สมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของไคทิเนสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus*

นางสาว ชมพูนุท รักอำนวยกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1801-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21014619

PHYSICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PARTIALLY PURIFIED CHITINASE FROM *Bacillus cereus*

Miss Chompoonoot Rukumnauykit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1801-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของไคทิเนสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus*
โดย	นางสาวชมพูนุท รักอำนวยกิจ
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. พีรดา มงคลกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร)

ชมพูนุท รักอำนวยกิจ : สมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของไคทิเนสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus cereus* (PHYSICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PARTIALLY PURIFIED CHITINASE FROM *Bacillus cereus*) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. พีรดา มงคลกุล, 90 หน้า, ISBN 974-17-1801-2

Bacillus cereus สามารถผลิตไคทิเนสและขับออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นองค์ประกอบ และการเพิ่มอะซิเทตที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ *B. cereus* มีไคทิเนสแอคติวิตีสูงขึ้น เมื่อนำไคทิเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการกรองแบบอุลทราฟิลเตรชัน ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส คอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน และคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24 เท่า ผลผลิต 11 เปอร์เซ็นต์ และมีแอคติวิตีจำเพาะ 0.62 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพ พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ให้แอคติวิตีของไคทิเนส 2 แถบ การศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเสียสภาพพบว่าในสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบมีไคทิเนสอย่างน้อย 6 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 89, 50.5, 43.4, 36, 31.4 และ 17.6 กิโลดาลตัน เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยรีเจนเนอเรทเทดไคทิน พบแถบแอคติวิตีเหลือเพียง 3 แถบกว้าง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33.3, 20.3, 16.2 กิโลดาลตัน ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่สามารถย้อมแอคติวิตีของไคทิเนสได้ แต่การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจากแอคติวิตีพีคของขั้นตอนการทำเซฟาเด็กซ์จี-200 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 25 กิโลดาลตัน เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านเซฟาเด็กจี - 200 ไปศึกษาพบว่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการย่อยคอลลอยดัลไคทิน คือ 6.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 4-12 และในช่วงอุณหภูมิ 25-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทิน ไกลคอลไคทิน รีเจนเนอเรทเทดไคทิน และไคทินบริสุทธิ์ได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย (100, 50, 24 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และไม่ย่อยไคโตแซน ไกลคอลไคโตแซน และไคทินผงไม่บริสุทธิ์ จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยสับสเตรทที่มีสีพบเป็นแบบไคโทไบโอซิเดส และเอ็นโดไคทิเนส ในอัตราส่วน 1.07:1.00 และไม่มีแอคติวิตีของเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส ผลของไอออนที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์พบว่าที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ของ $CuSO_4$, $MnCl_2$, $HgCl_2$ และ $ZnSO_4$ ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ $CaCl_2$ และ $FeCl_2$ ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เกือบสมบูรณ์ (98-99 เปอร์เซ็นต์) ส่วน $MgCl_2$ ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เล็กน้อย (6 เปอร์เซ็นต์)

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... **ลายมือชื่อนิสิต**.....ชมพูนุท รักอำนวยกิจ.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

ปีการศึกษา...2545.....

4272246223: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: CHITINASE/ PURIFICATION/ CHARACTERIZATION/ *Bacillus cereus*

CHOMPOONOOT RAKUMNUAYKIT : (PHYSICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PARTIALLY PURIFIED CHITINASE FROM *Bacillus cereus*) THESIS ADVISOR: ASST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D. 90 pp. ISBN 974-17-1801-2

Extracellular chitinase was produced from *Bacillus cereus* when it was cultivated in a medium containing colloidal chitin. Addition of 10 mM acetate in the medium rendered higher chitinase activity. Chitinase from *B. cereus* was purified approximately 24 folds with 11 % yield and a specific activity of 0.622 unit/mg protein by ultrafiltration, DEAE-cellulose column chromatography, regenerated chitin column chromatography, and Sephadex G-200 column chromatography. Analysis by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of the regenerated chitin preparation found two bands which corresponded to chitinase activity staining. The crude enzyme gave six chitinase bands and the molecular weight were 89, 50.5, 43.4, 36, 31.4 and 17.6 kD by sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme from the regenerated chitin preparation gave only three chitinase activity bands with molecular weight of 33.3, 20.3 and 16.2 kD. Molecular weight estimation of the chitinase peak in Sephadex G-200 was 25 kD. The activity of this enzyme fraction was not detectable in both the non-denaturing polyacrylamide gel and sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel). Therefore, it is not possible to identify the chitinase band(s). Studies for the biochemical properties of the enzyme preparation from Sephadex G-200 fraction showed that the optimum pH and temperature of the enzyme were 6.0 and 60 $^{\circ}$C, respectively. The enzyme showed a wide range of pH and temperature stability as 4 - 12 and 25 - 65 $^{\circ}$C, respectively. The enzyme hydrolyzed colloidal chitin, glycol chitin, regenerated chitin, and purified chitin (100, 50, 24 and 12 %, respectively) but did not hydrolyze flake chitosan, glycol chitosan and flake chitin. Characterization of the enzyme by color substrate analogs showed activity ratio of chitobiosidase and endochitinase as 1.07:1.00 with no N-acetylglucosaminidase activity. Effect of ions on enzyme activity showed that ,at 10 mM, the enzyme was completely inactivated by $CuSO_4$, $MnCl_2$, $HgCl_2$ and $ZnSO_4$ whereas $CaCl_2$ and $FeCl_3$, were potent inhibitors (98-99 %) but $MgCl_2$ was mild inhibitor (6 %).

Department.....Biochemistry..... Student's signature.....

Field of Study....Biochemistry..... Advisor's signature.....

Academic year.....2002.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล เป็นอย่างยิ่งที่ท่านได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ทั้งในด้านงานวิจัยและด้านอื่น ๆ ตลอดมาทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และคอยแนะนำและให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร. รัฐ พิชญางกูร ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คอยแนะนำ ให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมาและอนุเคราะห์เชื้อและไคโตแซนที่ใช้ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความรู้ ประสบการณ์และคำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี เจ้าหน้าที่และบุคคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาว มณีรัตน์ มีพลอย ที่ได้อนุเคราะห์รีเจนเนอเรทเทดไคทินที่ใช้ในงานวิจัย คำแนะนำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา นายวิศิน ศิลปวิสุทธิ์ที่ได้อนุเคราะห์คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200ที่ใช้ในงานวิจัย นางสาว บุญรัตน์ จันทร์ทอง และนิสิตปริญญาโท-เอกภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ รวมทั้งให้คำแนะนำและคำปรึกษาด้วยดีตลอดมา

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงิน ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ
คำย่อ.....ฐ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์.....21
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....25
    3.1 แบคทีเรีย.....25
    3.2 การวัดแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method).....27
    3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford.....28
    3.4 การเตรียมไคทิเนสที่ได้จาก *B. cereus* ให้บริสุทธิ์.....28
    3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนสโดยการทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรฟอรีซีส (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....31
    3.6 การศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส เอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจล (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....32
    3.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่เตรียมได้.....34
4 ผลการทดลอง
    4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส.....38
    4.2 การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus* sp.....38
    4.3 การเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....40

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4.4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนสด้วยเจลอิเล็กโทรฟอริซิส
แบบไม่เสียสภาพ.....45
4.5 การศึกษาขนาดโมเลกุลของไคทิเนสด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเสียสภาพ
และโดยการทำคอลัมน์แบบเจลฟิลเตรชัน.....45
4.6 สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนที่เตรียมได้.....49
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....61
6. สรุปผลการทดลอง.....68
รายการอ้างอิง.....69
ภาคผนวก.....74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....91

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1. โครงสร้างทางเคมี (a) cellulose (b) chitin (c) chitosan (Ravi Kumer, 2000).....4

2. ก. รูปแบบของ endochitinase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542).....6

ข. รูปแบบของ chitobiosidase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทิน และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542).....7

ค. รูปแบบของ N-acetylglucosaminidase และ chitobiase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและไคโทไบโอส ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542).....8

3. แสดงกลไกการออกฤทธิ์ในการเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนส (Sasaki และคณะ, 2002).....16

4. เปรียบเทียบกลไกการย่อยไคทินของไคทิเนสในกลุ่ม family 18 (a) และ family 19 (b) (Brameld และ Goddard, 1998).....17

5. รูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....39

6. รูปแบบของโปรตีนและแอคติวิตีของไคทิเนสผลิตจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....39

7. รูปแบบการเจริญของ *Bacillus cereus* เมื่อนำมาเลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี acetate ความเข้มข้น 0-10 มิลลิโมลาร์ โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....41

8. รูปแบบของแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* เมื่อนำมาเลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี acetate ความเข้มข้น 0-10 มิลลิโมลาร์ โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....41

9. ผลการแยกเอนไซม์โดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (ขนาด 2.3x20 เซนติเมตร) โดย load โปรตีน 17.71 มิลลิกรัม ซึ่งชะด้วย linear salt gradient ของโซเดียมคลอไรด์ 0.1 ถึง 0.5 โมลาร์ ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 แล้วตามด้วย 1.0 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์เดียวกันด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 5 มิลลิลิตรตามวิธีในข้อ 3.4.2.....43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

10. ผลการแยกเอนไซม์โดยการผ่านลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (ขนาด 10.5x1.9 เซนติเมตร) โดย load โปรตีน 37.65 มิลลิกรัม ซึ่งชะด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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 2 มิลลิลิตรตามวิธีในข้อ 3.4.3.....44

11. ผลการทำคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) โดย load โปรตีน 1.3 มิลลิกรัม ชะด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร ตามวิธีทำในข้อ 3.4.4 โปรตีนที่ใช้เป็น marker ได้แก่ ไซโตโครม ซี (cytochrome C) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) โบไวซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) และคาตาเลส (Catalase) น้ำหนักโมเลกุล12.5, 43, 68 และ232 กิโลดาลตัน ตามลำดับ.....46

12. รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์ซึ่งแยกโดยเจลอิเล็กโทรฟอรีซีสแบบไม่เสียสภาพโดยใช้เจล 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีทำในข้อ3.5 โดยแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบโปรตีนด้วยวิธี silver stain อีกส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบแอคติวิตีด้วยการย้อม Fluorescent Brightener 28.....48

13. รูปแสดงผลการทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรฟอรีซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีทำในข้อ3.6 โดยแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบโปรตีนด้วยวิธี silver stain อีกส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบแอคติวิตีด้วยการย้อม Fluorescent Brightener 28.....50

14. แสดงผล pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำในช่วง pH 3-9 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 11.1-11.6) ทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.7.2 (n=3).....51

15. ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

โดยทำตามวิธีทำในข้อ 3.7.2 (n=3).....53

16. ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายเอนไซม์และแอคติวิตีของไคทิเนสที่เกิดขึ้นโดยบ่มคอลลอยดัลไคทินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรกับไคทิเนสในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 3.7.3.....54

17. ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไคทิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยบ่มสารละลายเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 3.0-12.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 10.1-10.8) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรับให้เป็น pH 6 ด้วยสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6 แล้วทำการวัดแอคติวิตีที่ pH 6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามวิธีทำในข้อ 3.7.4 โดยให้ที่ pH 6 มีแอคติวิตีเป็น 100 เปอร์เซ็นต์.....55

18. ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไคทิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยบ่มสารละลายเอนไซม์กับสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 25-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการวัดแอคติวิตีที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 6.0 ในเวลา 0 นาที ซึ่งเป็นหลอดควบคุมและให้แอคติวิตีเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีทำในข้อ 3.7.4.....56

19. ผลการศึกษาความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนกับสับสเตรทชนิดต่างๆ (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (n=3).....58

20. แสดงผลการศึกษาผลของไอออนบางชนิด(ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์)ต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการทดลองในโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบผลกับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมไอออนต่าง ๆ ทำตามวิธีทำในข้อ 3.7.7 (n=2).....60

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1. การทำบริสุทธิ์และสมบัติของไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus* sp.....10

2. ผลการเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....47

3. ความจำเพาะของไคทิเนสจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ต่อ p-nitrophenyl chitooligosaccharides.....59

คำย่อ

NAG	=	N-acetylglucosamine
PNP	=	p-nitrophenol
BSA	=	bovine serum albumin
DEAE	=	diethylaminoethyl
Min	=	minute
h.	=	hours
μmol	=	micromole
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
M	=	molar
A	=	Absorbance
MW	=	molecular weight
KD	=	kilodalton
TEMED	=	tetramethylethylenediamine