31 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหลังจากที่ผ่านการกรองชนิดอัลทราแล้วโปรตีนมีความเข้มข้นขึ้นประมาณ 9.36 เท่า (ตารางที่ 3) นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นอีกด้วยการกลบ aqua sorb (aqua sorb treatment) จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินต่อไป

4.5.2 ผลการทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นด้วย aqua sorb

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการกรองชนิดอัลทราปริมาตร 77.5 มิลลิลิตร มากลบด้วย aqua sorb พบว่าสามารถทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากเดิมถึง 23.36 เท่า แต่ในขั้นตอนนี้ทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเป็น 0.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์ลดลงเหลือ 0.61 เท่าและมีผลผลิตเอนไซม์เหลือ 35.18 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)



รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบ ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (วิธีทำข้อ 3.4) (n=2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.3 ผลการแยกเอนไซม์ด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน

นำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นแล้วจากข้อ 3.5 จำนวน 25 มิลลิลิตร ไปไดอะไลซ์ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร ประมาณ 100 เท่าของสารละลายเอนไซม์ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปผ่านลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (ขนาด 10.5 x 1.9 เซนติเมตร) ซึ่งทำให้อยู่ในสภาพที่สมดุลย์แล้วด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ชะด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ ชะต่อด้วยโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear pH gradient pH 5.5 – pH 3.1 ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 และกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 ปริมาตร 4 เท่าของคอลัมน์ สุดท้ายชะด้วยกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH3.1 จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก (A_{280}=0)

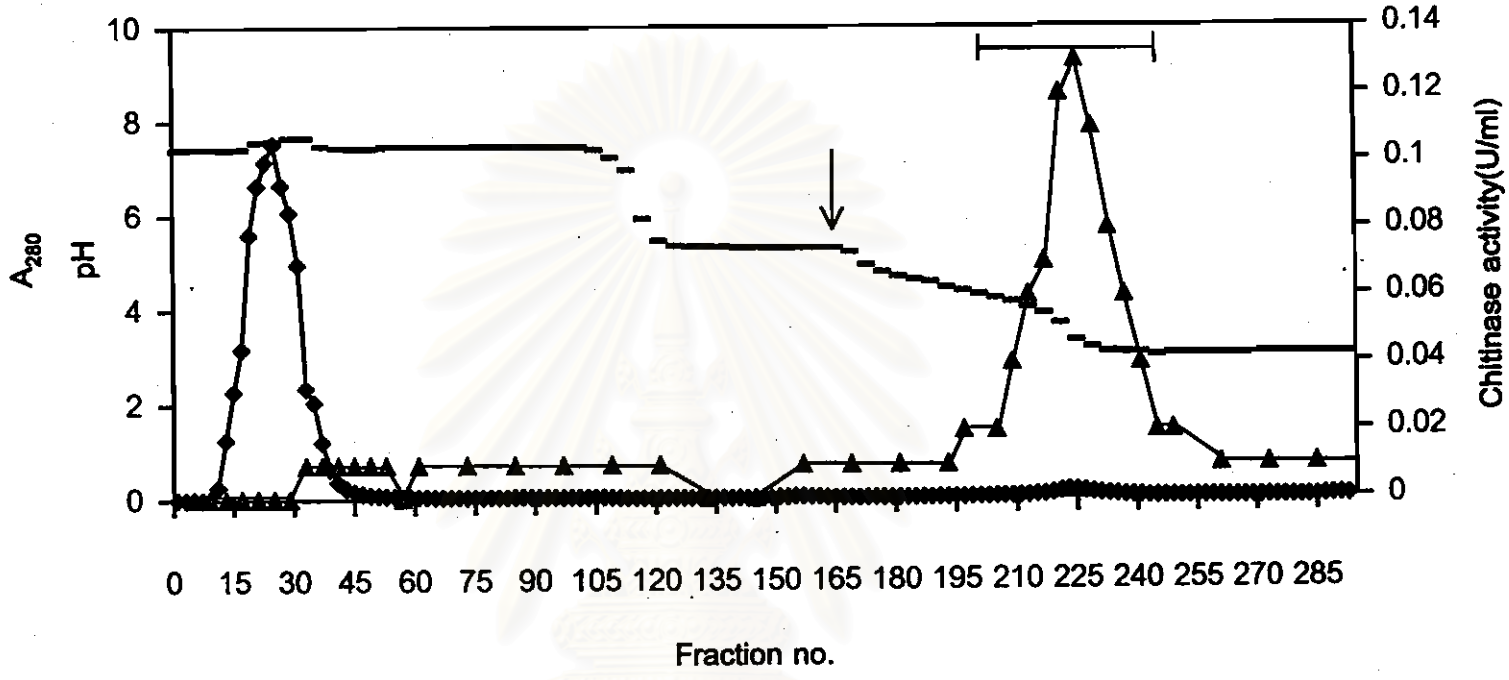
ผลการทดลองในรูปที่ 11 แสดงว่า เมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกซึ่งเป็นโปรตีนส่วนใหญ่จะออกจากคอลัมน์เมื่อชะด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 โปรตีนส่วนที่ 2 จะเริ่มออกจากคอลัมน์เมื่อชะด้วย linear pH gradient ที่ช่วง pH 4.73-3.10 ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เฉพาะในโปรตีนส่วนที่ 2 (แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในโปรตีนส่วนแรก

การผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินจะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 27.78 เท่า ผลผลิตของเอนไซม์เท่ากับ 28.89 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3)

สรุปผลการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในตารางที่ 3

4.6 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนสโดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส

นำสารละลายเอนไซม์ส่วนต่างๆ ที่เตรียมได้คือ เอนไซม์อย่างหยาบ เอนไซม์หลังทำให้เข้มข้นแล้ว (ด้วยการกรองชนิดอัลทราและกลบด้วย aqua sorb) และเอนไซม์หลังการผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินไปทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสที่ pH 8.3 (วิธีข้อ 3.5.2) ติดตามแถบโปรตีนด้วยการย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 (วิธี



รูปที่ 11 ผลการแยกเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (โปรตีน 64.25 มิลลิกรัม)โดยการผ่านลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (ขนาด 10.5 x 1.9 เซนติเมตร) ชะด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 และ linear pH gradient ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 และ กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.0 และกรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.0 เป็นลำดับสุดท้าย อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 1.5 มิลลิลิตร (ตามวิธีในข้อ 3.5)

◆ OD280 ▲ แอคติวิตีของไคทิเนส ▬ pH ↓ เริ่มชะด้วย linear pH gradient ⊢——⊣ รวมแฟรคชัน 205-245

ตารางที่ 2 ผลการเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน

Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity (U/ml)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
1. Crude enzyme	995.00	0.11	109.45	0.02	19.90	0.18	1.00	100.00
2. Ultrafiltration	77.50	1.03	79.83	0.16	12.40	0.16	0.80	62.31
3. Aqua sorb treatment	25.00	2.57	64.25	0.28	7.00	0.11	0.61	35.18
4. Regenerted chitin column	57.50	0.02	1.15	0.10	5.75	5.00	27.78	28.89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

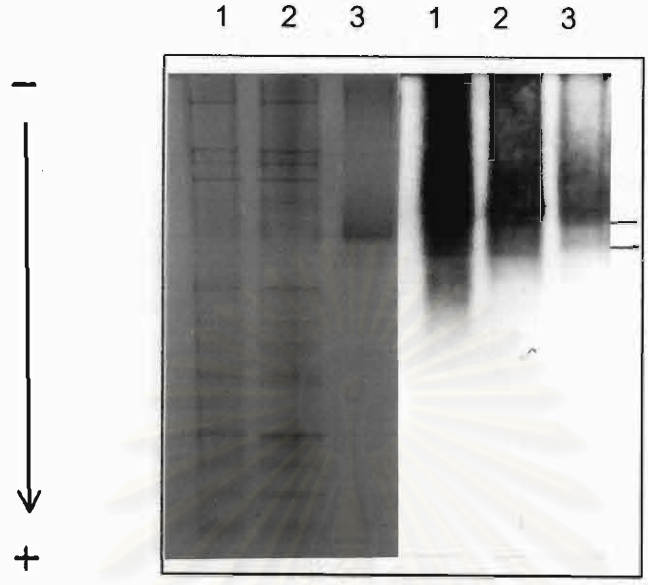
ข้อ 3.5.2.4) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12 พบว่าเอนไซม์อย่างหยาบและเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นแล้วปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินจะเหลือแถบโปรตีนเพียง 2แถบ ซึ่งประกอบด้วยแถบโปรตีนเข้ม 1 แถบ และจาง 1 แถบ (รูปที่ 12ก.) ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 แถบนี้สามารถย้อมติดสีย้อมเฉพาะของไคทิเนส (รูปที่ 12ข.) ในการทดลองทุกครั้งพบว่ามีโปรตีนบางส่วนติดอยู่ที่บริเวณส่วนหัวเจลเสมอและมีแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยเช่นกัน

4.7 สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของไคทิเนสที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน

เนื่องจากไคทิเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ มีสมบัติแตกต่างกัน การวิจัยนี้จึงศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ว่ามีความคล้ายคลึงหรือแตกต่างจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆอย่างไร โดยนำสารละลายเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* ทั้งเอนไซม์อย่างหยาบและเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วมาศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีบางประการดังนี้

4.7.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธีเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส

นำสารละลายเอนไซม์ทั้ง 3 ส่วน คือ เอนไซม์อย่างหยาบ เอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นแล้ว และ เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินไปทำ SDS-PAGE (วิธีข้อ 3.6.1) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 พบว่า การผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินสามารถขจัดโปรตีนที่เจือปนอยู่ไปได้มากแต่ไม่หมด (รูปที่ 13ก. แถวที่ 2-4) ส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (แถวที่ 4) พบว่ามีแถบโปรตีนชัดเจน 2 แถบ และจางอีกหลายแถบ เมื่อย้อมด้วยสารละลายฟลูออเรสเซนซ์เพื่อติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล (วิธีข้อ 3.6.1.6) ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์อย่างหยาบปรากฏแถบแอคติวิตีทั้งหมด 5 แถบ (รูปที่ 13ข. แถวที่ 1) โดยมีแถบแอคติวิตีเข้ม 3 แถบ (แถบที่ 1 3 และ 5) และแถบจาง 2 แถบ (แถบที่ 2 และ 4) ส่วนเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นแล้วปรากฏแถบแอคติวิตีชัดเจน 3 แถบ (แถบที่ 2 3 และ 5) และแถบที่ 1 ซึ่งจางมาก ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทด



ก. ข.

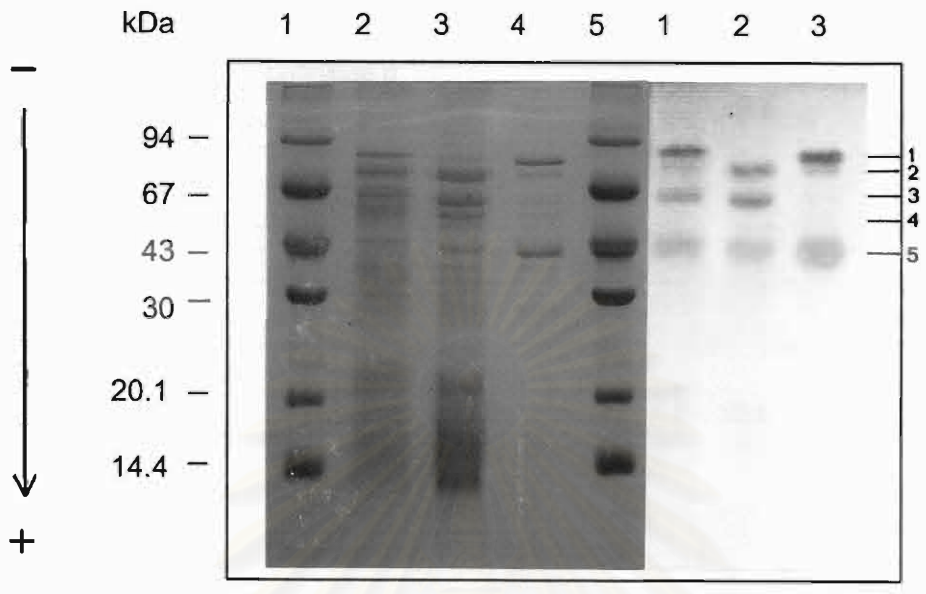
รูปที่ 12 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส 7.5 เปอร์เซ็นต์ pH 8.3 (วิธีข้อ 3.5.2) แบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R 250 (ก.) และอีกส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย Fluorescent Brightener 28 (ข.)

ก.

แถวที่ 1 เอนไซม์อย่างหยาบ (0.025 ยูนิต, 13.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 เอนไซม์อย่างหยาบที่ทำให้เข้มข้นแล้ว (0.038 ยูนิต, 20.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (0.012 ยูนิต, 6.0 ไมโครกรัม)

ข.

แถวที่ 1 เอนไซม์อย่างหยาบ (0.025 ยูนิต, 13.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 เอนไซม์อย่างหยาบที่ทำให้เข้มข้นแล้ว (0.038 ยูนิต, 20.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (0.010 ยูนิต, 5.0 ไมโครกรัม)



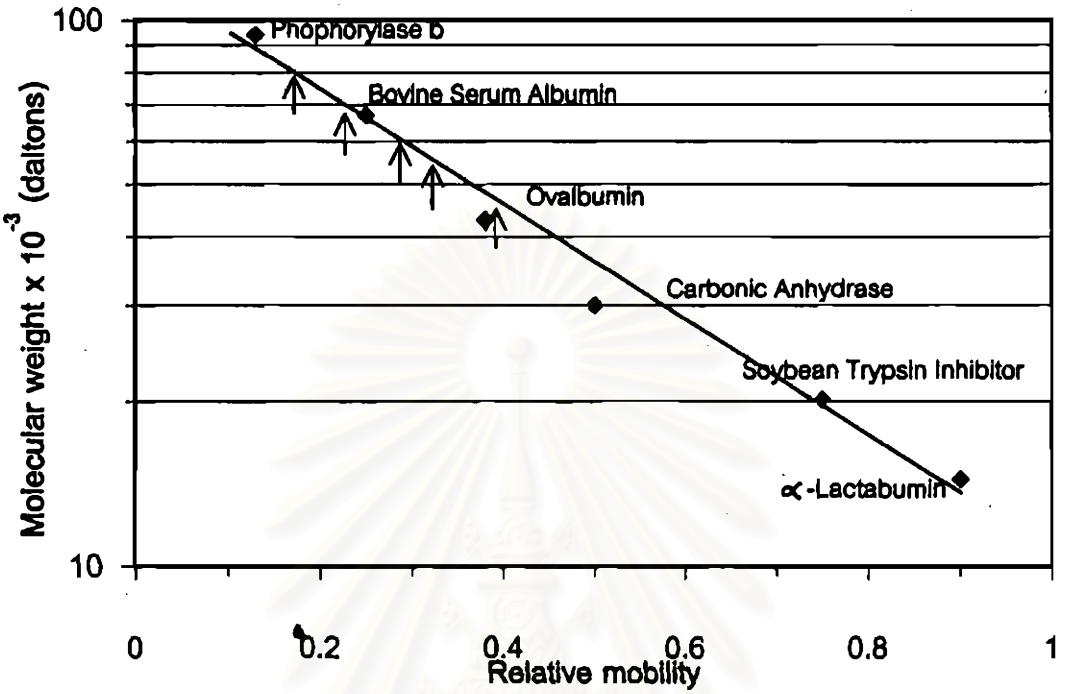
รูปที่ 13 รูปแบบโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดยเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ pH 8.3 (วิธีข้อ 3.6.1) แบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R 250 (ก.) และอีกส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย Fluorescent Brightener 28 (ข.)

ก.

แถวที่ 1และ 5 โปรตีนมาตรฐาน (16.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 เอนไซม์อย่างหยาบ (0.025 ยูนิต, 13.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 เอนไซม์อย่างหยาบหลังจากทำให้เข้มข้น (0.038 ยูนิต, 20.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 4 เอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (0.005 ยูนิต, 2.5 ไมโครกรัม)

ข.

แถวที่ 1 เอนไซม์อย่างหยาบ (0.025 ยูนิต, 13.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 เอนไซม์อย่างหยาบหลังจากทำให้เข้มข้น (0.038 ยูนิต, 20.0 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 เอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (0.006 ยูนิต, 3.0 ไมโครกรัม)



รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (วิธีทำข้อ 3.6.1)

Phosphorylase b	MW	94,000	daltons
Bovine Serum Albumin	MW	67,000	daltons
Ovalbumin	MW	43,000	daltons
Carbonic Anhydrase	MW	30,000	daltons
Soybean Trypsin Inhibitor	MW	20,100	daltons
α-Lactabumin	MW	14,400	daltons

ไคทินปรากฏแถบแอคติวิตีเข้ม 3 แถบ (แถบที่ 1 2 และ 5) และจาง 2 แถบ (แถบที่ 3 และ 4) สรุปได้ว่าจากการศึกษา SDS-PAGE พบว่ามีแถบที่ติดสีย้อมไคทิเนสทั้งหมด 5 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 70 60 58 และ 45 กิโลดาลตัน

4.7.2 ผลการตรวจสอบไกลโคโปรตีนของเอนไซม์

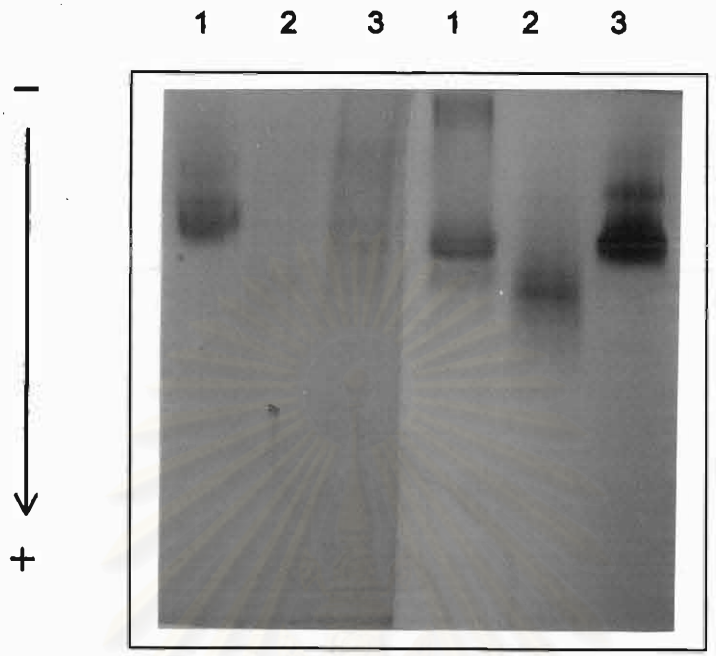
นำสารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินไปทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสตามวิธีข้อ 3.5.2 ติดตามแถบโปรตีนโดยย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 (วิธีทดลองข้อ 3.5.2.4) และติดตามแถบไกลโคโปรตีนด้วย Periodic Acid-Schiff reagent (วิธีทดลองข้อ 3.6.7) โดยมีทรานสเฟอรินเป็น positive control และ ธีโมโกลบินเป็น negative control ผลแสดงในรูปที่ 15 จะเห็นว่าไคทิเนสมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน เนื่องจากย้อมติดสีม่วงจางๆของ Periodic Acid-Schiff reagent

4.7.3 ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-9 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.6) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 4-6 ที่ pH 3 และ pH 7 จะมีแอคติวิตีลดลงเหลือ 73.35 และ 67.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเอนไซม์จะทำงานได้ไม่ดีในช่วง pH เป็นด่าง

4.7.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยเปลี่ยนภาวะการทดลองจากอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 25-60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 17 พบว่า เอนไซม์มีแอคติวิตีดีในช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ผลจากข้อ 4.7.3 และ 4.7.4 จึงเลือกใช้ pH 5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในการทดลองต่อๆ ไป



ก. ข.

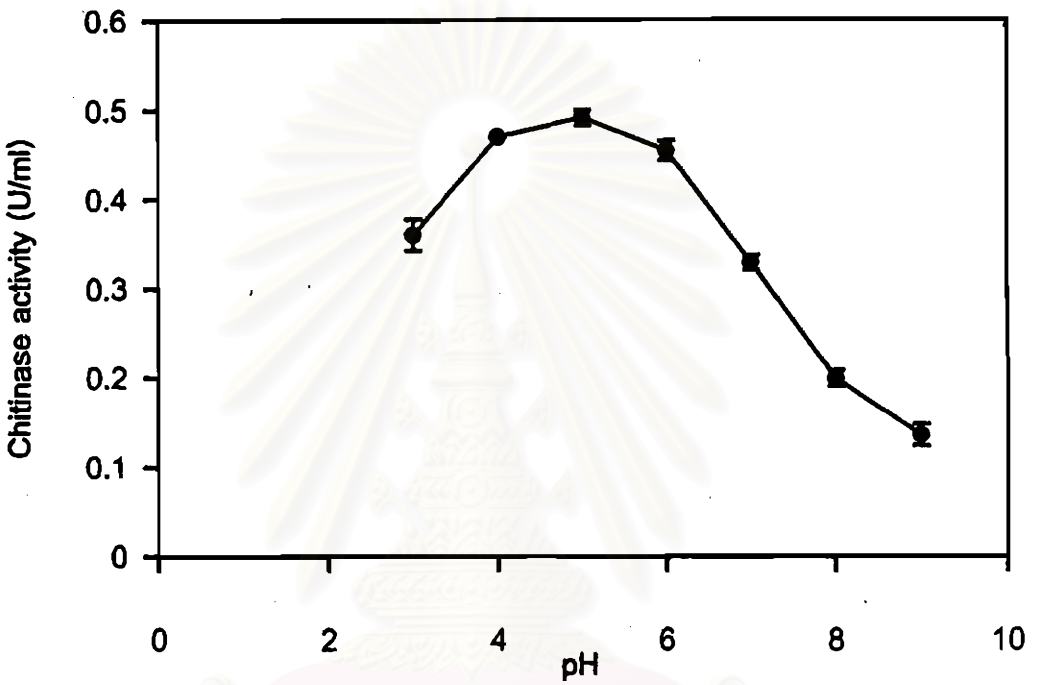
รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบไกลโคโปรตีนของไคทิเนสจากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน หลังแยกโดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส 7.5 เปอร์เซ็นต์ (วิธีข้อ 3.5.2) แล้วติดตามแถบไกลโคโปรตีนด้วย Periodic Acid-Schiff reagent (ก.) ติดตามแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R 250 (ข.)

ก.

แถวที่ 1 ทรานสเฟอริน (50 ไมโครกรัมโปรตีน)
แถวที่ 2 ฮีโมโกลบิน (50 ไมโครกรัมโปรตีน)
แถวที่ 3 เอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (70 ไมโครกรัมโปรตีน)

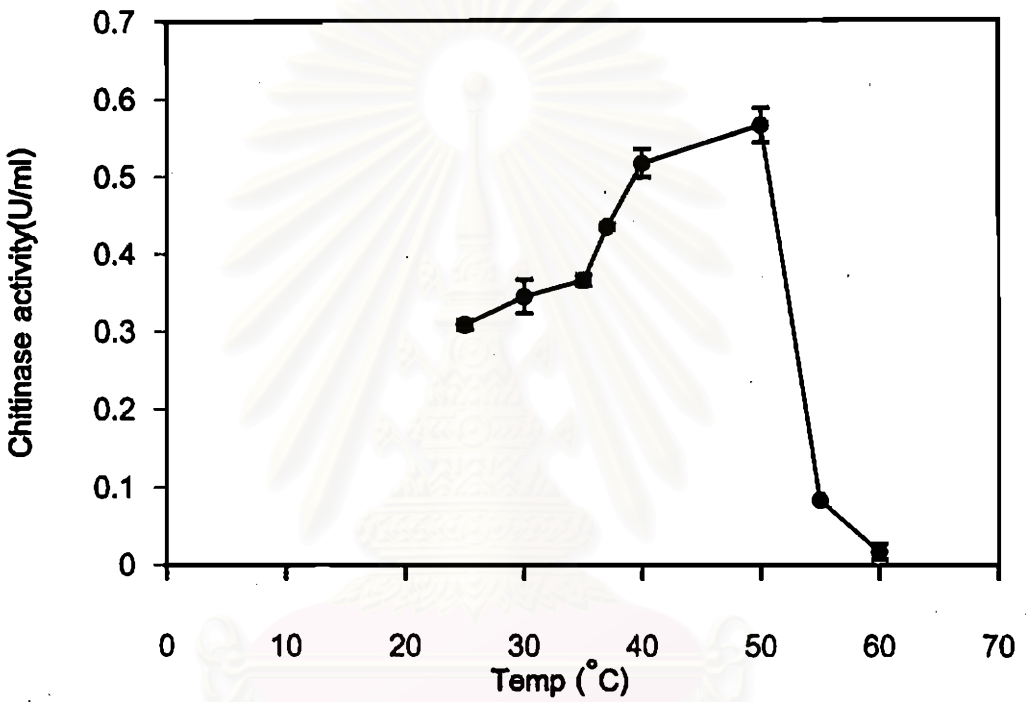
ข.

แถวที่ 1 ทรานสเฟอริน (15 ไมโครกรัมโปรตีน)
แถวที่ 2 ฮีโมโกลบิน (15 ไมโครกรัมโปรตีน)
แถวที่ 3 เอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (15 ไมโครกรัมโปรตีน)



รูปที่ 16 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-9 ในภาคผนวกที่ 5 ข้อ 1.1-1.6 (วิธีทำข้อ 3.6.2) (n=2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (วิธีทำข้อ 3.6.2) (n=2)

แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จะเหลือแอคติวิตี 55.61 เปอร์เซ็นต์

4.7.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของไคทิเนสต่อคอลลอยดัลไคทิน

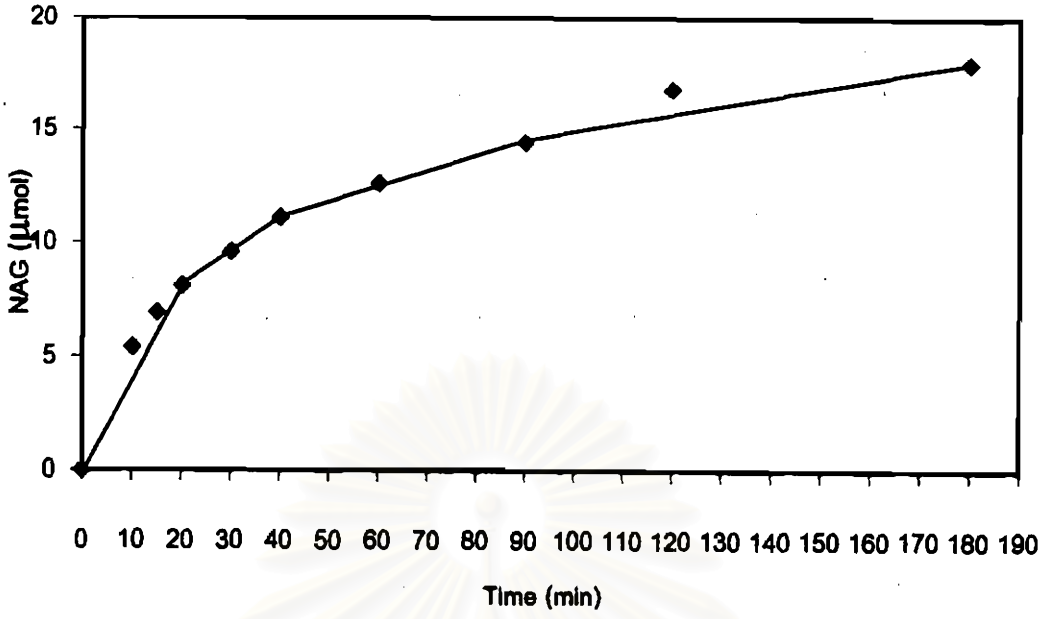
ศึกษาจลนพลศาสาตร์ของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ต่อคอลลอยดัลไคทินตามวิธีข้อ 3.6.3 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 18ก.พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.0 เวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์คือ 15 นาที จากนั้นจึงบ่มเอนไซม์กับคอลลอยดัลไคทินที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที นำผลที่ได้มาพลอตกราฟ Lineweaver-Burk Plot หาค่า Km ของไคทิเนสต่อคอลลอยดัลไคทินได้เท่ากับ 0.922 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังผลการทดลองในรูปที่ 18ข. และ 18ค.

4.7.6 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของเอนไซม์

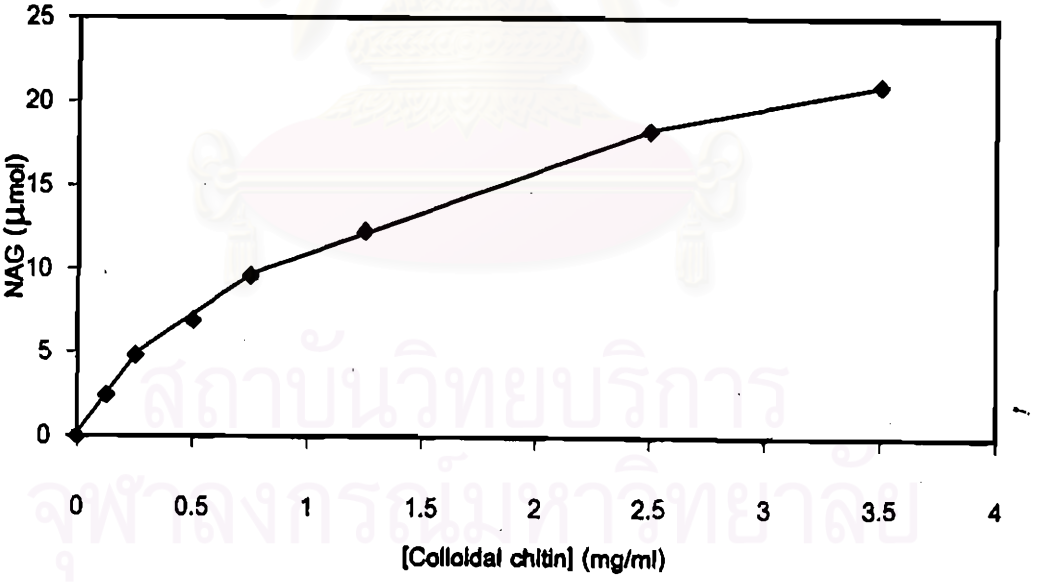
บ่มสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-12 (ภาคผนวกที่ 5 ข้อ1.1-1.9) โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร (pH สุดท้ายได้เป็น 2.93-11.78) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.0 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 (pH สุดท้ายที่ได้เป็น 5.09-5.50) นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ (residual activity) เปรียบเทียบผลกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ (pH 5 ที่เวลา 0 นาที) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 19 พบว่าเอนไซม์ค่อนข้างเสถียรที่ pH 4-10 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง แสดงให้เห็นว่าไคทิเนสมีความเสถียรทั้งในภาวะที่เป็นกรดและในภาวะที่เป็นด่าง แต่เอนไซม์จะทำงานได้ไม่ดีที่ pH สูงหรือต่ำมากๆ

4.7.7 ผลการศึกษาความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ

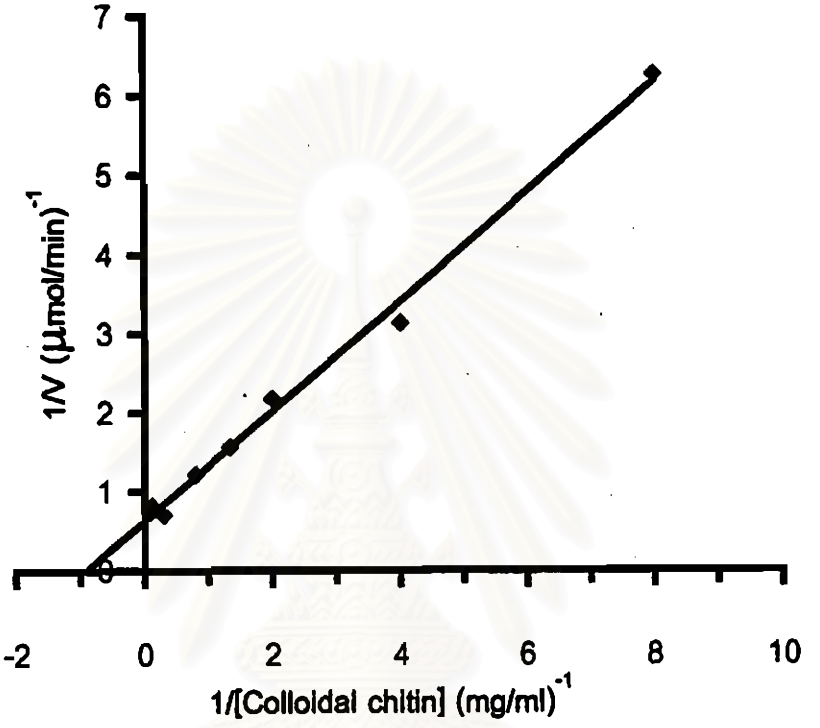
บ่มสารละลายเอนไซม์ทำให้บริสุทธิ์แล้วบางส่วนแล้วในสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ คอลลอยดัลไคทิน ไคทินบริสุทธิ์ รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไกลคอลไคโตแซน ไคทินผง ไคโตแซน เซลลูโลส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส วัดแอคติวิตีตาม



รูปที่ 18ก. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายเอนไซม์และ NAG ที่เกิดขึ้น โดยบ่มคอลลอยดัลไคทินปริมาณ 0.6 มิลลิกรัมกับไคทิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ

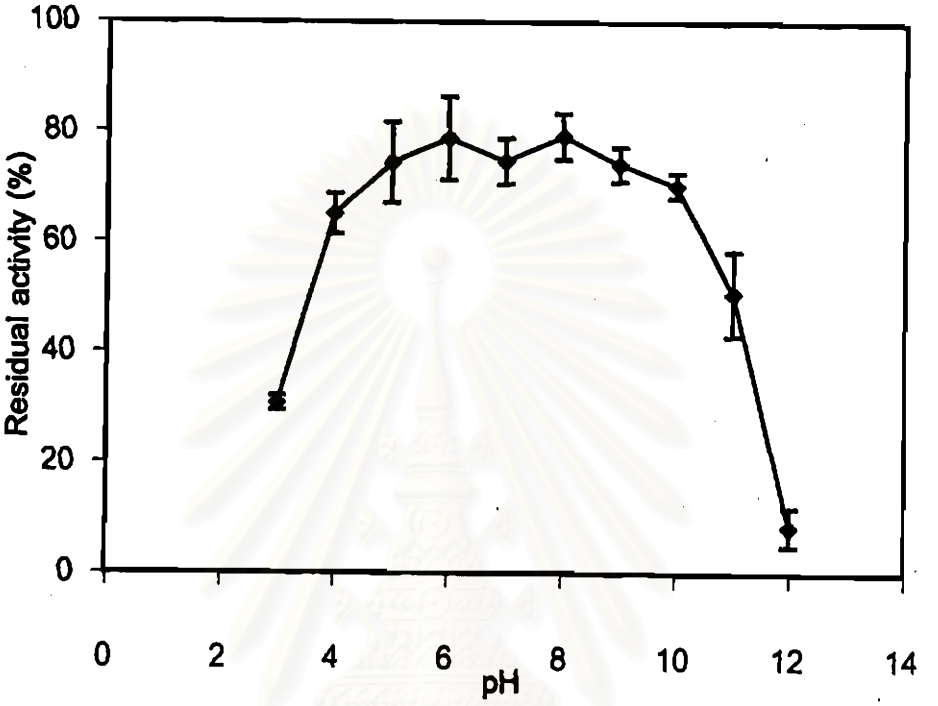


รูปที่ 18ข. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอลลอยดัลไคทินและ NAG ที่เกิดขึ้น โดยบ่มเอนไซม์กับคอลลอยดัลไคทินปริมาณต่างๆ ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ความเข้มข้นเอนไซม์เท่ากับ 0.273 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (วิธีทำข้อ 3.6.3)



รูปที่ 18ค. Lineweaver-Burk Plot ของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.273 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีทำข้อ 3.6.3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไคทิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว โดยปมสารละลายเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3-12 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปรับ pH ให้เป็น 5 ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ (วิธีทำข้อ 3.6.4) (n=2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีข้อ 3.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 พบว่าไคทิเนสสามารถย่อยคอลลอยดัลไคทินได้ดีที่สุด รองลงมาคือรีเจนเนอเรทไคทิน ไคทินบริสุทธิ์ ไกลคอลไคทิน ไกลคอลไคโตแซน ไคโตแซน ตามลำดับ และไม่ย่อยไคทินผง เซลลูโลส และ คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

4.7.8 ผลการตรวจสอบชนิดของไคทิเนส

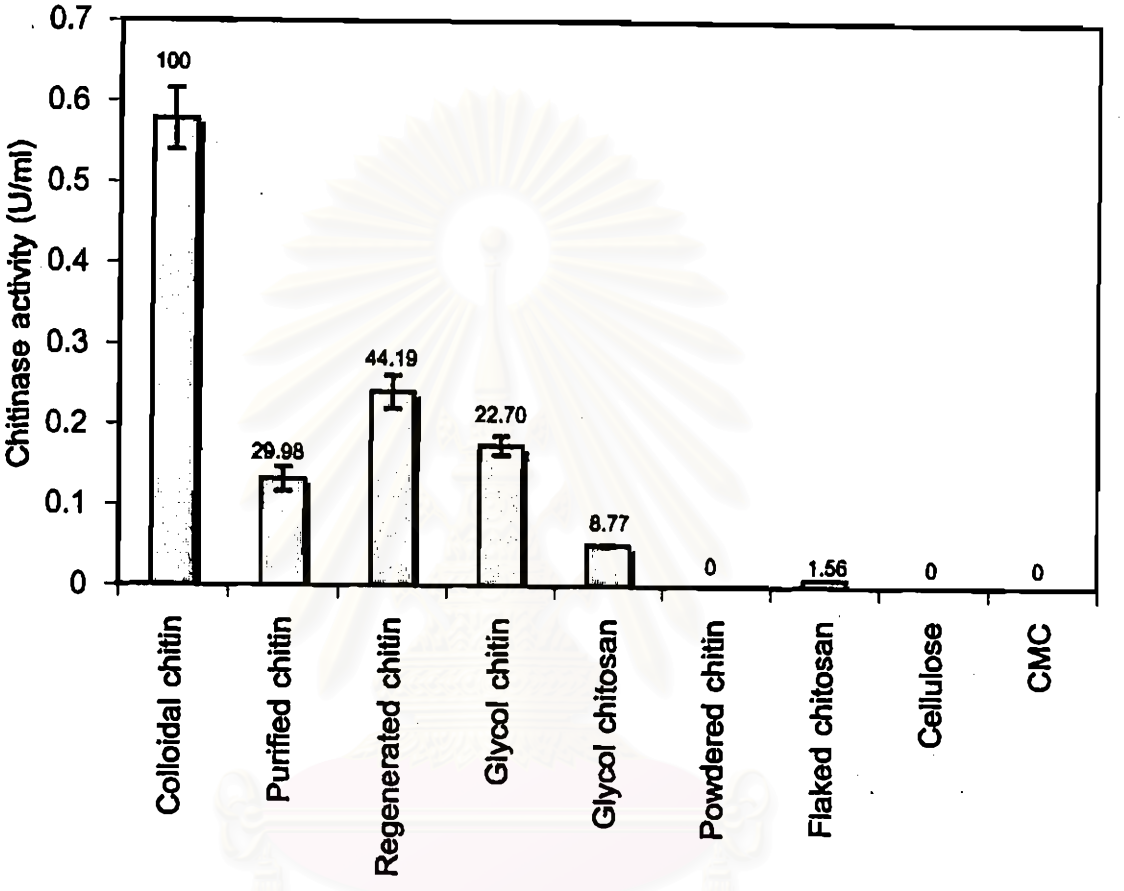
บ่มสารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินกับสารละลาย p-nitrophenyl-chitooligosaccharides ซึ่งได้แก่ p-nitrophenyl-β-D-N-acetylglucosaminide p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose และ p-nitrophenyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose ซึ่งใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของ N-acetyl-β-D-glucosaminidase chitobiosidase หรือ exochitinase และ endochitinase ตามลำดับ ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่าไคทิเนสที่เตรียมได้จาก *B. cereus* เป็นชนิด chitobiosidase และ endochitinase ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 24.60 และ 2.43 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่มีแอคติวิตีของ N-acetyl- -D-glucosaminidase

4.7.9 ผลการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสในอาหารแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นส่วนประกอบ

เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคทิเนสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* กับแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตราฐาน จึงนำสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วและสารละลายไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ที่ใช้ในทางการค้าปริมาณ 0.02 ยูนิตเท่ากันหยอดลงในวุ้นแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นส่วนประกอบอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) (ข้อ 3.6.8) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21 พบว่า หลุมที่ 1 (หลุมควบคุม) ไม่เกิดวงใสในหลุมที่หยอดสารละลายเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* (หลุมที่ 2) และหลุมที่หยอดสารละลายเอนไซม์จาก *Serratia marcescens* (หลุมที่ 4) เริ่มเห็นวงใสเกิดขึ้นที่ขอบหลุมอย่างชัดเจนเมื่อชั่วโมงที่ 1 ส่วนในหลุมที่หยอดสารละลายเอนไซม์จาก *Bacillus cereus* ปริมาณ 0.01 ยูนิต (หลุมที่3) เกิดวงใสช้ากว่าหลุมที่ 2 และ 4 เมื่อวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสของ

ทุกหลุมหลังจากปมนาน 48 ชั่วโมงได้ผลดังนี้ หลุมที่ 2 3 และ 4 วัดขนาดวงใสได้ 2.3 1.6 และ 2.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนหลุมที่ 1 (หลุมควบคุม) ไม่เกิดวงใส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



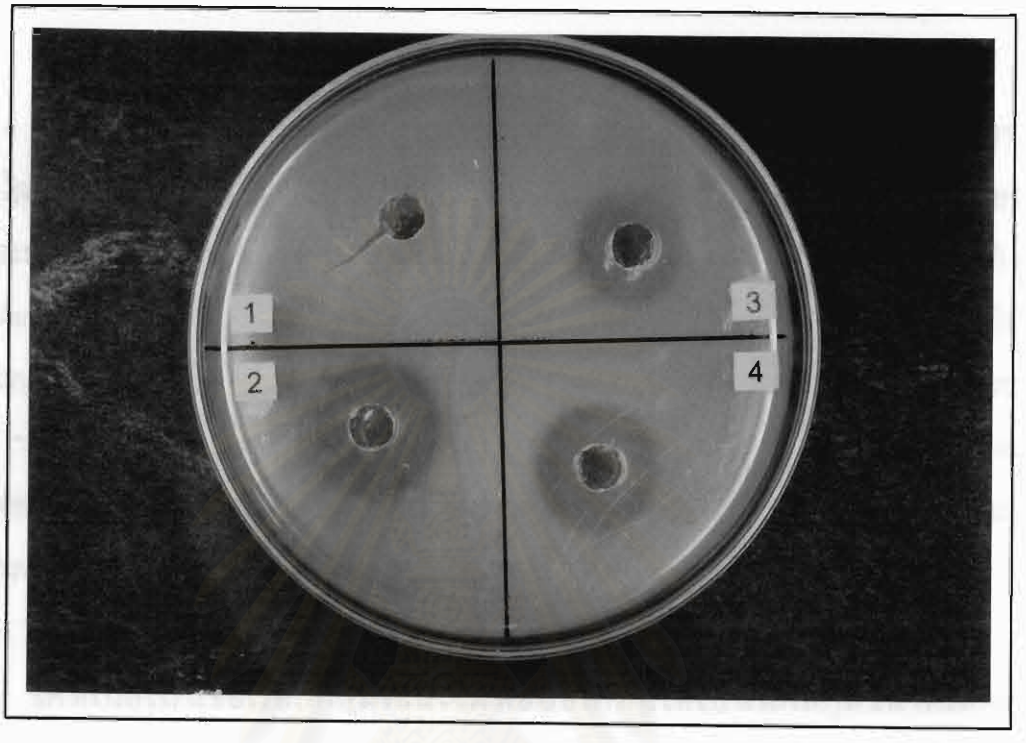
รูปที่ 20 ผลการศึกษาความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยบ่มเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วกับสับสเตรทชนิดต่างๆ (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine 0.1 โมลาร์ pH 5.0 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (วิธีทำข้อ 3.6.5) (n=2)

ตารางที่ 3 ความจำเพาะของไคทิเนสต่อ p-nitrophenyl chitooligosaccharides

Substrate	Activity (U/ml)
p-nitrophenyl-β-D-N-acetyl-glucosaminide	0 ± 0.00
p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetyl-chitobiose	24.6 ± 0.00
p-nitrophenyl-β-D-N.N'N''-triacetyl-chitotriose	2.43 ± 0.20

หมายเหตุ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลอง (วิธีทำข้อ 3.6.6) (n=2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 ผลการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วจาก *Bacillus cereus* เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ที่ใช้ในทางการค้า โดยวิธีการตรวจสอบวงใสที่เกิดขึ้นในอาหารวุ้นแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ปมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หลุมที่ 1 สารละลายบัฟเฟอร์ (control)
หลุมที่ 2 ไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* (0.02 ยูนิต)
หลุมที่ 3 ไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* (0.01 ยูนิต)
หลุมที่ 4 ไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* (0.02 ยูนิต)