บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตไคทิเนสของ *Bacillus cereus* ในอาหารเลี้ยงที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นส่วนประกอบ จะพบว่าเชื้อจะเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากเลี้ยงเชื้อไปนาน 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดหลังจากเลี้ยงเชื้อไปนาน 32 ชั่วโมงและแอคติวิตีจะคงตัวหลังจากนั้นดังในรูปที่ 5 และรูปที่ 6 และผลการทดลองที่ได้จะมีทั้งส่วนที่เหมือนและแตกต่างจากของมณีรัตน์ มีพลอย (2542) โดยของมณีรัตน์ มีพลอยนั้นจะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 32 และจะมีแอคติวิตีที่ค่อนข้างคงที่หลังจากนั้น แต่มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 32 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาจากเชื้อ *Bacillus cereus* CH พบว่าจะมีความสามารถในการย่อยคอลลอยดัลไคทินได้สูงสุดหลังจากเลี้ยงเชื้อไปนาน 32 ชั่วโมง (Mabuchi และคณะ, 2000) อยู่ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับที่ได้จากผลการทำวิจัยในที่นี้และหลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์ก็จะเริ่มลดลง แต่รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อในการศึกษาของ Mabuchi และคณะ เชื้อ *Bacillus cereus* CH เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งเร็วกว่าในการทำวิจัยในที่นี้และผลที่ได้จากของมณีรัตน์ มีพลอย ในการทดลองนี้เมื่อตรวจวัดแอคติวิตีของไคทิเนสเปรียบเทียบกับการเจริญพบว่าเซลล์ผลิตไคทิเนสออกมาก่อนที่จะสังเกตเห็นการเพิ่มของจำนวนเซลล์ซึ่งอธิบายได้ว่าการหลั่งไคทิเนสมีความจำเป็นเพื่อที่จะนำคอลลอยดัลไคทินไปใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย

จากการวิเคราะห์ผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีคอลลอยดัลไคทิน 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ และให้แหล่งคาร์บอนเป็นอะซิเตทที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ เพิ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อดังรูปที่ 7 และรูปที่ 8 พบว่าเชื้อจะสังเคราะห์ไคทิเนสได้สูงสุดในอาหารที่เสริมด้วยอะซิเตทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อไปนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งจะสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 1.67 เท่า ในขณะที่การเติมอะซิเตทความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่เมื่อดูรูปแบบการเจริญพบว่าการเติมอะซิเตทเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้มีผลต่อการเจริญ แต่ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อเติมอะซิเตทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งตรงกับผลการทดลองใน *Bacillus stearothermophilus* (Sakai และคณะ, 1994) ซึ่งพบว่าการให้อะซิเตทเป็นแหล่งคาร์บอนจะช่วยเพิ่มการผลิต exochitinase ให้มากขึ้น นอกจากนี้มีรายงานว่าการเติมเพคตินและคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus pabuli* K1 จะมีผลไปเพิ่มผลผลิตของไคทิเนส (Frandberg และ Schnurer, 1994) จึงน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปถึงสาเหตุการเพิ่มแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยสารเหล่านี้

การศึกษาวิจัยในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์นี้เป็นการวิจัยต่อจากนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยซึ่งได้ทำการสกัดแยกและทำไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์โดยนำเอนไซม์อย่างหยาบไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยดิสค์-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของไคทิเนส 2 แถบ และเมื่อนำมาทำเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสจะพบแถบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสทั้งหมด 5 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตัน ซึ่งแสดงว่าไคทิเนสที่ได้จากการนำไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินยังไม่บริสุทธิ์ (มณีรัตน์, 2542) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการวิจัยต่อจากงานที่นางสาวมณีรัตน์ มีพลอยได้ทำไว้ เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์จาก *Bacillus cereus* โดยได้เพิ่มขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์โดยนำเอนไซม์อย่างหยาบไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสซึ่งเป็นคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุชนิดลบ คอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทำการทดลองในการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลแบบไม่เสียสภาพพบแถบแอคติวิตี 2 แถบกว้างในทุกขั้นตอน ผลการทดลองที่ได้นี้จึงคาดว่ามีไคทิเนสอย่างน้อย 2 ชนิดที่มีประจุสุทธิ์แตกต่างกันหลังจากผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน จากผลการย้อมสีโปรตีนด้วย silver พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ แต่พบแถบแอคติวิตี 2 แถบ ดังในรูปที่ 12 สาเหตุที่ไม่พบแถบโปรตีนของเอนไซม์อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ได้อาจจะมีปริมาณน้อยแต่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงจึงเห็นแถบแอคติวิตีแต่ไม่พบแถบโปรตีนหรือเนื่องมาจากการย้อมแอคติวิตีมีความไวกว่าการย้อมโปรตีน การทำบริสุทธิ์โดยรีเจนเนอเรทเทดไคทินอาศัยการดูดซับระหว่างเอนไซม์กับรีเจนเนอเรทเทดไคทินที่มีความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง Molano และคณะ (1997) มีรายงานการทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์รีเจนเนอเรทไคทิน ได้แก่ การแยกไคทิเนสจากเชื้อ *Piromyces communis* OTS1 มีผลให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 6.09 เท่า (Sakurada และคณะ, 1997) และพบว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อไคทิเนสโดยจะจับกับ domain ของเอนไซม์ที่ใช้สำหรับจับกับไคทิน (Hashimoto และคณะ, 2000) ส่วนในเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ไม่มีผลการทดลองเนื่องจากไม่ปรากฏทั้งแถบแอคติวิตีและแถบโปรตีน จึงทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าเอนไซม์ที่ได้บริสุทธิ์หรือไม่ และจากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเสียสภาพในเอนไซม์อย่างหยาบพบว่ามีแถบแอคติวิสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (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 คำนวณน้ำ

หนักโมเลกุลได้เท่ากับ 33.3, 20.3 และ 16.2 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในการทำบริสุทธิ์ไคทิเนสโดยการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 จะพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวและเป็นแถบสีจางแต่ไม่สามารถย้อม Fluorescent Brightener 28 ได้ จึงไม่ได้แสดงผลและเรายังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนเจลฟิลเตรชันบริสุทธิ์หรือไม่ เนื่องจากไม่สามารถย้อมสีแอคติวิตีของไคทิเนสจึงไม่สามารถบ่งชี้เรื่องเอนไซม์ได้ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ซึ่งเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินนำมาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเสียสภาพพบแถบโปรตีนเพียง 2 แถบแต่มีแถบแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างน้อยที่เห็น 3 แถบและเป็นแถบที่ไม่ตรงกับแถบที่ย้อมติดสีโปรตีน แสดงว่ายังมีไคทิเนสอยู่อย่างน้อย 3 ชนิดและมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นแม้จะเห็นโปรตีนเพียงแถบเดียวในเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 แต่ก็อาจมีแถบแอคติวิตีมากกว่า 1 แถบได้และแถบโปรตีนที่เห็นในขั้นตอนฟิลเตรชันในรีเจนเนอเรทเทดไคทินคอลัมน์ตรงกับแถบโปรตีนที่ไม่ใช่ไคทิเนสด้วย ดังนั้นจึงควรมีการทดลองทำบริสุทธิ์เอนไซม์ตามขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ดังกล่าวใหม่อีกครั้งและปรับปรุงปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ให้เหมาะสม และควรทำการย้อมโปรตีนที่ได้ด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ดูเพื่อแก้ไขปัญหาโปรตีนที่อาจมองไม่เห็นเพราะเป็นไกลโคโปรตีน และจากผลการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 ซึ่งได้เท่ากับ 24.9 กิโลดาลตัน ดังในรูปที่ 11 ซึ่งใกล้เคียงกับขนาด 20.3 กิโลดาลตันในพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเสียสภาพ อาจเกิดเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์นั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่เสียสภาพผลของขนาดที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโมเลกุลของเอนไซม์ทรงกลม แต่การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเสียสภาพขนาดโมเลกุลที่ได้จะเป็นเอนไซม์ที่เสียสภาพโดยจะมีการทำลายพันธะภายในและระหว่างสายโพลิเปปไทด์ ที่ทำให้โครงรูป 3 มิติเปลี่ยนไป นอกจากนี้ถ้าเอนไซม์ที่ได้เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งจะพบในการวิจัยของนางสาวมณีรัตน์ มีพลอย (2542) ว่าไคทิเนสที่ได้เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งเอนไซม์ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจะมีแนวโน้มที่เอนไซม์จะเกาะกับคอลัมน์ได้จึงทำให้เอนไซม์ออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่าปกติ ทำให้คำนวณขนาดของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน ดังนั้นผลการหาน้ำหนักของโมเลกุลที่ได้จากหลักการทั้งสองจึงอาจแตกต่างกันได้ ผลการทดลองของมณีรัตน์ มีพลอยเมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีขนาดโมเลกุล 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตัน ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาที่ได้จากการวิจัยนี้ซึ่งในขั้นตอนก่อนการทำดีอีเออีเซลลูโลส พบมีแถบแอคติวิตีทั้งหมด 6 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 89, 50.5, 43.4, 36, 31.4 และ 17.6 โดยจะเห็นได้ว่ามีไคทิเนสที่มีขนาด 89 และ 43.4 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับของมณีรัตน์ มีพลอย แต่เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสกลับพบแถบแอคติวิตีเหลือเพียง 1 แถบ คือขนาด 17.6 กิโลดาลตันโดยมีขนาดเล็กกว่าไคทิเนสของนางสาวมณีรัตน์ มีพลอย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอคติวิตีที่โหลดลงในเจลน้อยเกินไป ซึ่งเมื่อนำเอ็นไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน

พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีขนาดเพียง 16.2, 20.3 และ 33.3 กิโลดาลตันเท่านั้นซึ่งไม่ตรงกับแถบโปรตีนที่มีขนาดเพียง 17.6 กิโลดาลตัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นในหลาย ๆ ขั้นตอนอาจส่งผลให้หน่วยย่อยของเอนไซม์แยกออกจากกัน นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่พบในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่เสียสภาพโปรตีนที่ได้ส่วนใหญ่มีประจุเป็นลบมากกว่าเอนไซม์ที่ได้จากงานของมณีรัตน์ มีพลอย ดังนั้นจึงควรนำเอนไซม์ที่เกาะกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสมาทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสเพื่อเปรียบเทียบดูว่ามีไคทิเนสที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกับที่นางสาวมณีรัตน์ มีพลอยได้ทำการศึกษาไว้หรือไม่ มีรายงานว่าไคทิเนสที่มีขนาดเล็กอาจเกิดจากไคทิเนสที่มีขนาดใหญ่เกิดการย่อยสลายให้ไคทิเนสที่มีขนาดเล็กลงได้ โดยเกิด proteolysis ที่ปลาย C หรือที่ปลาย N ของไคทิเนส เช่น การเกิด proteolysis ที่ปลาย C ใน *Bacillus licheniformis* B-6839 (Trachuk และคณะ, 1996) *Bacillus licheniformis* X-7u, *Serratia marcescens, Serratia liquefaciens, Streptomyces plicatus, Streptomyces olivaceoviridis, Bacillus circulans* (Takayanagi และคณะ, 1991) และการเกิด proteolysis ที่ปลาย N ใน *Bacillus circulan* WL-12 (Watanabe และคณะ, 1992; Alam และคณะ, 1996) *Bacillus licheniformis* TP-1 (Tantimavanich และคณะ, 1998) ในงานวิจัยพบว่าหลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสแอคติวิตีรวมของเอนไซม์จะลดลงมาก (67 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากจะสูญเสียเอนไซม์ไปบางส่วนในเอนไซม์ส่วนที่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (11 เปอร์เซ็นต์) แอคติวิตีบางส่วนสูญเสียไปในช่วงการทำ dialysis ได้ (Hung และคณะ, 2002) อีกสาเหตุหนึ่งที่สำคัญคือมีโปรติเอสที่เจือปนในน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำลายเอนไซม์ Strongin และคณะ (1997) ได้รายงานว่า *Bacillus* หลายชนิดมีการหลั่งโปรติเอสและอะไมเลสออกมาหลายชนิดในน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นผลทำให้เอนไซม์ไม่เสถียรและเกิดการเสื่อมสลายได้ นอกจากนี้มีรายงานของ Trachuk และคณะ (1996) พบว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus licheniformis* B-6839 ตรวจพบโปรติเอสที่คล้ายกับ subtilisin และ โปรติเอสที่มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนกลูตามิกกับแอสปาติก งานวิจัยนี้ไม่ได้เติมสารยับยั้งแอคติวิตีของโปรติเอส พวกแบคทีเรียและราจะพบไคทิเนสที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 30-120 กิโลดาลตัน (Koga และคณะ, 1999) ใน *Bacillus* ส่วนใหญ่มีไคทิเนสขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 30-70 กิโลดาลตัน (Basha และคณะ, 2002; Mabuchi และคณะ, 2000; Pleban และคณะ, 1997; Sakai และคณะ, 1994; Sakai และคณะ, 1998;Takayanagi และคณะ, 1991; Thamthiankul และคณะ, 2001; Trachuk และคณะ, 1996; Wen และคณะ, 2002; Wiwat และคณะ, 1999;) นอกจากนี้ยังพบพวกที่มีขนาดเล็กประมาณ 10-20 กิโลดาลตัน ใน *Bacillus amyloliquefaciens* V656 (Wang และคณะ, 2002) และ *Bacillus stearothermophilus* CH-4 (Sakai และคณะ, 1994)

ในการทำดีอีเออีเซลลูโลส ดังในรูปที่ 9 จะพบว่ามีไคทิเนสทั้งส่วนที่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสและไม่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส โดยการทำดีอีเออีเซลลูโลสใช้สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ในส่วนที่ไม่เกาะกับคอลัมน์น่าจะมีประจุบวกซึ่งค่า pI ของเอนไซม์น่าจะมากกว่า 7.4 และเอนไซม์ส่วนที่จับกับคอลัมน์ซึ่งน่าจะมีประจุลบที่ pH 7.4 เพราะฉะนั้น pI ของเอนไซม์ในส่วนนี้น่าจะน้อยกว่า pH 7.4 จึงทำให้เอนไซม์มีประจุเป็นลบ

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของไคทิเนสที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 จะสามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 เมื่อใช้คอลลอยดัลไคทินเป็นสับสเตรทดังในรูปที่ 14 ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์อย่างหยาบที่ทำการศึกษาโดยนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยซึ่งจะพบว่าเอนไซม์อย่างหยาบทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ส่วนของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากของนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยนั้นมี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 แตกต่างจากไคทิเนสที่ได้ทำการศึกษาในการทดลองนี้ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 60 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 15 ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์อย่างหยาบที่ศึกษาโดยนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยแต่แตกต่างจากเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินซึ่งทำโดยนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส Koga และคณะ (1999) รายงานว่าไคทิเนสที่ได้จากจุลชีพส่วนใหญ่จะมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3.5-8 ซึ่งค่าที่ได้จะขึ้นกับสับสเตรทที่ใช้ เช่น ถ้าใช้ไกลคอลไคทินเป็นสับสเตรทค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์มักอยู่ในช่วงที่เป็นด่างเป็นต้น ไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus* spp. จะมีช่วง pH ที่เหมาะสมค่อนข้างกว้างโดยอยู่ในช่วง pH 4.5-9.5 คือมีทั้งพวกที่ทำงานได้ในสภาพที่เป็นด่างหรือกรดขึ้นกับแหล่งของเอนไซม์ เช่น ไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus cereus* CH จะมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 5 - 7.5 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50-60 องศาเซลเซียส (Mabuchi และคณะ,2000) ใน *Bacillus licheniformis* B-6839 มีจะมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 4.5-5.5 และ 9.0-9.5 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 90 และ 70 องศาเซลเซียส (Trachuk และคณะ, 1996) เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้น่าจะมีประจุบวกในบัฟเฟอร์ pH 7.4 เนื่องจากเป็นส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสดังนั้นเอนไซม์ที่ได้น่าจะมี pI มากกว่า 7.4

การศึกษาความเสถียรของไคทิเนสที่ได้พบว่าไคทิเนสที่ได้มีความเสถียรในช่วง pH 5-12 และพบว่าเอนไซม์เสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์เมื่อนำเอนไซม์ไปบ่มที่ pH 3.0 นาน 3 ชั่วโมงดังในรูปที่ 17 แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้ค่อนข้างเสถียรในช่วงที่เป็นด่างมากกว่าในช่วงที่เป็นกรด ซึ่งจะมีผลซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์บางส่วนซึ่งทำโดยนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยซึ่งมีความเสถียรของเอนไซม์ในช่วง pH 4 - 10 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ

ต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์ไคทิเนสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์นี้มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 25-60 องศาเซลเซียสดังในรูปที่ 18 โดยแอคติวิตีจะเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (30 เปอร์เซ็นต์) มีรายงานว่าไคทิเนสที่ได้จากพืชและได้จาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งพบที่บ่อน้ำพุร้อนเป็นเอนไซม์ที่ทนร้อน (Thermostable) มีความต้านทานต่ออุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ที่ได้จากแมลงจะไม่ค่อยมีความเสถียรเมื่อมีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นไคทิเนสที่ได้จากแมลงจึงไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง (Koga และคณะ, 1999) และพบว่าเอนไซม์ที่มีขนาดเล็กส่วนใหญ่จะค่อนข้างเป็นเอนไซม์ที่ทนร้อน (Wang และคณะ, 2002; Sakai และคณะ, 1994)

ผลการทดสอบการย่อยของเอนไซม์กับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์ที่ได้สามารถย่อยคอลลอยดัลไคทินได้ดีที่สุด รองลงมาคือไกลคอลไคทิน รีเจนเนอเรทเทดไคทิน และไคทินผงบริสุทธิ์ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อยไคทินผงไม่บริสุทธิ์ ไกลคอลไคโตแซนและไคโตแซนได้ดังรูปที่ 19 ซึ่งน่าจะบ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่ได้มีความจำเพาะกับหมู่ acetamido ในไคทินสูงโดยดูได้จากเอนไซม์ที่ได้สามารถย่อยไคทินและอนุพันธ์ของไคทินได้แต่ไม่สามารถย่อยไคโตแซนและอนุพันธ์ของไคโตแซนได้เลย ส่วนที่เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถย่อยไคทินผงไม่บริสุทธิ์นั้นคาดว่าอาจเป็นเพราะในไคทินผงไม่บริสุทธิ์นั้นจะมีไอออนต่าง ๆ ปนอยู่มากในไคทินผงไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงอาจไปมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ได้โดยดูได้จากผลการทดลองพบว่าไอออนทุกชนิดที่นำมาทดสอบล้วนมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ กล่าวคือที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนใน Ca^{2+} และ Fe^{2+} สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เกือบสมบูรณ์ (98-99 เปอร์เซ็นต์) แต่ Mg^{2+} มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อย (6 เปอร์เซ็นต์) ดังในรูปที่ 20 แต่ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของไอออนที่ใช้ในการทดสอบนี้ค่อนข้างสูง Sakurada และคณะ (1996) พบว่าสารหรือไอออนส่วนใหญ่ที่มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (1 มิลลิโมลาร์) แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นมากขึ้น (10 มิลลิโมลาร์) ก็จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ดังนั้นถ้ามีการศึกษาต่อไปจึงควรศึกษาด้วยว่าถ้าลดความเข้มข้นของไอออนที่ใช้ทดสอบลง ไอออนต่าง ๆ จะมีผลต่อเอนไซม์เป็นอย่างไร โลหะหนักส่วนใหญ่จะไปทำให้โปรตีนเสียสภาพเนื่องจากการไปทำลาย salt bridge นอกจากนี้มีในรายงานว่า Ag^{+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของไคทิเนสโดยไอออนทั้งสองจะไปมีผลกับบริเวณที่มี SH group ของเอนไซม์ (Hung และคณะ, 2002;) Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Piromyces communis* OTS1 ได้สมบูรณ์ และ Cu^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ (Sakurada และคณะ, 1996) เอนไซม์ที่ได้จาก *Serratia plymuthica* HRO-C48 ซึ่งศึกษาโดย Frankowski และคณะ (2001)

ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} แต่ Ca^{2+}, Co^{2+} และ Mn^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าไคทิเนสที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* K-187 ถูกยับยั้งแอคติวิตีอย่างมากด้วย Mn^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (Wang และ Chang, 1997) ซึ่งคล้ายกับที่ได้จากผลการทดลอง พบว่า Zn^{2+}มีผลยับยั้งแอคติวิตีของไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* B-6839 ได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตี โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ (Trachuk และคณะ, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองนี้ ใน *Bacillus stearothermophilus* Ba^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} และ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนส Fe^{2+}, Ca^{2+} และ Zn^{2+} มีผลเพิ่มแอคติวิตีของไคทิเนส ส่วน Mn^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีของไคทิเนส เมื่อใช้ความเข้มข้นของไอออนต่าง ๆ เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ (Sakai และคณะ, 1994) นอกจากนี้มีรายงานว่าไอออนบางชนิด เช่น Cu^{2+} อาจมีผลยับยั้งหรือกระตุ้นไคทิเนสก็ได้ขึ้นกับว่าไคทิเนสได้มาจากแหล่งใดและใช้ความเข้มข้นของ Cu^{2+} มากน้อยเพียงไร (Koga และคณะ, 1999)

จากการตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ที่ได้จากการวิจัยนี้สรุปได้ว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีของ chitobiosidase (exochitinase) และ endochitinase ในอัตราส่วน 1.07:1.00 โดยดูได้จากความสามารถในการย่อย p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose และ p-nitrophenyl-β-D-N,N'N"-triacetylchitobiose ซึ่งเป็น trimeric และ tetrameric analogs ของ NAG แต่ไม่พบแอคติวิตีของ N-acetylglucosaminidase เนื่องจากไม่สามารถย่อย p-nitrophenyl-β-D-N-acetylglucosaminide ได้ ส่วนงานที่ได้จากนางสาวมณีรัตน์ มีพลอย (2542) พบว่าไคทิเนสที่ได้เป็นชนิด chitobiosidase และ endochitinase เช่นเดียวกัน ซึ่งมีแอคติวิตีของ chitobiosidase และ endochitinase เท่ากับ 10.12 : 1.00 และไม่มีแอคติวิตีของ N-acetylglucosaminidase จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ได้จากนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยจะมีแอคติวิตีของ chitobiosidase สูงกว่า endochitinase และ ไม่มีแอคติวิตีของ N-acetylglucosaminidase เช่นกัน ใน *Bacillus* strain MH-1 (Sakai และคณะ, 1998) และ *Bacillus cereus* (Mabuchi และคณะ, 2000) ก็ได้รายงานไว้เช่นเดียวกันว่าเชื้อเหล่านี้สร้างไคทิเนสได้หลายชนิด ทั้งชนิดที่เป็น exochitinase และ endochitinase แต่สัดส่วนต่างกัน

การที่เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากของนางสาวมณีรัตน์ มีพลอยนั้นมีสมบัติบางประการแตกต่างจากไคทิเนสที่ได้ทำการศึกษาในการวิจัยนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้เป็นเอนไซม์คนละชนิดกันโดยดูจากขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ซึ่งแตกต่างกันและยังเป็นสารละลายผสมของไคทิเนสมากกว่า 1 ชนิด แตกต่างกันบ้างก็โดยเหตุที่มีสัดส่วนของเอนไซม์ที่ผสมกันอยู่ไม่เท่ากัน