บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส

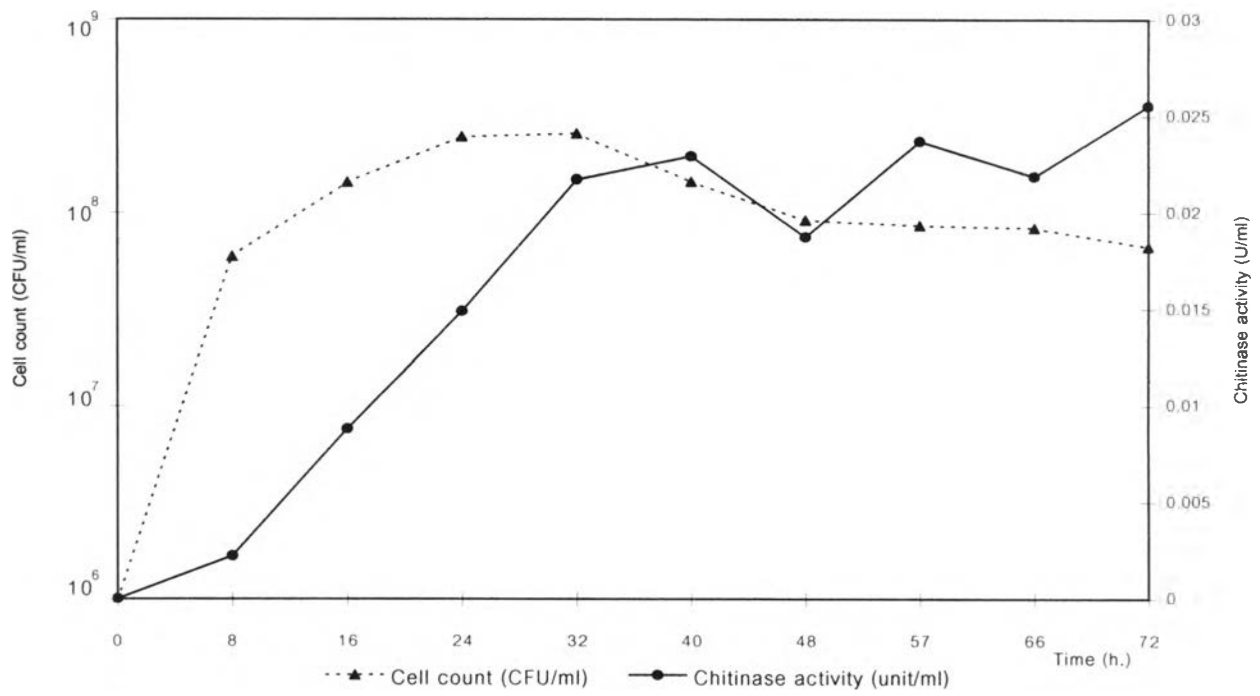
ตรวจสอบความสามารถของเชื้อ *Bacillus cereus* ในการย่อยไคทินในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้นสูตรแข็งที่มี 0.02 % ไคทินบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะนูน เรียบและเป็นรอยหยักแผ่ออกจากศูนย์กลาง โดยเจริญได้อย่างช้าบนอาหารเลี้ยงที่เสริมด้วยไคทินและเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้วนาน 48ชั่วโมงแสดงว่ามีไคทิเนสถูกหลั่งออกมารอบๆแบคทีเรียที่เจริญอยู่แล้วไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทินให้เป็น chitooligosacharides สายสั้นๆ

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Bacillus cereus* ในการผลิตเอนไซม์ไคทิเนสเพื่อที่จะหาภาวะที่เหมาะสมที่แบคทีเรียจะมีแอคติวิตีสูงสุดโดยเพาะเลี้ยง *Bacillus cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วย 0.02 % colloidal chitin pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่าง ทุก 8 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในจานเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อมาปั่นแยกเก็บส่วนใสไปหาแอคติวิตีของไคทิเนสตามวิธีทำข้อ 3.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5 พบว่า *Bacillus cereus* สามารถเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการเจริญก็จะเริ่มลดลง ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มเห็นตั้งแต่ช่วงการเจริญที่ 8 ชั่วโมงแล้วเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 32 หลังจากนั้นแอคติวิตีจะเริ่มคงตัว ส่วนปริมาณโปรตีนนั้นเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 8 สูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 48 จึงคงตัว (รูปที่ 6)

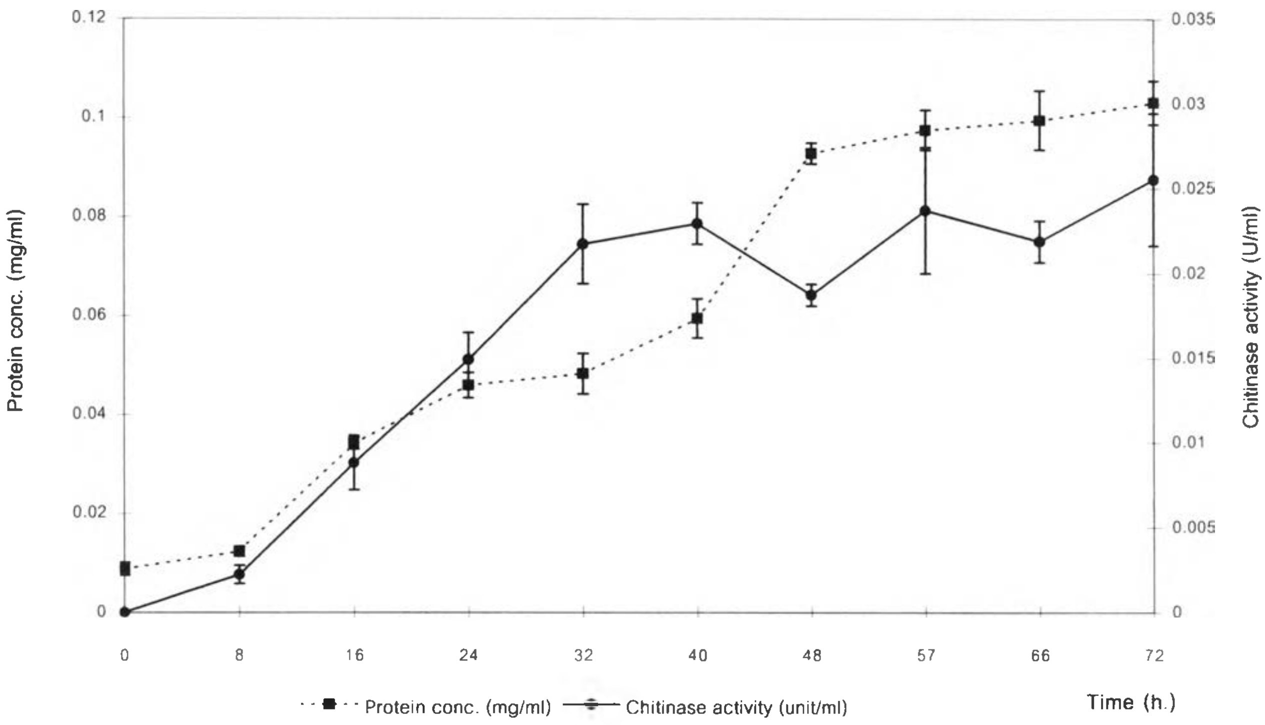
ในการศึกษาต่อไปจึงเลี้ยง *Bacillus cereus* ในอาหารเลี้ยงที่มี คอลลอยดัลไคทินเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 36-38 ชั่วโมงในการเก็บเอนไซม์เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์

4.2. การปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus* sp.

จากการทดลองใช้ acetate ความเข้มข้น 5-10 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมเพิ่มจาก 0.02 % คอลลอยดัลไคทินที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงที่อุณหภูมิ



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



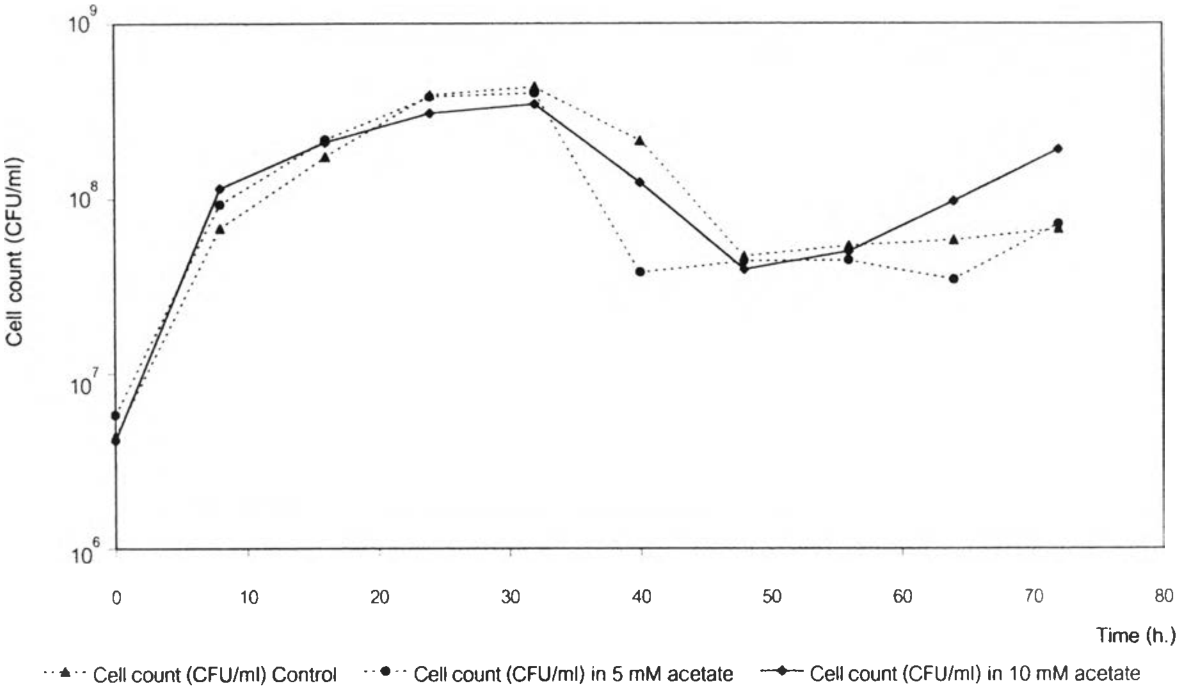
รูปที่ 6 รูปแบบของโปรตีนและแอคติวิตีของไคทิเนสผลิตจาก *Bacilus cereus* **ที่เลี้ยงใน** chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (n=3)

37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาหาค่าแอคติวิตีของไคทิเนสและหารูปแบบการเจริญของเชื้อ แสดงผลการทดลองดังในรูปที่ 7 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มี acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมซึ่งผลการทดลองไม่มีความแตกต่างในการเจริญจากกลุ่มควบคุมแต่สามารถผลิตไคทิเนสได้รวดเร็วและมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นในน้ำเลี้ยงเชื้อเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.0198 หน่วย มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.157 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนเมื่อเลี้ยงไปนาน 48 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มควบคุม มีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.011 หน่วย มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.094 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนในอาหารที่มี acetate 5 มิลลิโมลาร์เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมพบว่าเชื้อเจริญและผลิตเอนไซม์ไคทิเนสได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หลังจาก 48 ชั่วโมงไปแล้วการผลิตเอนไซม์ไคทิเนสของเชื้อ *Bacillus cerues* ลดลงอย่างมากและรวดเร็วทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเติม acetate 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 7 และรูปที่ 8) แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่มีการเติม acetate 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติวิตีจำเพาะของไคทิเนสยังคงสูงกว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเติม acetate 5 มิลลิโมลาร์ คือมีค่าเท่ากับ 0.061 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของไคทิเนสเท่ากับ 0.038 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนและกลุ่มที่มีการเติม acetate 5 มิลลิโมลาร์มีค่าแอคติวิตีจำเพาะของไคทิเนสเท่ากับ 0.045 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

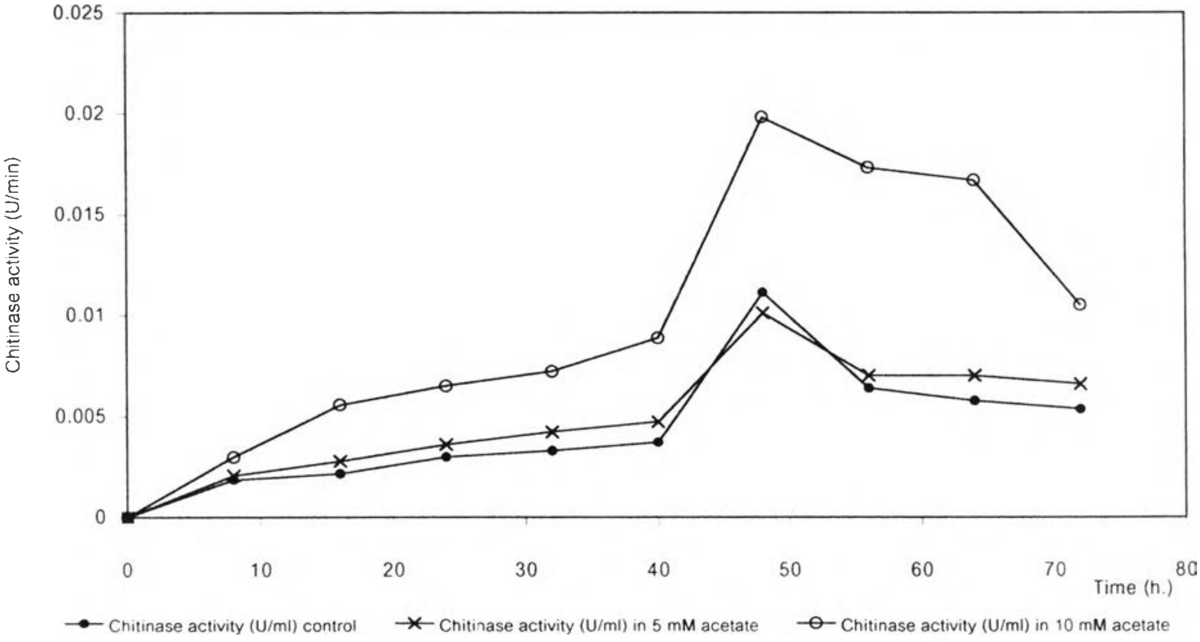
4.3. การเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.02 % คอลลอยดัลไคทินเป็นส่วนประกอบ ที่ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 36-38 ชั่วโมงซึ่งได้ข้อมูลจากผลการศึกษารูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงในช่วงเวลานี้ นำไปแยกเอนไซม์โดยการปั่นแยกเซลล์และไคทินออกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Beckman L-21C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำส่วนน้ำใสที่เป็นสารละลายของเอนไซม์อย่างหยาบมาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลทราฟิลเตรชันตามวิธีทำในข้อ 3.4.1

หลังจากนำเอนไซม์อย่างหยาบมาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลทราฟิลเตรชันแล้วพบว่าปริมาณโปรตีนรวมจะลดลงเหลือประมาณ 42 เปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่เดิม มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.45 เท่า และผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) หลังจากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสในการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 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**



รูปที่ 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**

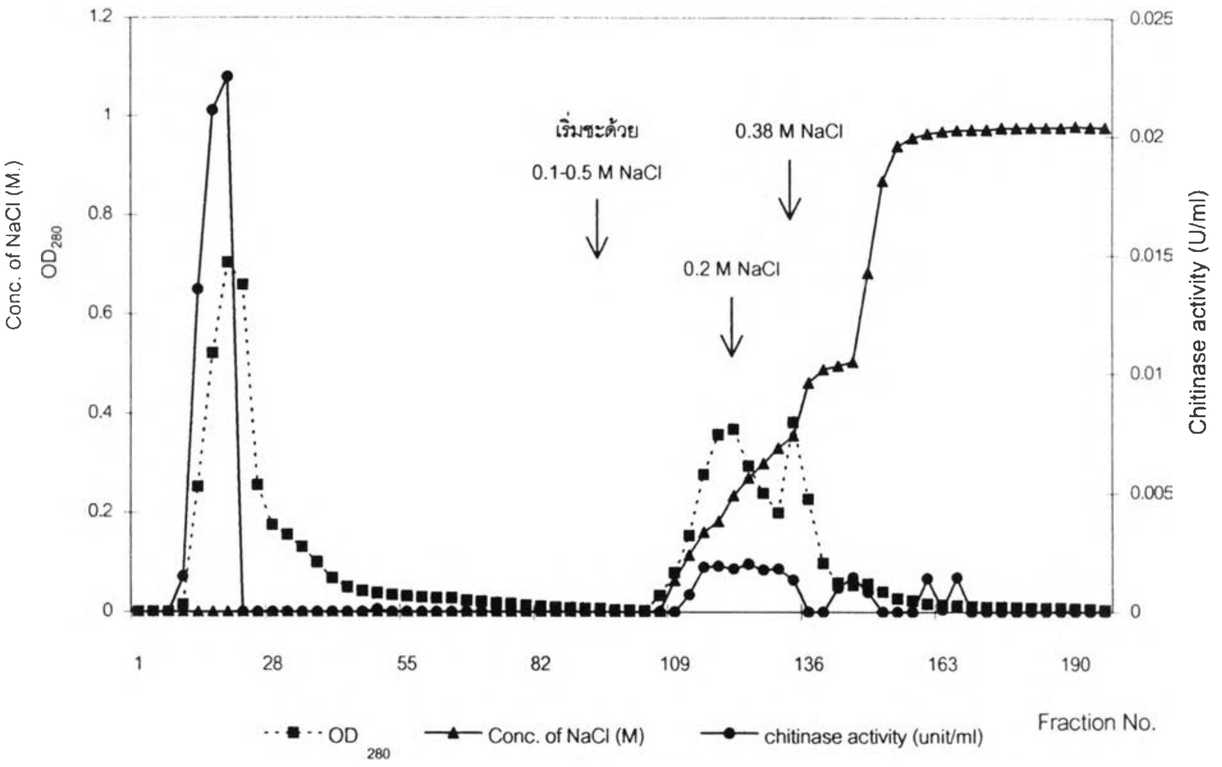
4.3.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

เมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบที่ผ่านอุลทราฟิลเตรชันมาแยกต่อด้วยคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสซึ่งทำให้สมดุลด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 (วิธีทำข้อ 3.4.2) ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังกราฟรูปที่ 9 ซึ่งจะพบแอคติวิตีของไคทิเนสสูงในส่วนของโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ และเมื่อชะด้วย linear gradientของ NaCl 0.1-0.5 M ในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 พบว่ามีเอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อความเข้มข้นของเกลือประมาณ 0.2 โมลาร์ และที่ 0.4 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์แต่มีแอคติวิตีต่ำกว่าในส่วนของโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสประมาณ 7 เท่า จึงทำการรวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีจากส่วนโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์เข้าด้วยกัน (แฟรคชันที่ 10 ถึง 19) ไปไดอะไลซ์ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 นำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอุลทราฟิลเตรชัน พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.92 เท่า และมีผลผลิตเอนไซม์เหลือประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนดังตารางที่ 2

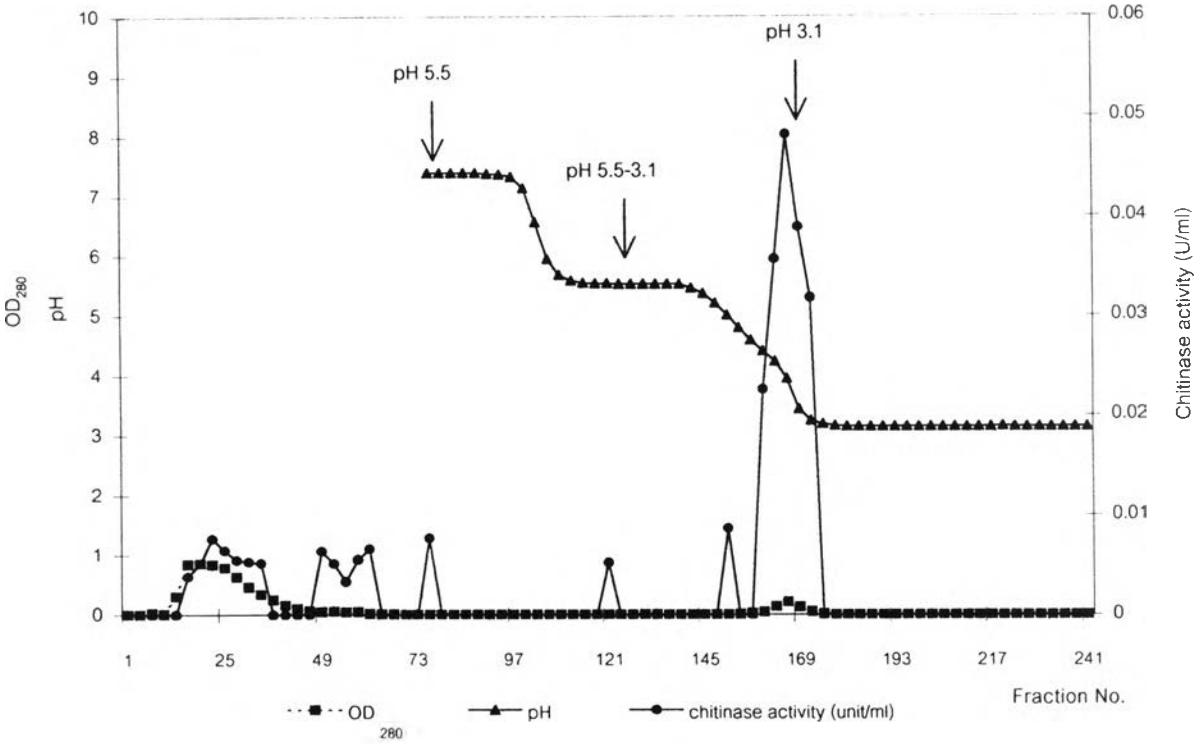
ขั้นต่อไปนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคตินซึ่งเป็นโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography)

4.3.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคติน

หลังจากนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสไปไดอะไลซ์ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 แล้วนำมาลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคตินตามวิธีในข้อ 3.4.3) ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังรูปที่ 10 จากกราฟแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนอื่นถูกกำจัดออกมามากและมีเอนไซม์เพียงเล็กน้อยที่ไม่ติดคอลัมน์เมื่อชะด้วย linear pH gradient 5.5-3.1 ที่เตรียมจากสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ กรดอะซิติก 20 มิลลิโมลาร์ pH 3.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกชะออกมาที่ pH ประมาณ 4.4-3.1 ผลของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแสดงอยู่ในตารางที่ 2 จากผลที่ได้พบว่าคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินสามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นมากถึงประมาณ28.27 เท่า มีผลผลิตเอนไซม์เหลือเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 0.73 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200



รูปที่ 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



รูปที่ 10 ผลการแยกเอนไซม์โดยการผ่านลงในคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (ขนาด 10.5x1.9 เซนติเมตร) โดย load โปรตีน 37.65 มิลลิกรัม ซึ่งชะด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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

4.3.3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กจี-200

เมื่อผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (ขนาด 2.0x90 เซนติเมตร) และชะด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ตามวิธีทำในข้อ 3.4.4 ได้ผลการทดลองดังในรูปที่ 11 จากผลการทดลองจะพบโปรตีนแยกเป็น 2 พีค โดยในพีคแรกซึ่งพบว่ามีแอคติวิตีของไคทิเนสที่แฟรคชันที่ 166 ถึง 237 ส่วนในพีคที่ 2 ไม่พบแอคติวิตีของไคทิเนส หลังจากนั้นได้รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสตั้งแต่แฟรคชันที่ 168 ถึง 211 ทั้งหมดเข้าด้วยกัน พบว่าได้ค่าแอคติวิตีรวมเท่ากับ 0.620 หน่วย ผลผลิตเอนไซม์เหลือ 11 เปอร์เซ็นต์ ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.622 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ 24.04 เท่า

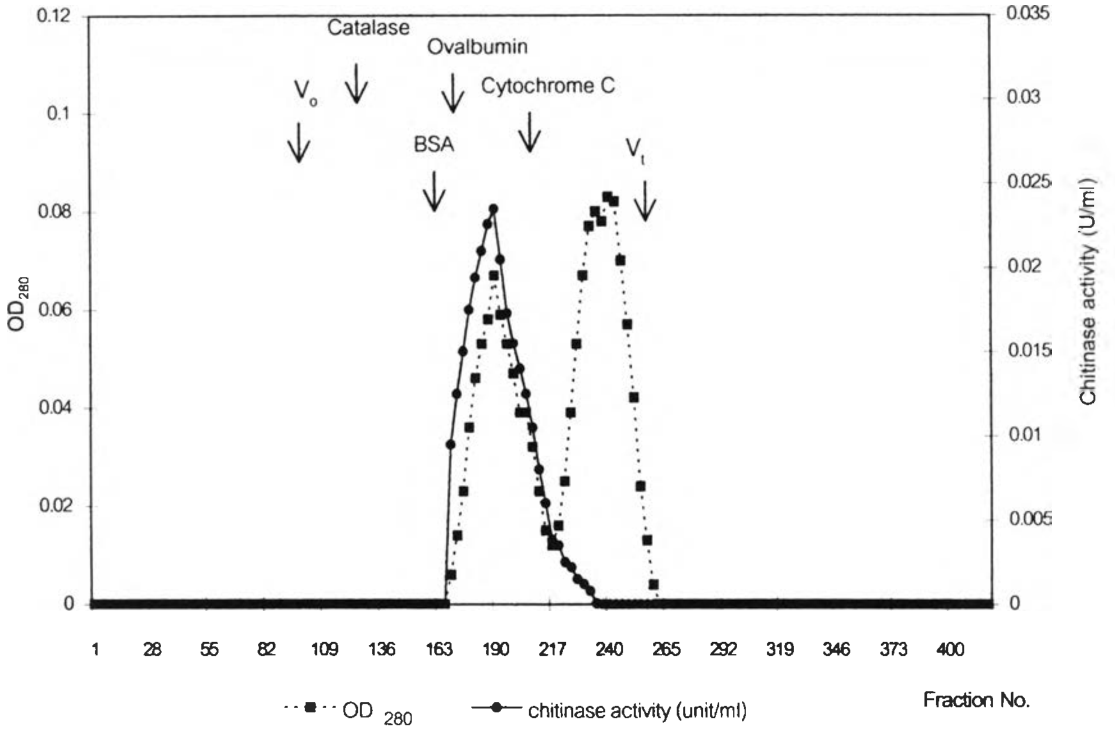
ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าจากเอนไซม์อย่างหยาบที่เริ่มต้นเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกไคทิเนสจากโปรตีนอื่น ๆ ได้ และเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24 เท่าและได้ผลผลิตเอนไซม์ 11 เปอร์เซ็นต์

4.4. ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนสด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ

นำสารละลายของเอนไซม์อย่างหยาบและเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ มาทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยอุลตราฟิลเตรชันมีแถบโปรตีนอยู่หลายแถบและเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีมีแถบโปรตีนที่ปรากฏลดลงจากเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน แต่เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินปรากฏมีแถบโปรตีนเพียง 1 แถบที่ปรากฏให้เห็นในเจล และเป็นแถบที่มีไคทิเนสแอคติวิตี การย้อมสีเจลด้วย Fluorescent Brightener 28 พบว่ามีแถบแอคติวิตี 2 แถบกว้าง R_f เท่ากับ 0.16 และ 0.53 จากสารละลายเอนไซม์ทุกขั้นตอน ยกเว้นเอนไซม์จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ซึ่งไม่มีผลการทดลองเนื่องจากย้อมไม่ติดสี

4.5. การศึกษาขนาดโมเลกุลของไคทิเนสด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเสียสภาพและโดยการทำคอลัมน์แบบเจลฟิลเตรชัน

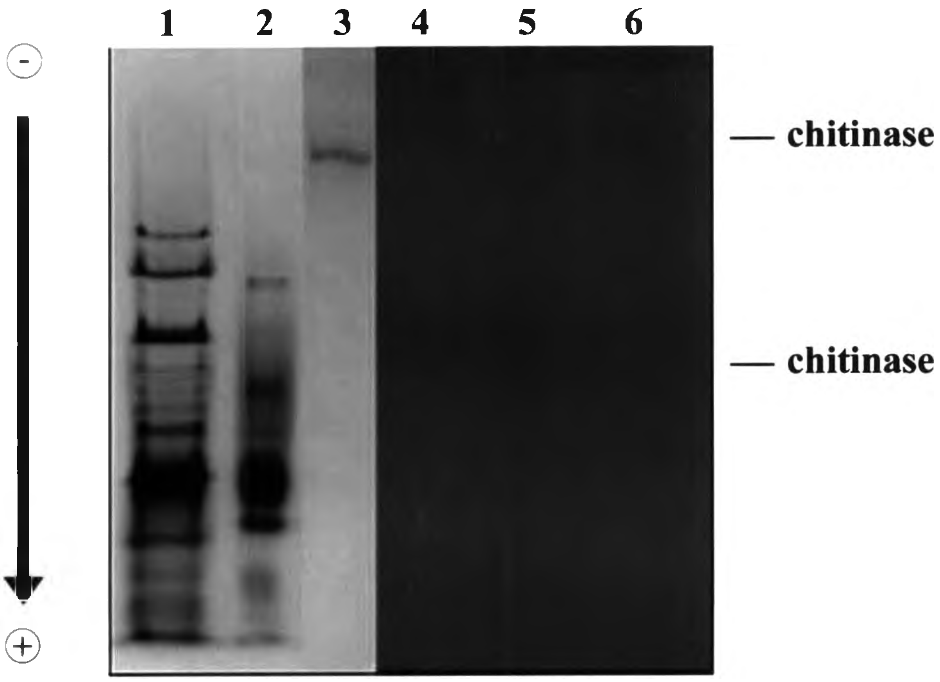
การทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเสียสภาพ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 แถบของโปรตีนมาตราฐานที่ใช้ได้แก่ สารละลายผสมของแอลฟา-แลคตาบูมิน (α-Lactabumin) ซอย



รูปที่ 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) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 12.5, 43, 68 และ 232 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์

Purification step	Vol. (ml)	Protein Conc. (mg/ml)	Total protein (mg)	Chitinase activity (Unit/ml)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg protein)	Purification fold	Yield (%)
1. Crude enzyme	2,700	0.08	216.00	0.002	5.59	0.03	1.00	100
2. Ultrafiltration	180	0.51	91.44	0.019	3.43	0.04	1.45	61
3. DEAE-cellulose	8.2	4.59	37.65	0.228	1.87	0.05	1.92	33
4. Regenerated Chitin	4.5	0.35	1.57	0.256	1.15	0.73	28.27	21
5. Sephadex G-200	36.5	0.03	1.00	0.017	0.62	0.62	24.04	11



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

ติดตามแถบโปรตีน

แถวที่ 1 เอนไซม์อย่างหยาบที่ผ่านอุลตราฟิลเตรชัน (35 µg,0.0004 U)

แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (36 µg, 0.037 U)

แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (2 µg, 0.023 U)

ติดตามแถบแอคติวิตี

แถวที่ 4 เอนไซม์อย่างหยาบที่ผ่านอุลตราฟิลเตรชัน (35 µg,0.0004 U)

แถวที่ 5 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (36 µg, 0.037 U)

แถวที่ 6 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (2 µg, 0.023 U)

บีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean trypsin inhibitor) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase) โอวัลบูมิน (Ovalbumin) และฟอสฟอริลเลส บี (Phosphorylase b) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.4, 20.1, 30, 45 และ 97 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในเอนไซม์อย่างหยาบจะพบแถบโปรตีนหลายแถบแต่มีแถบแอคติวิตีที่ปรากฏให้เห็นทั้งหมด 6 แถบ สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 7) ได้เท่ากับ 89, 50.5, 43.4, 36, 31.4 และ 17.6 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยใน 6 แถบแอคติวิตีนี้มีแถบแอคติวิตีที่ติดสีเข้มเป็นแถบกว้างอยู่ 2 แถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 50.5 และ 17.6 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสจะพบมีแถบโปรตีนลดลง แต่จะพบว่าแถบแอคติวิตีที่พบเหลือเพียง 1 แถบ ซึ่งสามารถหามวลโมเลกุลได้เท่ากับ 17.6 กิโลดาลตัน หลังจากนำเอนไซม์ไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่ามีแถบโปรตีนอยู่ 2 แถบ แต่พบแถบแอคติวิตีที่เห็นได้ชัดซึ่งเป็นแถบกว้าง 3 แถบ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 33.3, 20.3 และ 16.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทำบริสุทธิ์ไคทิเนสโดยการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 พบแถบโปรตีน 1 แถบ แต่ไม่สามารถย้อมสีแอคติวิตีของไคทิเนสจึงไม่สามารถบ่งชี้เรื่องเอนไซม์ได้ แต่จากการทำเจลฟิลเตรชันซึ่งใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 (รูปที่ 11) พบว่าพีคโปรตีนที่มีแอคติวิตีของไคทิเนส มีค่า K_{av} เท่ากับ 0.6013 สามารถนำมาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของพีคโปรตีนดังกล่าวจากโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 6) ได้เท่ากับ 24.9 กิโลดาลตัน

4.6. สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้

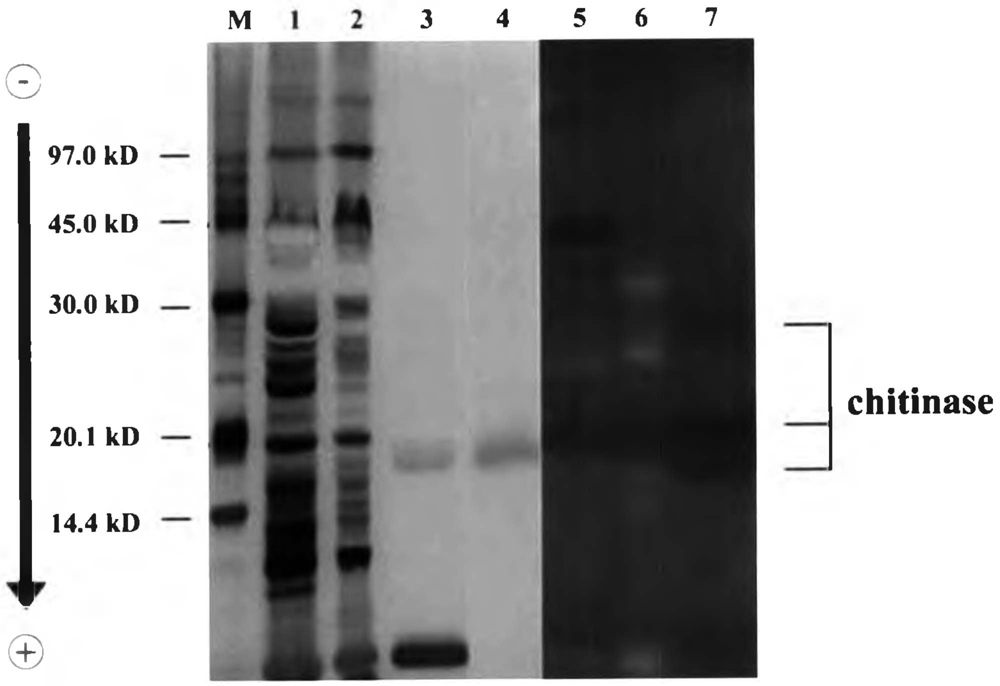
การศึกษาในขั้นตอนนี้ใช้สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

4.6.1. ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-9 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 10.1-10.6) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.7.2 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH ที่เป็นกลาง (pH 4-7) โดย pH ที่เหมาะสมที่สุดของการทำงานของเอนไซม์คือ pH 6.0 เอนไซม์จะทำงานได้ไม่ดีที่พีเอชที่เป็นกรดและด่างโดยจะพบว่าที่ pH 3 และที่ pH 9.0 แอคติวิตีของเอนไซม์เกือบเท่ากับ 0

4.6.2. ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยทำการทดลองในสภาวะ pH 6.0 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โดยเปลี่ยนภาวะการทดลองจากอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 30-70 องศาเซลเซียส ตามวิธีในข้อ 3.7.2



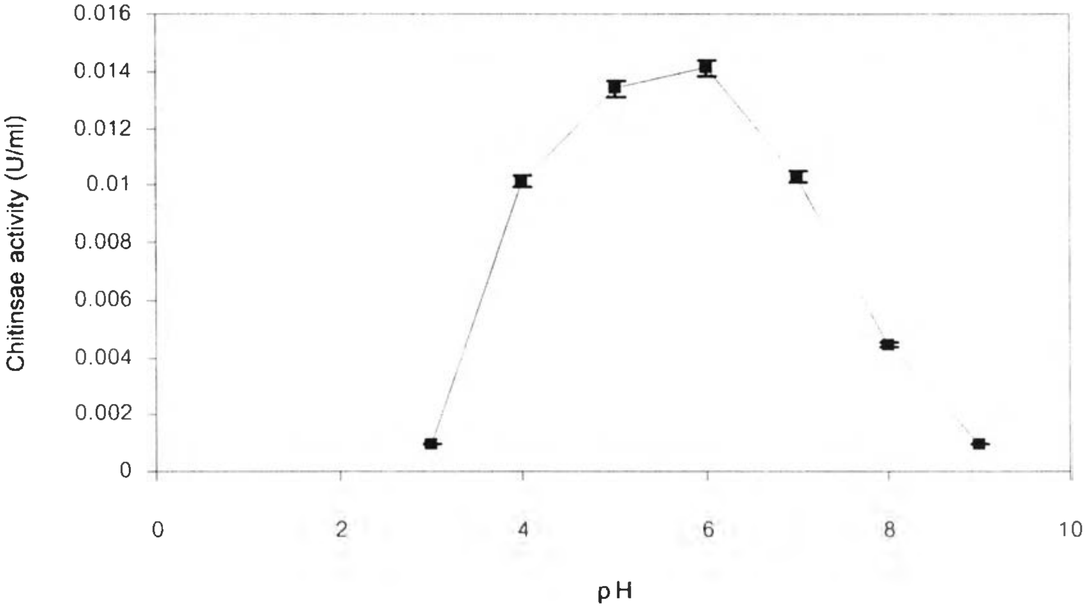
รูปที่ 13 รูปแสดงผลการทำเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์อิเล็กโทรฟอรีซิส 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามวิธีทำในข้อ3.6 โดยแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบโปรตีนด้วยวิธี silver stain อีกส่วนหนึ่งนำไปติดตามแถบแอคติวิตีด้วยการย้อม Fluorescent Brightener 28

ติดตามแถบโปรตีน

แถวที่ M โปรตีนมาตรฐาน	(10 µg)
แถวที่ 1 เอนไซม์อย่างหยาบที่ผ่านอุลตราฟิลเตรชัน	(17 µg,0.0002 U)
แถวที่ 2 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส	(18 µg, 0.018 U)
แถวที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน	(1 µg, 0.012 U)
แถวที่ 4 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200	(0.28 µg, 0.0062 U)

ติดตามแถบแอคติวิตี

แถวที่ 5 เอนไซม์อย่างหยาบที่ผ่านอุลตราฟิลเตรชัน	(17 µg,0.0002 U)
แถวที่ 6 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส	(18 µg, 0.018 U)
แถวที่ 7 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน	(1 µg, 0.012 U)



รูปที่ 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)

ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 15 พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีดีในช่วง 50-65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จึงเลือกใช้ pH 6 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในการทดลองต่อๆ ไป

4.6.3. ผลการศึกษาผลของเวลาในการบ่มเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

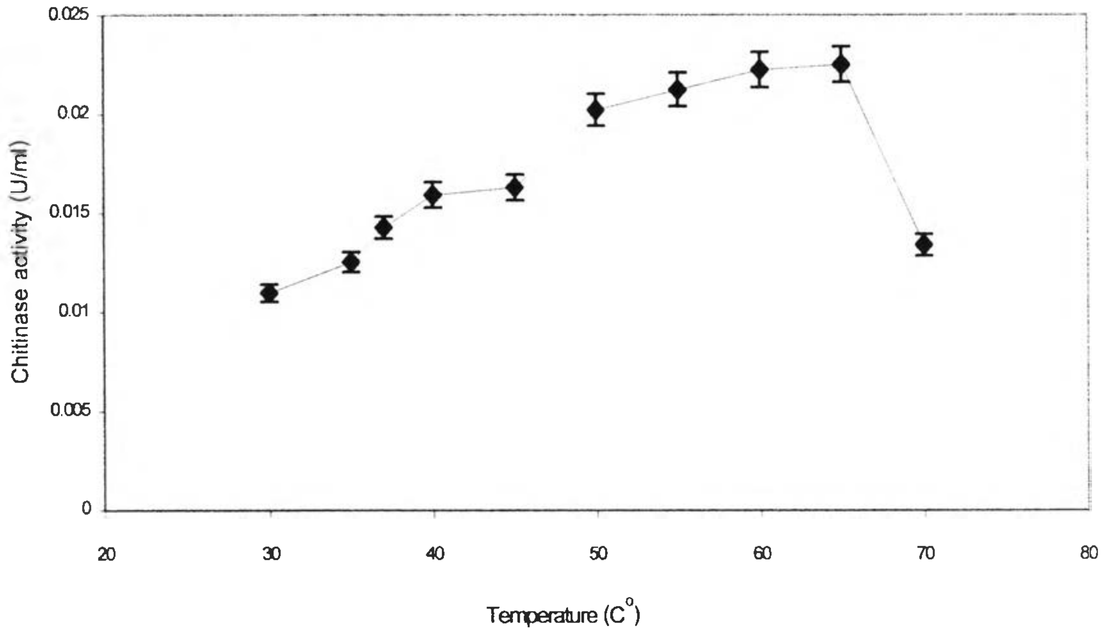
นำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยทำการทดลองในสภาวะ pH 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-120 นาทีแล้ววัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นำผลที่ได้ไปพลอตกราฟตามวิธีในข้อ 3.7.3 ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 16 พบว่าที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีต่อเวลาจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 10 นาทีแรกหลังจากนั้นอัตราของเร็วของปฏิกิริยาจะเริ่มลดลง ผลการทดลองนี้ยังไม่เข้าสู่ภาวะที่แอคติวิตีคงตัว แต่จากผลที่ได้พบว่าการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ควรใช้เวลาอย่างต่ำ 30 นาที

4.6.4. ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของเอนไซม์

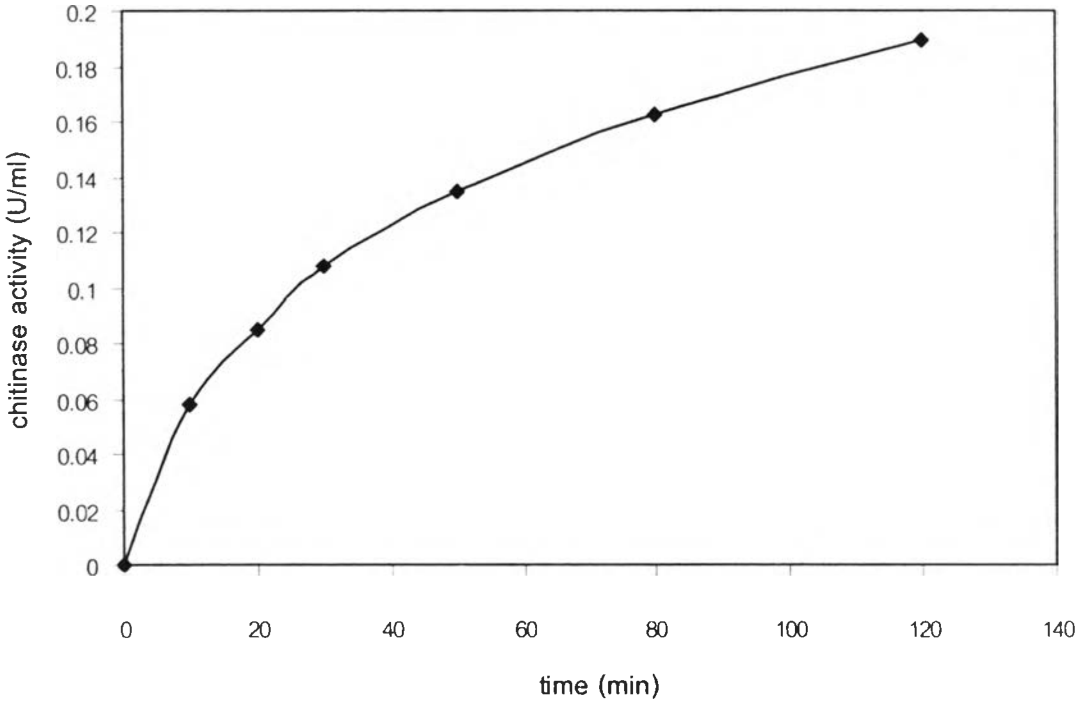
บ่มสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-12 (ภาคผนวกที่ 2 ข้อ 10.1-10.8) โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร ตามวิธีทำในข้อ 3.7.4 นำไปวัด pH สุดท้ายได้เป็น 3.03-12.01 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 6 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6 (pHสุดท้ายได้เป็น 6.11-6.30) นำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เปรียบเทียบผลกับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุด (pH 6) ผลการทดลองแสดงใน รูปที่ 17 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรเป็นช่วงกว้างระหว่าง pH 5-12 โดยมีความเสถียรสูงสุดที่ pH 6 และสูญเสียแอคติวิตีเมื่อเป็นกรดมาก (pH 3) ที่ pH 4 แอคติวิตีเหลือเพียง 65 เปอร์เซ็นต์

4.6.5. ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

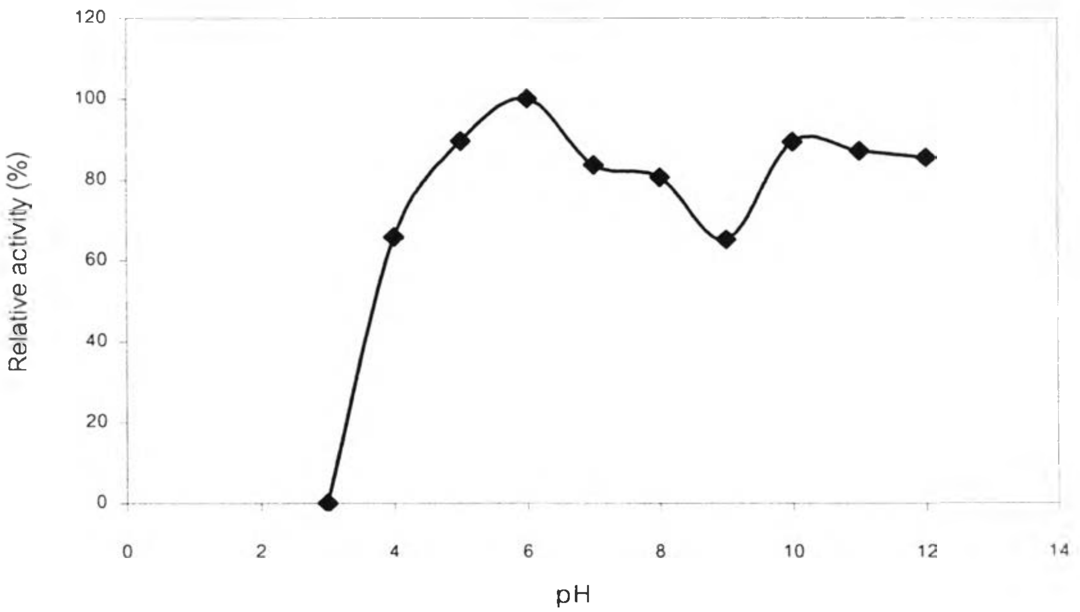
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25-90องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.7.4 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส และความเสถียรของเอนไซม์จะลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และตั้งแต่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสขึ้นไปเอนไซม์ไม่เสถียร ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 18



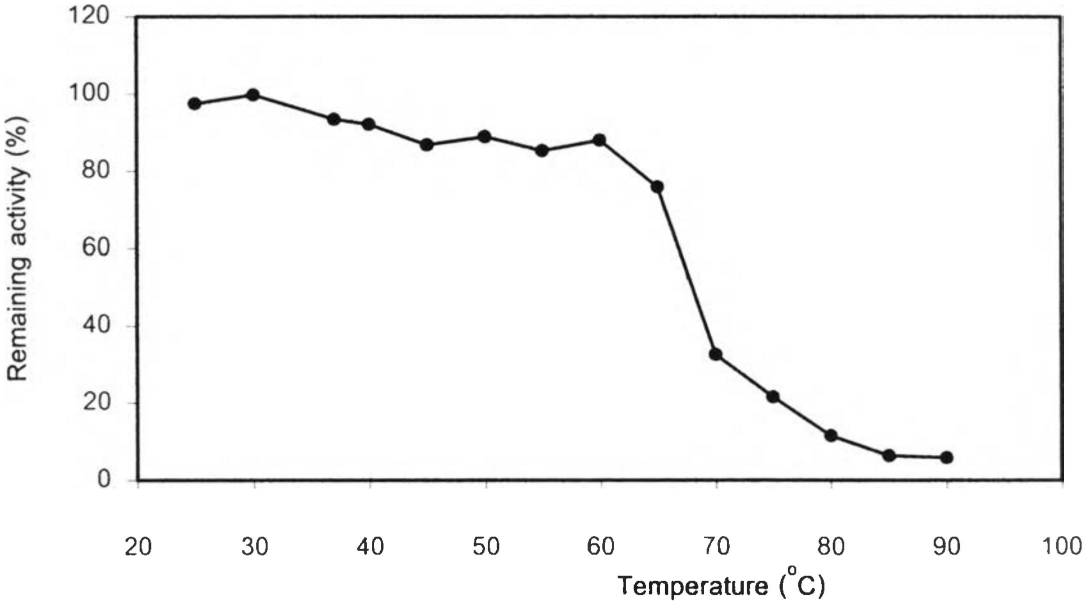
รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยทำตามวิธีทำในข้อ 3.7.2 (n=3)



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



รูปที่ 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



รูปที่ 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

4.6.6. ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ ของไคทิเนส

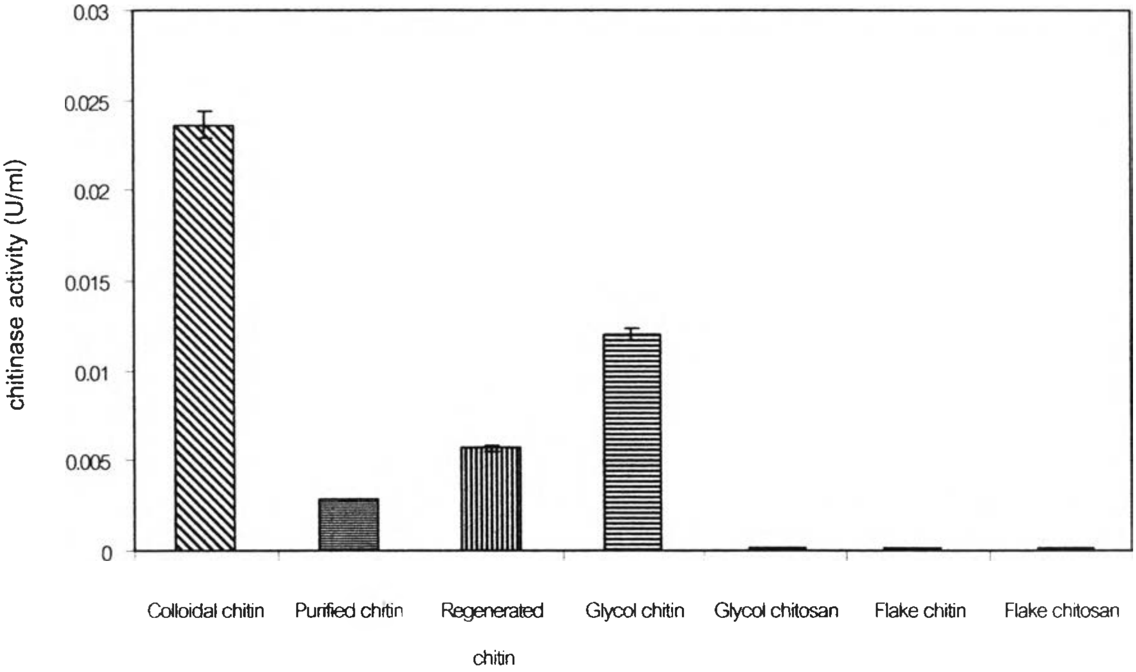
บ่มสารละลายเอนไซม์ในสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ คอลลอยดัลไคทิน ไคทินผงบริสุทธิ์ รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไกลคอลไคโตแซน ไคทินผงไม่บริสุทธิ์ ไคโตแซน วัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 3.2 ในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 4.6.1.-4.6.3. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 19 พบว่าไคทิเนสสามารถย่อยคอลลอยดัลไคทินได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ไกลคอลไคทิน (50 เปอร์เซ็นต์) รีเจนเนอเรทเทดไคทิน (24 เปอร์เซ็นต์) ไคทินผงบริสุทธิ์ (12 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อยไกลคอลไคโตแซน ไคทินผงไม่บริสุทธิ์ และไคโตแซนได้

4.6.7. ผลการตรวจสอบชนิดของไคทิเนสโดยวิธีการใช้สับเสตรทที่มีสี

บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารละลาย 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 ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของ N-acetyl--β-D-glucosaminidase chitobiosidase หรือ exochitinase และ endochitinase ตามลำดับ ตามวิธีทำในข้อ 3.7.6 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 พบว่าไคทิเนสที่เตรียมได้ เป็นชนิด chitobiosidase และ endochitinase ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.44 และ 0.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่มีแอคติวิตีของ N- acetylglucosaminidase

4.6.8. ผลการศึกษาผลของไอออนบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการบ่มสารละลายเอนไซม์กับไอออนชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้ววัดแอคติวิตีตามวิธีทำในข้อ 3.2 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นที่ไม่ได้เติมไอออน ตามวิธีทำในข้อ 3.7.7 ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่า $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $MnCl_2$ และ $HgCl_2$ สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สมบูรณ์ $CaCl_2$ และ $FeCl_2$ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้มาก และ $MgCl_2$ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย (100, 99.4, 98, 96 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

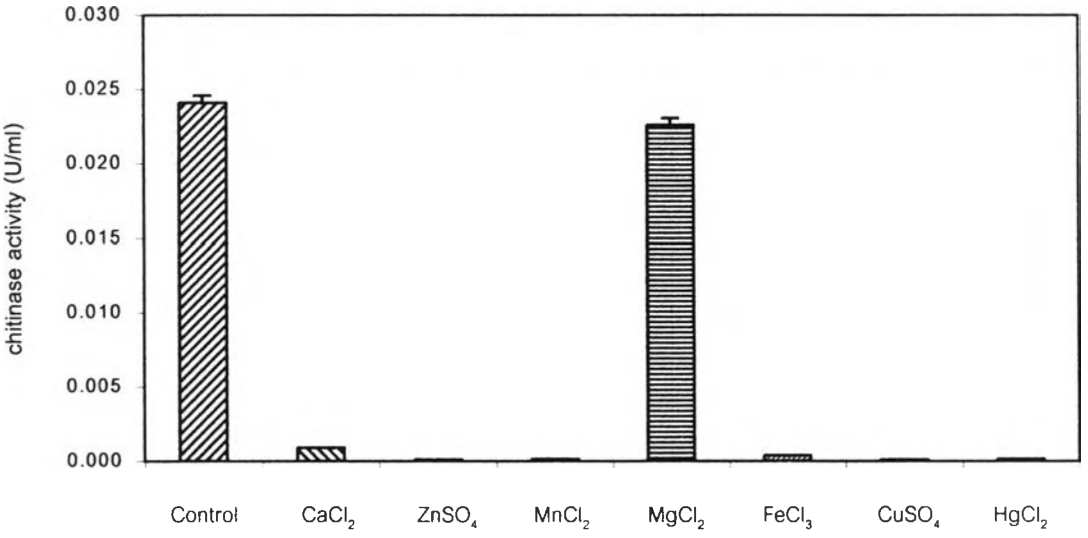


รูปที่ 19 ผลการศึกษาความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนกับสับสเตรทชนิดต่างๆ (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (n=3)

ตารางที่ 3 ความจำเพาะของไคทิเนสจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ต่อ p-nitrophenyl chitooligosaccharides

Substrate	Activity (U/ml)
p-nitrophenyl-β-D-N-acetyl-glucosaminide	0.00±0.00
p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetyl-glucosaminide	0.44±0.00
p-nitrophenyl-β-D-N,N',N"-triacetyl-glucosaminide	0.42±0.05

หมายเหตุ 1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิด p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ทำการทดลองตามวิธีทำข้อ 3.7.6 (n=3) โดยใช้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อวัดด้วยวิธีมาตรฐาน (ข้อ 3.2)



รูปที่ 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)