บทที่ 3

ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

1. การแยกและคัดเทียบรา

จากตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อราบนอาหารวุ้นพีดีเอ ได้ราทั้งหมด 67 สายพันธุ์ พบราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น 41 สายพันธุ์ และมีผนังกั้น 26 สายพันธุ์ เมื่อนำมาคัดเทียบความสามารถของราที่ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก โดยวิธี rapid test จากราทั้งหมด 67 สายพันธุ์ที่แยกได้ พบว่ามีรา 26 สายพันธุ์ ที่ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวก โดยให้สีของปฏิกิริยาเป็นสีม่วงแดง หรือสีม่วงเข้มชัดเจน เมื่อเทียบกับราที่ไม่ให้ผลบวก ดังแสดงในรูปที่ 3 วิธีนี้เป็นการตรวจผนังเซลล์ราที่มีองค์ประกอบเป็นไคโตแซน (deacetylated chitin) และแสดงว่ามีเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส อยู่ด้วย ตามวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975) เช่นเดียวกับรายงานของ White และคณะ (1979) ได้ใช้วิธี rapid test ตรวจผนังเซลล์รา *M. rouxii* ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นไคโตแซน และเมื่อวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากราที่แยกได้ทั้งหมด โดยวิธีเปรียบเทียบสีจากปฏิกิริยา ซึ่งอยู่ในช่วงสีเขียว-น้ำเงิน ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4 พบราที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ให้แอคติวิตีแตกต่างกัน ดังในตารางที่ 1 ซึ่งแสดงผลปฏิกิริยาของเชื้อที่คัดเทียบได้จากวิธี rapid test และวิธีเปรียบเทียบสีเพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่า ราบางสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับวิธี rapid test แต่ไม่มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยวิธีเปรียบเทียบสี อาจเป็นเพราะเชื้อราบางชนิดที่เลี้ยงในอาหารเหลว ไม่สร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ขับออกมานอกเซลล์ หรือสร้างในปริมาณที่น้อย จึงไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

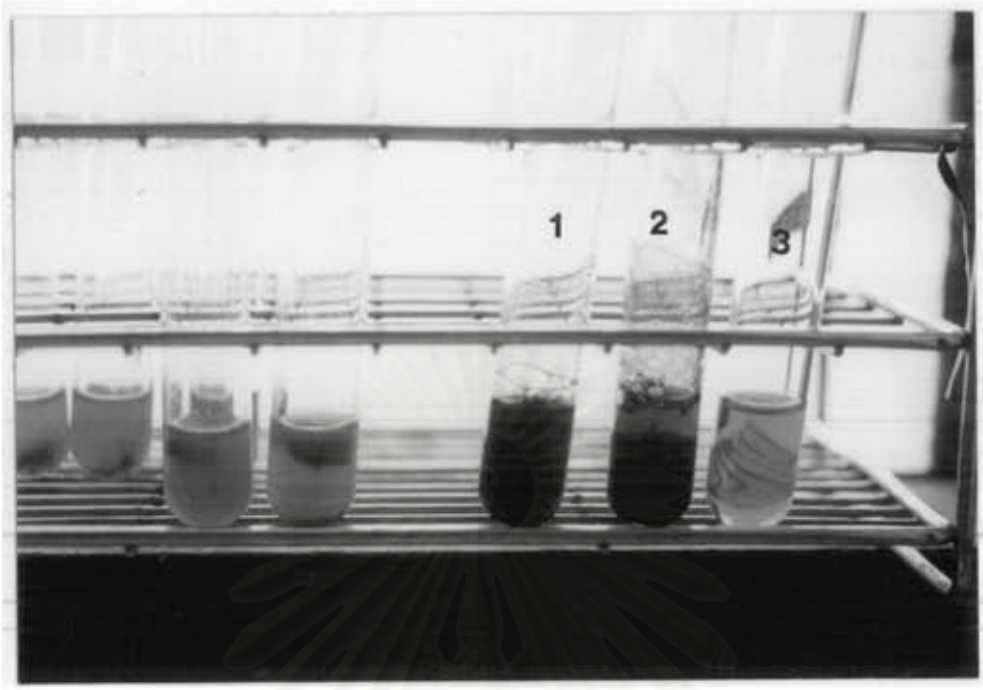
จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าราที่มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูง และมีผนังเซลล์เป็นไคโตแซนจากการทำ rapid test ส่วนใหญ่เป็นราที่จัดอยู่ใน Class Zygomycetes

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bartinicki-Garcia (1968) และพบว่ารา *Rhizopus* sp. ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดสมุทรปราการ ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส สูงสุดที่ 0.322 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร จึงเลือกใช้ราสายพันธุ์นี้เพื่อศึกษาการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในขั้นตอนต่อไป

2. การจำแนกเชื้อ

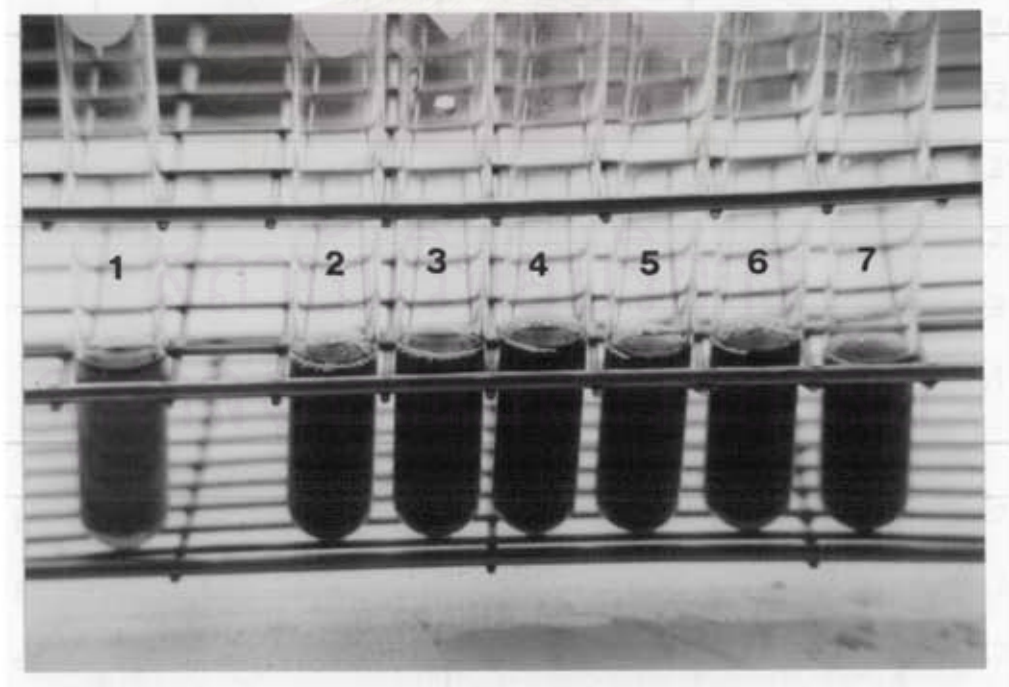
ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Rhizopus* sp. ที่แยกและคัดเทียบได้ มีเส้นใยสีขาวฟูในช่วง 2 วันแรก มีสปอร์ติดอยู่บนเส้นใย อายุ 2 วัน สปอร์มีสีเทา สปอร์มีสีเข้มขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อศึกษาลักษณะของเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น (non-septate) และมีไรซอยด์ (rhizoid) คล้ายรากพืช มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ซึ่งจะเกิดขึ้นตรงส่วนที่จะสร้างไรซอยด์ และบนสุดของก้านชูสปอร์ พบsporangiumมี columella เป็นรูปครึ่งวงกลม และมีสีเข้ม ภายในมีสปอร์ซึ่งเคลื่อนที่ไม่ได้ เรียกว่า sporangiospore ดังแสดงในรูปที่ 5 สปอร์มีหลายขนาดและหลายรูปร่าง โดยส่วนใหญ่มีลักษณะมีเหลี่ยมค่อนข้างกลมจนถึงลักษณะกลม มีลวดลายจาง ๆ บนสปอร์หรือเกือบไม่มี นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีการสร้าง chlamydospore อีกด้วย ดังแสดงใน รูปที่ 6 จากลักษณะดังกล่าว จึงจำแนกเชื้อที่ใช้ทดลอง คือ *R. oligosporus* NS_1 ตามลักษณะการจำแนกเชื้อในจีนัส *Rhizopus* ของ Inui และ Takeda (1965)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 วิธีตรวจสอบแบบรวดเร็ว (rapid test)

หลอด 1,2 ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก หลอด 3 ชุดควบคุม



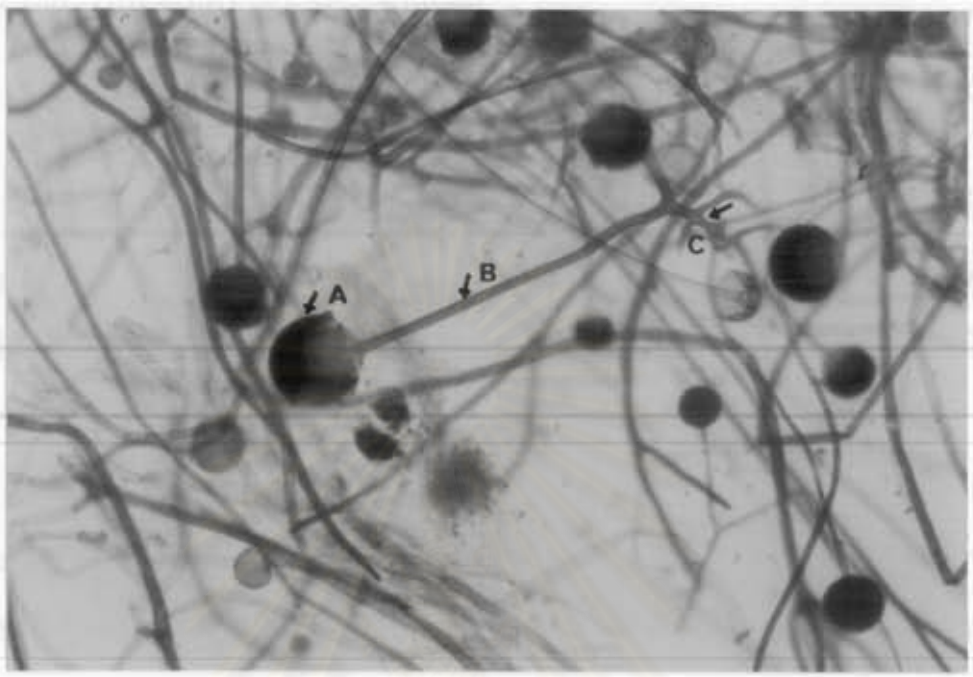
รูปที่ 4 วิธีเปรียบเทียบสี (colorimetric method)

1. ชุดควบคุม 2-7. เมื่อปฏิกิริยาเป็นบวก

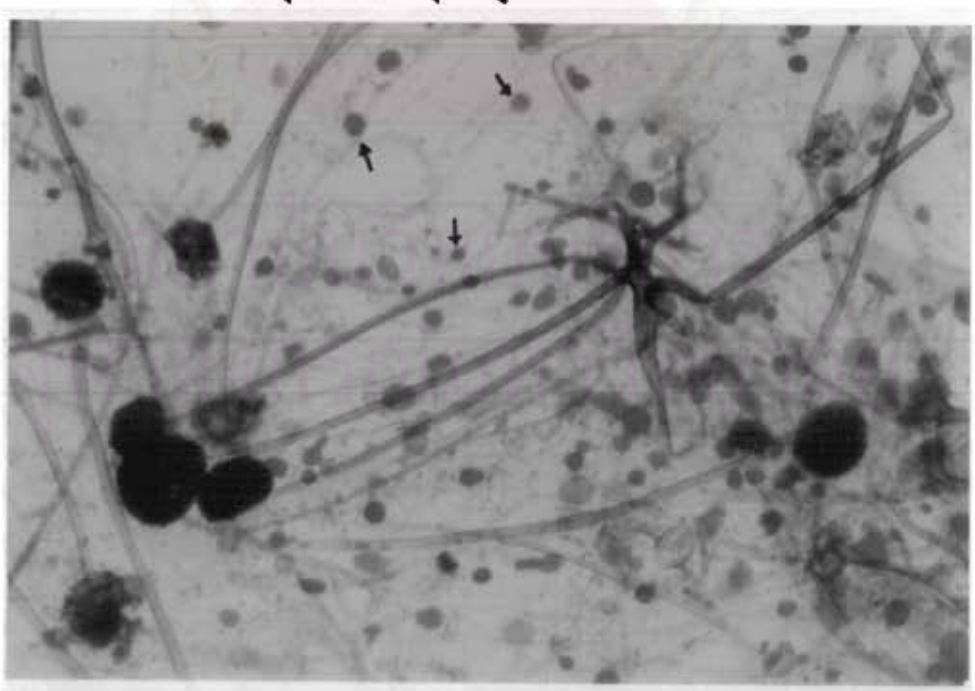
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบราที่แยกได้ และให้ผลบวกของปฏิกิริยาโดยวิธี rapid test และแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส (มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร) โดยวิธีเปรียบเทียบสี

ลำดับที่	แหล่งเชื้อและสถานที่	สกุลราที่แยกได้	Rapid test	แอคติวิตี
	ผลไม้			
1	มะม่วง	*Rhizopus* sp.	++	0.234
		Aspergillus sp.	+++	0.210
2	ฝรั่ง	*Rhizopus* sp.	++	0.186
	ลูกแป้งข้าวหมาก			
3	จ.ลพบุรี	*Mucor* sp.	++	0.236
		Rhizopus sp.	+++	0.214
4	จ.สมุทรปราการ	*Rhizopus* sp.	++++	0.322
5	จ.อุทัยธานี	*Aspergillus* sp.	++	0.194
		Rhizopus sp.	+	0.202
6	จ.อ่างทอง	*Mucor* sp.	++	0.240
		Rhizopus sp.	++	0.228
7	จ.นครปฐม	*Rhizopus* sp.	+++	0.286
8	จ.สมุทรสาคร	*Rhizopus* sp.	++	0.252
9	จ.กรุงเทพฯ	*Aspergillus* sp.	+++	0.220
	(สะพานใหม่)	*Rhizopus* sp.	+++	0.156
	ลูกแป้งเหล้า			
10	จ.ราชบุรี	*Rhizopus* sp.	+++	0.274
11	จ.นนทบุรี	*Rhizopus* sp.	++	0.230
12	จ.ลพบุรี	*Rhizopus* sp.	++	0.242
13	จ.กรุงเทพฯ (ลาดพร้าว)	*Aspergillus* sp.	+	0.170

*หมายเหตุ rapid test : เครื่องหมาย + แสดงถึงความเข้มของสีจากปฏิกิริยา



รูปที่ 5 Sporangium (A) Sporangiophore (B) และ Rhizoid (C) ของ *R. oligosporus* NS_1 (กำลังขยาย 20 เท่า) เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นพีดีเอ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 6 Chlamydospore ของ *R. oligosporus* NS_1 (กำลังขยาย 20 เท่า)

3. การเลี้ยงราเพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส

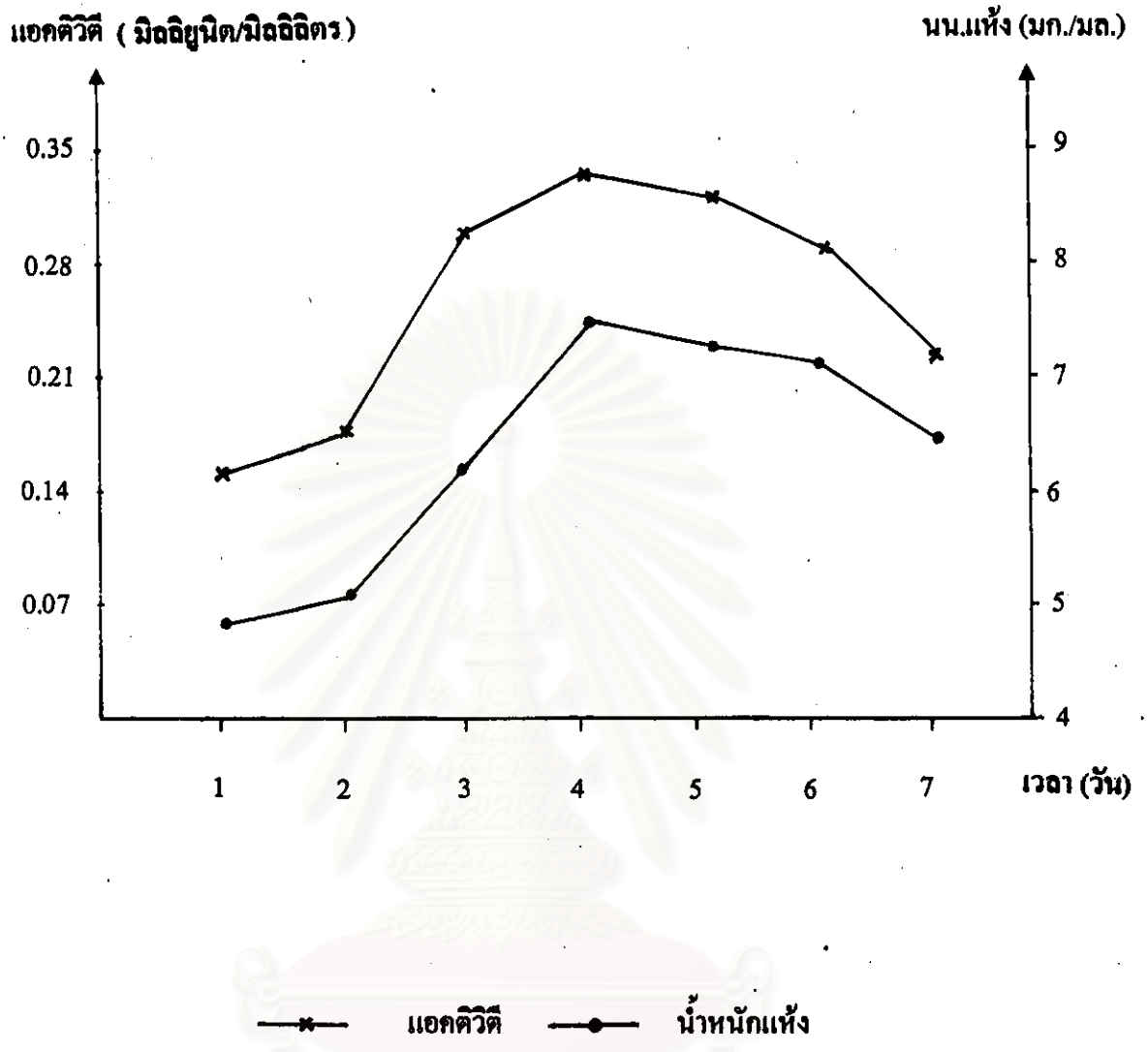
3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ที่คัดเทียบได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อวายพีจีที่ยังไม่ได้ปรับปรุง (Bartinicki-Garcia และNickerson, 1962) พบว่าเชื้อจะเจริญ และให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส สูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ในช่วงต้นของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 7

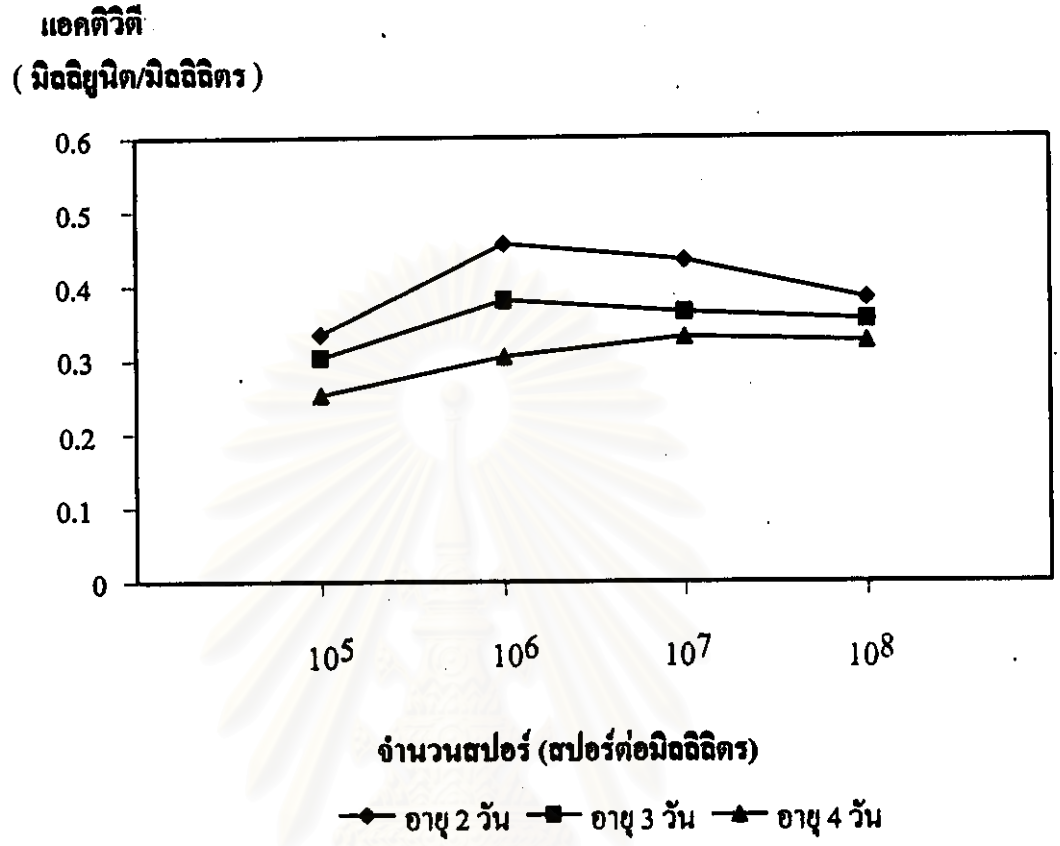
เลี้ยงเชื้อโดยแปรผันอายุสปอร์ของเชื้อในช่วง log phase 2-4 วัน และแปรผันจำนวนสปอร์ 10^5-10^8 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้อายุเชื้อตั้งต้น 2 วัน ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่าอายุ 3 และ 4 วัน ดังแสดงในรูปที่ 8 และพบว่าเมื่อใช้จำนวนสปอร์ของเชื้อตั้งต้น 10^6 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร จะให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.456 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนสปอร์ในช่วงใกล้ ๆ กันกับ รายงานของ Kafetzopoulos และคณะ (1993) ที่ใช้จำนวนสปอร์ของเชื้อ *M. rouxii* ในการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส เท่ากับ 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองต่อไป จึงใช้เชื้อตั้งต้น อายุสปอร์ 2 วัน และจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากอาหารสูตรวายพีจีของ Bartinicki และ Nickersen (1962) ใช้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของแหล่งคาร์บอน จึงได้มีการแปรผันโดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนต่างชนิด คือ กลูโคส ซูโครส แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ได้วัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุดเท่ากับ 0.466 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 7.562 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงผลการทดลองใน รูปที่ 9 จะเห็นได้ว่า เชื้อ *R. oligosporus* NS_1 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกชนิด โดยเฉพาะโพลีแซคคาไรด์ แสดงว่า เชื้อนี้สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งชนิดต่าง ๆ ได้



รูปที่ 7 การเจริญ และการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสของเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อวายพีจี



รูปที่ 8 ผลการแปรผันอายุเชื้อและจำนวนสปอร์ของเชื้อตั้งต้น ต่อแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1

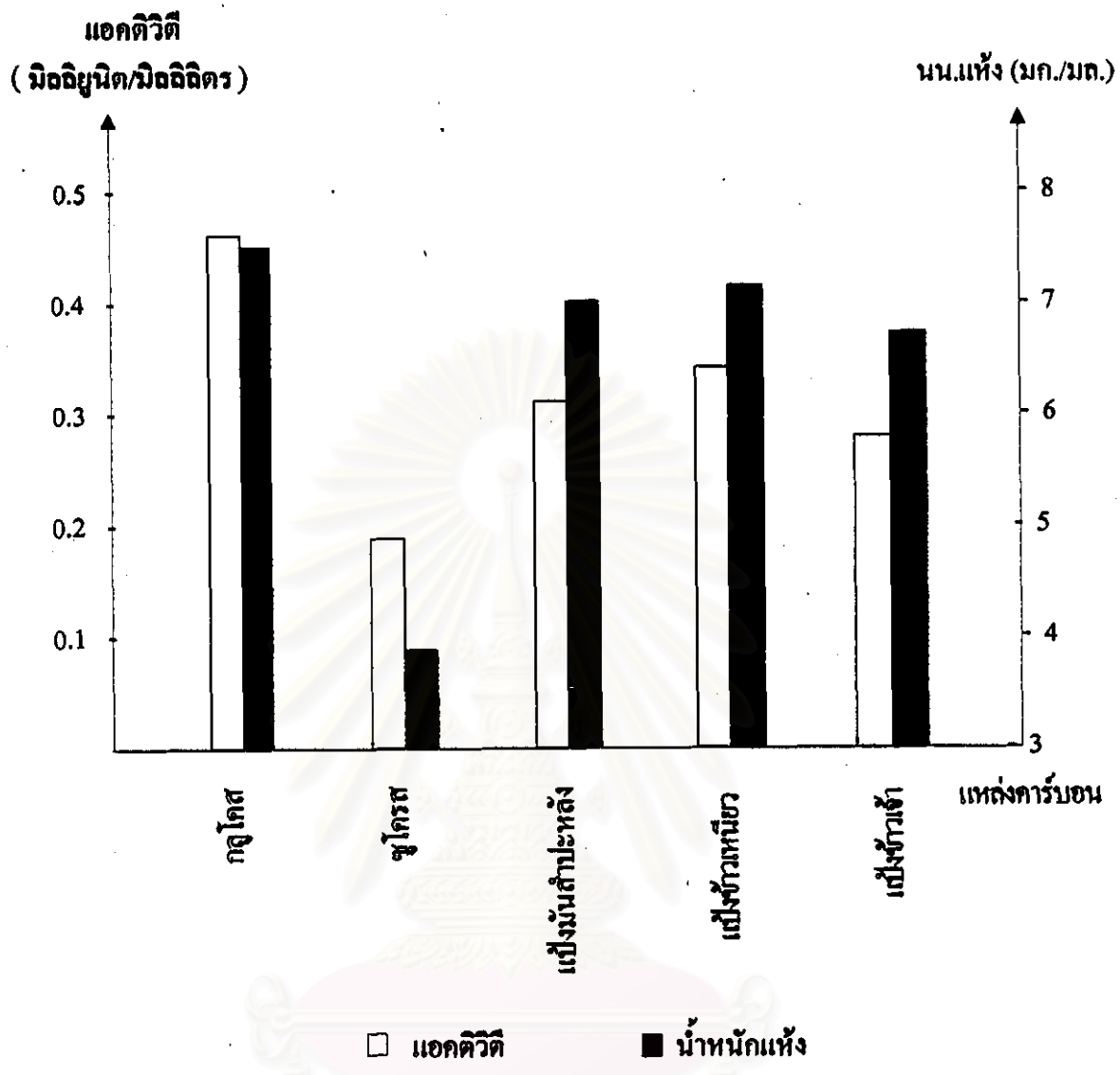
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อันได้แก่ เอนไซม์อะมิเลส (amylase) และเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อนี้แยกได้จากลูกแป้งในการผลิตเอนไซม์อะมิเลสและกลูโคอะมิเลส ซึ่งเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้งให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และกลูโคส ที่พร้อมจะนำไปใช้ได้ (ส่งศรี กุลปรีชา, 2521 ; นภาโลห์ทอง, 2535) โดยเชื้อสามารถใช้แป้งข้าวเหนียวได้ดี และให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งชนิดอื่น ๆ แต่จากการเลี้ยงเชื้อด้วยกลูโคส จะให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นจึงได้ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาต่อไป ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อและแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bartinicki - Garcia และ Nickerson (1962) พบว่า *M. rouxii* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อที่ใช้ศึกษา จะใช้น้ำตาลไดแซคคาไรด์อย่างซูโครส และแลคโตส ในการเจริญได้น้อย แต่จะสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้ดีอย่างเช่น กลูโคส และจากรายงานของ Araki และ Ito (1975) และ Davis และ Bartinicki - Garcia (1984) ได้ใช้สูตรอาหารวายพีจี ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *M. rouxii* เพื่อศึกษาการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ได้ผลดีเช่นกัน

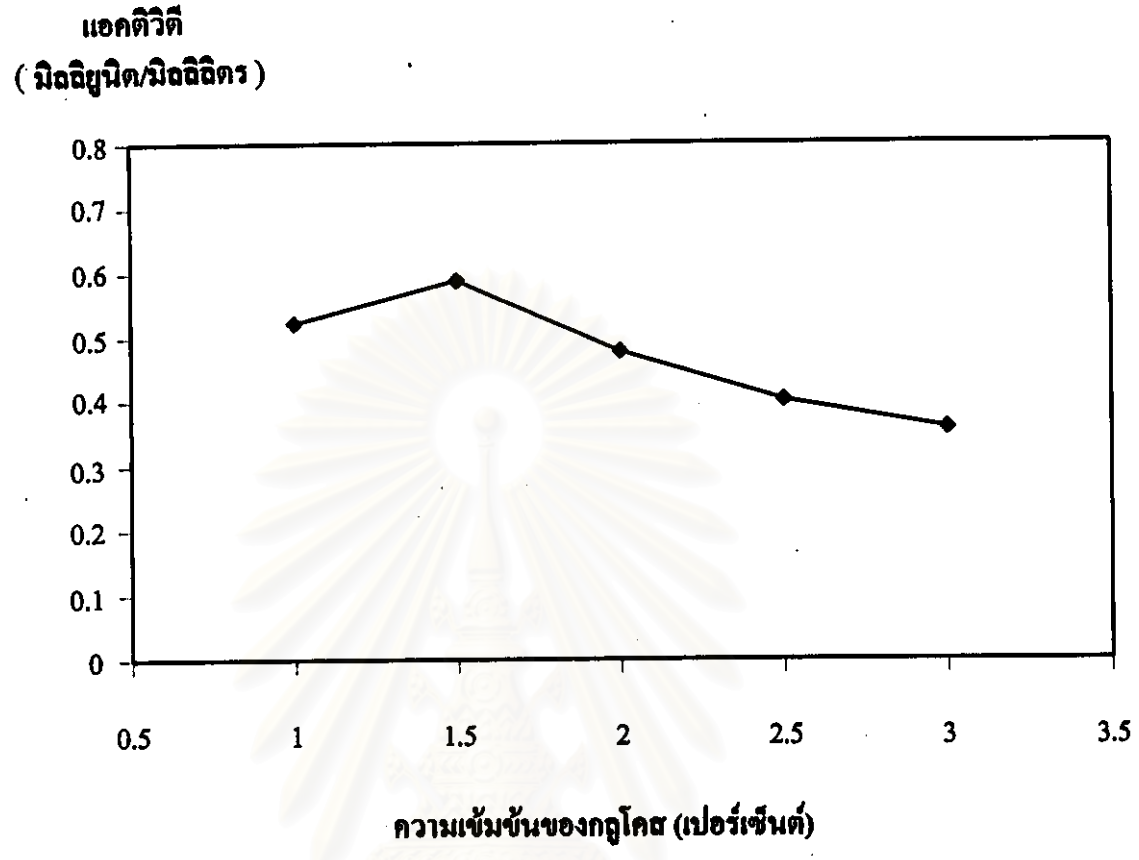
เมื่อนำกลูโคสมาแปรผันความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสได้สูงสุดที่กลูโคสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในรูปที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นของกลูโคสต่ำกว่าสูตรอาหารที่ยังไม่ได้ปรับปรุง 0.5 เปอร์เซ็นต์ และจะใช้กลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของอาหารเหลวสูตรวายพีจีในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้น 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แบคโตเปปโตน โพลีเปปโตน และกรดคาซามิโน พบว่าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีแบคโตเปปโตน ความเข้นข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุด เท่ากับ 0.878 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 11 เปปโตนเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งเป็นโปรตีนสาย



รูปที่ 9 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ในอาหารที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อ *R. oligosporus* NS_1



รูปที่ 10 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส ในช่วง 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน – ดีอะเซทิลเลส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

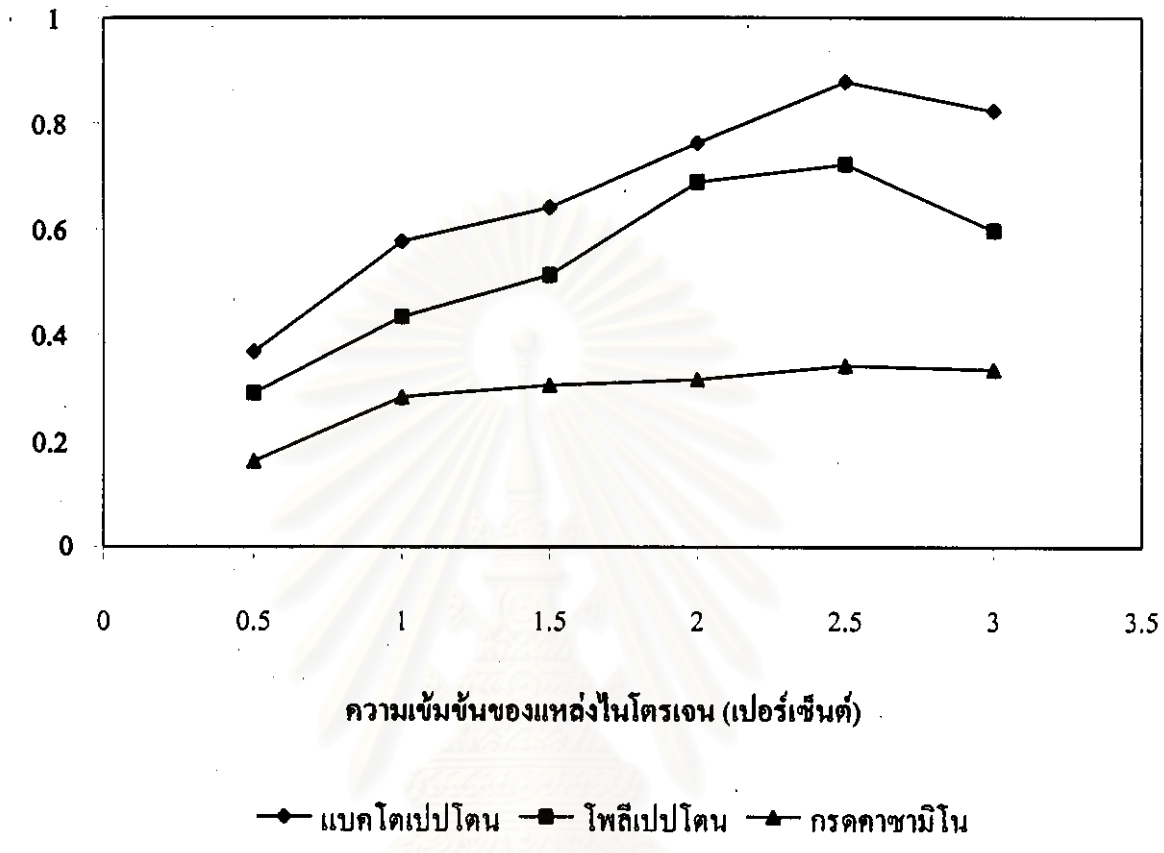
สั้น ๆ สามารถละลายน้ำได้ และไม่ตกตะกอนเมื่อถูกความร้อน (Robert , 1997) จากผลการทดลองในรูปที่ 12 เห็นได้ว่าเชื้อสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียได้ดีกว่ารูปไนเตรท ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jenning (1995) กล่าวว่าเชื้อราบางชนิดจะใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย หรืออินทรีย์ไนโตรเจน แต่จะไม่ใช้ในรูปไนเตรท ตัวอย่างเช่น *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus nigricans* และ*R. oryzae* เป็นต้น ดังแสดงในภาคผนวก จ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าไนโตรเจนแหล่งอื่น ๆ ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน ดังนั้นจึงเลือก แบคโตเปปโตน ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหารวายพีจี เพื่อศึกษาขั้นต่อไป ในขณะที่การผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *M. rouxii* ใช้โพลีเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ(Kafetzopoulos และคณะ,1993) และใน *A. coerulea* ใช้โพลีเปปโตน 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Goa และคณะ, 1995)

3.4 ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์

ได้ใช้สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ ในช่วง 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ ในผลการทดลอง ดังรูปที่ 13 พบว่าแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส สูงสุดที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *M. rouxii* (Kafetzopoulos และคณะ, 1993) และ *A. coerulea* (Goa และคณะ, 1995) จะใช้สารสกัดจากยีสต์ในความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

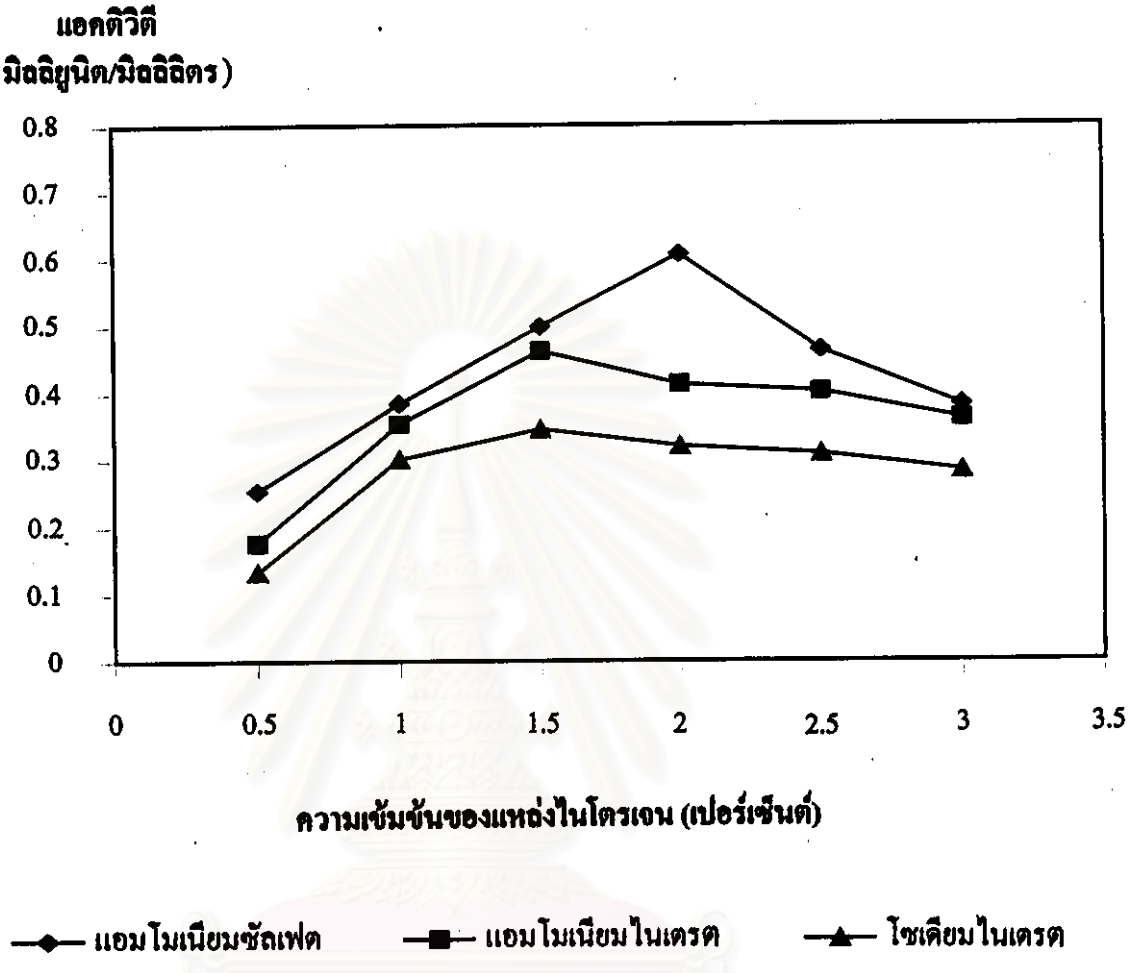
3.5 ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลจากการแปรผัน pH ตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ได้ปรับปรุง ในช่วง pH 3-8 ได้ผลการทดลองดังในรูปที่ 14 จะเห็นว่าแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จะสูงในช่วง pH ของอาหาร 4.5-5.5 ซึ่งโดยทั่วไปราจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ค่อนข้างเป็นกรด และแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.928 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 5.0 ส่วน pH สูงหรือต่ำกว่า ในช่วงที่ pH เป็นกรด

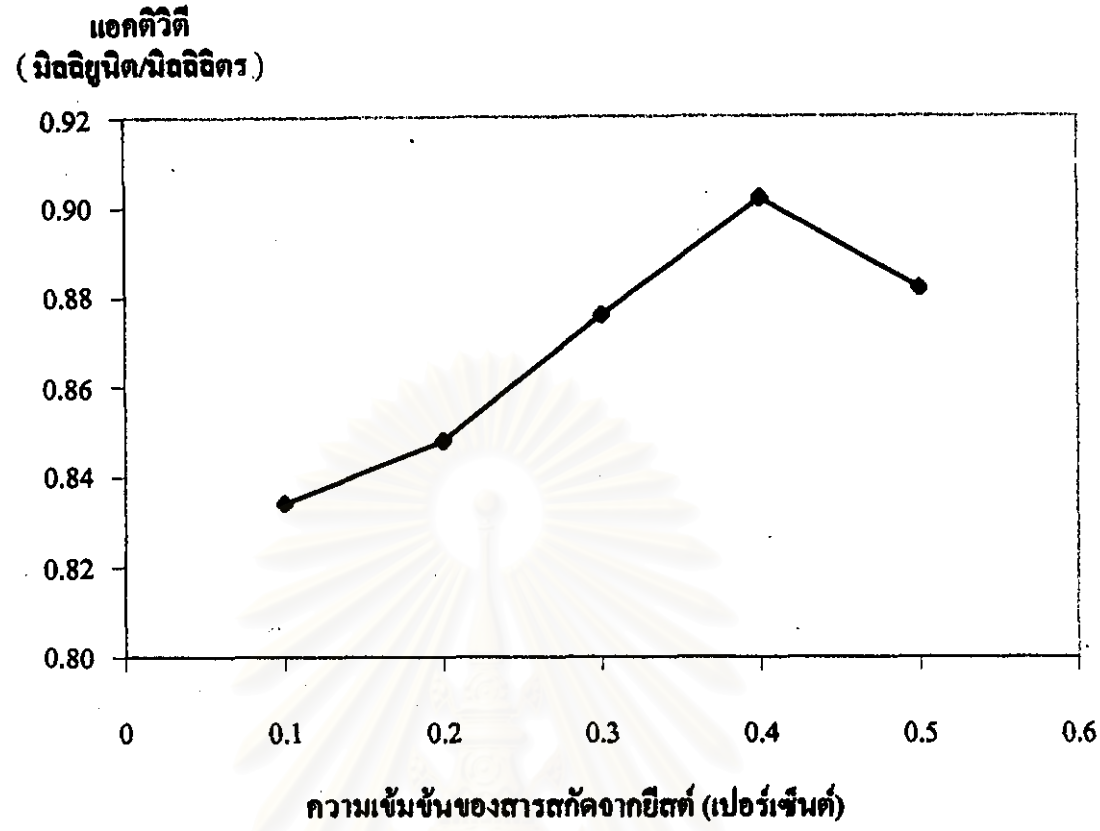


รูปที่ 11 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วันที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5 - 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 13 การแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบแอคติวิตีของ ไดติน-ดีอะเซทิลเลส โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

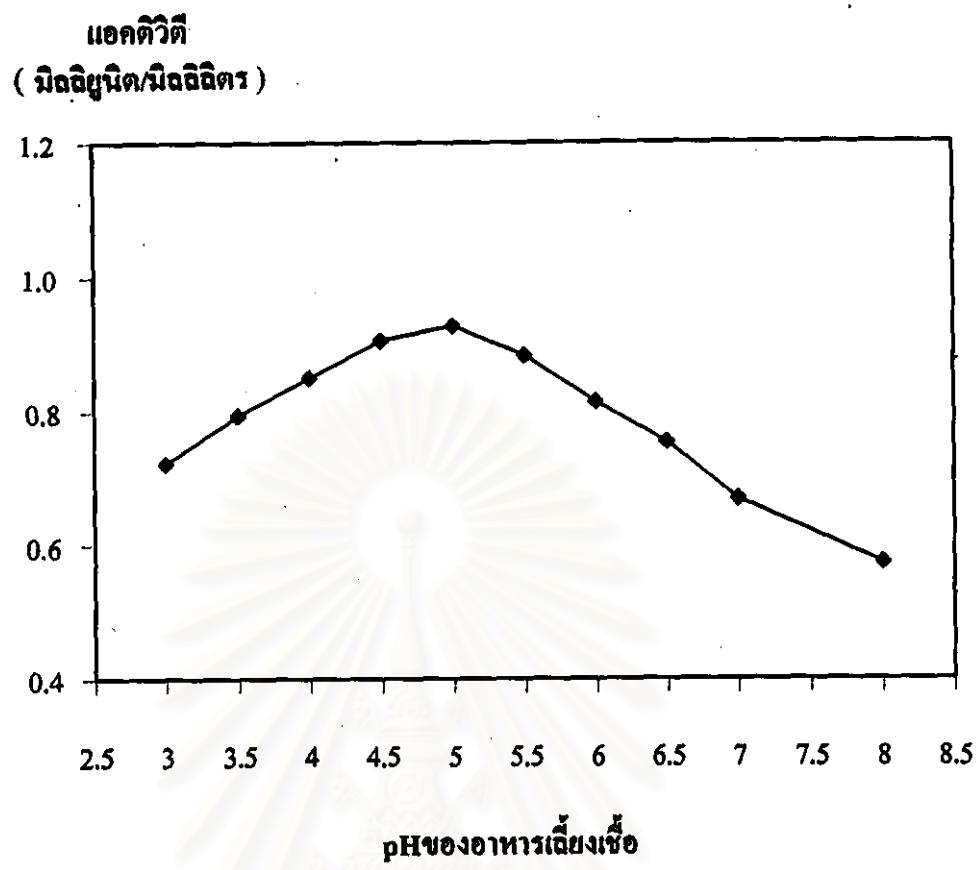
ยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ที่ pH เป็นกลางหรือด่างจะพบแอคติวิตีต่ำลงเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่น โดยเลี้ยงเชื้อ *M. rouxii* และ *A. coerulea* ที่ pH ต่ำ ได้แก่ pH 4.5 (Kafetzopaulos และคณะ, 1996 ; Goa และคณะ, 1995) และสำหรับเชื้อ *C. lindemuthianum* เลี้ยงที่ pH 5.8 (Tokuyasu และคณะ, 1996) เพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 ซึ่งให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

3.7 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ได้ปรับปรุง โดยปรับ pH เริ่มต้น เท่ากับ 5.0 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 25 30 35 40 45 50 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุดเท่ากับ 0.942 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเท่ากับ 0.938 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิห้องในการเลี้ยงเชื้อต่อไป จากผลการทดลองที่ได้มีผลใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* โดยเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียส (Kafetzopoulos และคณะ, 1993) และใช้เลี้ยงรา *A. coerulea* ที่ 25 องศาเซลเซียส (Goa และคณะ, 1995) เพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส

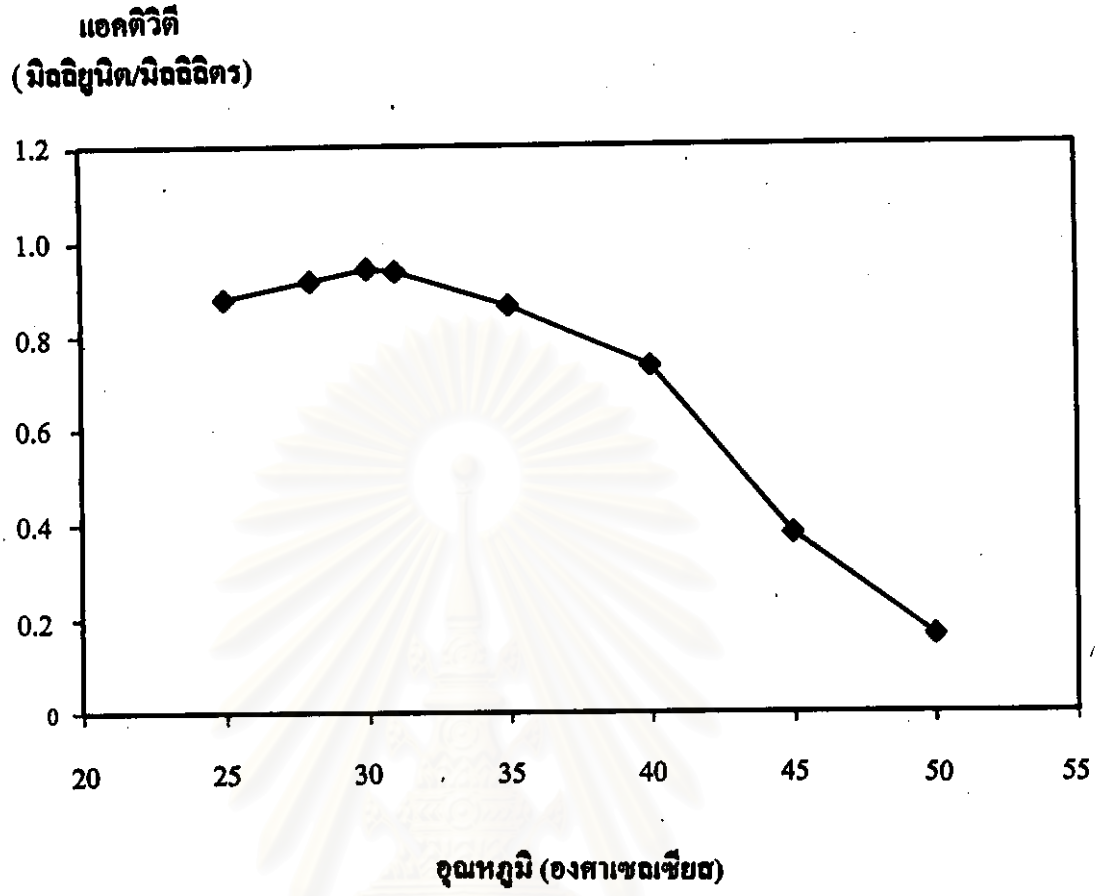
3.8 ความเร็วรอบของการเขย่า

เลี้ยงรา *R.oligosporus* NS_1 ในอาหารเหลว บนเครื่องเขย่าเพื่อเพิ่มอากาศที่ความเร็วรอบต่างกัน คือ 100-250 รอบต่อนาที จากผลการทดลองดังในรูปที่ 16 พบว่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที จะให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุดเท่ากับ 0.936 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็วสูงขึ้น เป็น 200 และ 250 รอบต่อนาที แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำลง ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อ *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนอยู่น้อย (microaerophilic condition) (นภา,2535) และอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อต้องการอากาศในขณะที่ผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสไม่มากนัก แต่เมื่อใช้ความเร็ว 100



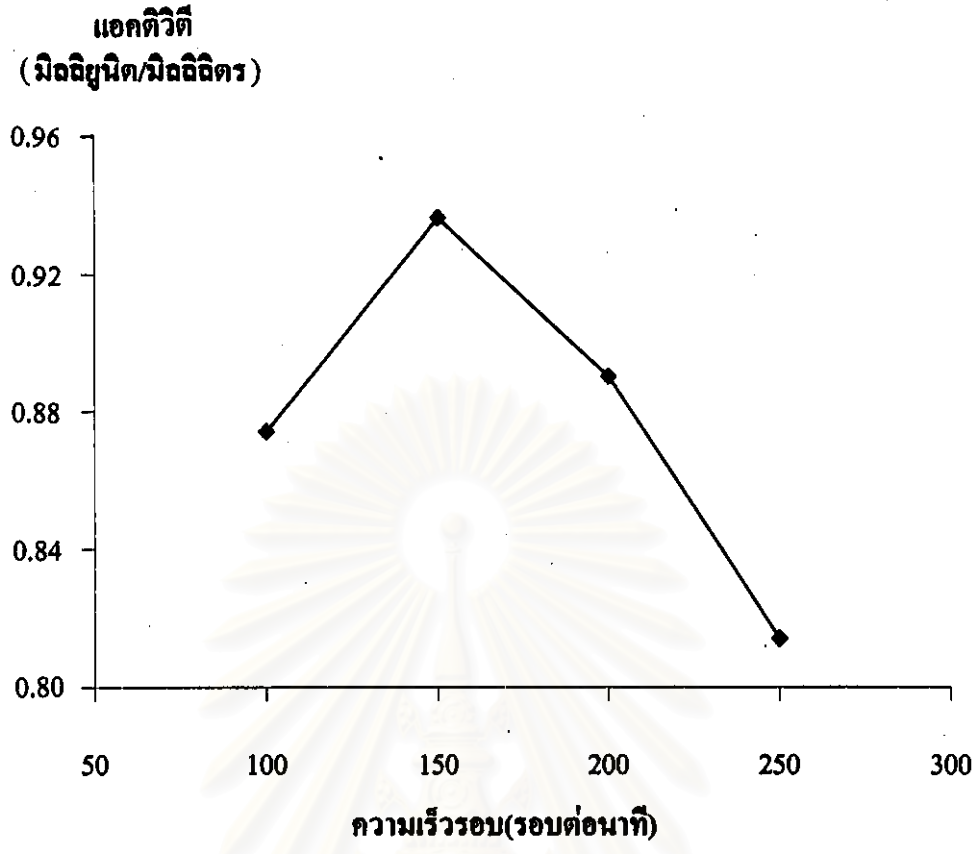
รูปที่ 14 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง ในช่วง pH 3-8 และบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 25-50 องศาเซลเซียส และบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับปรุงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

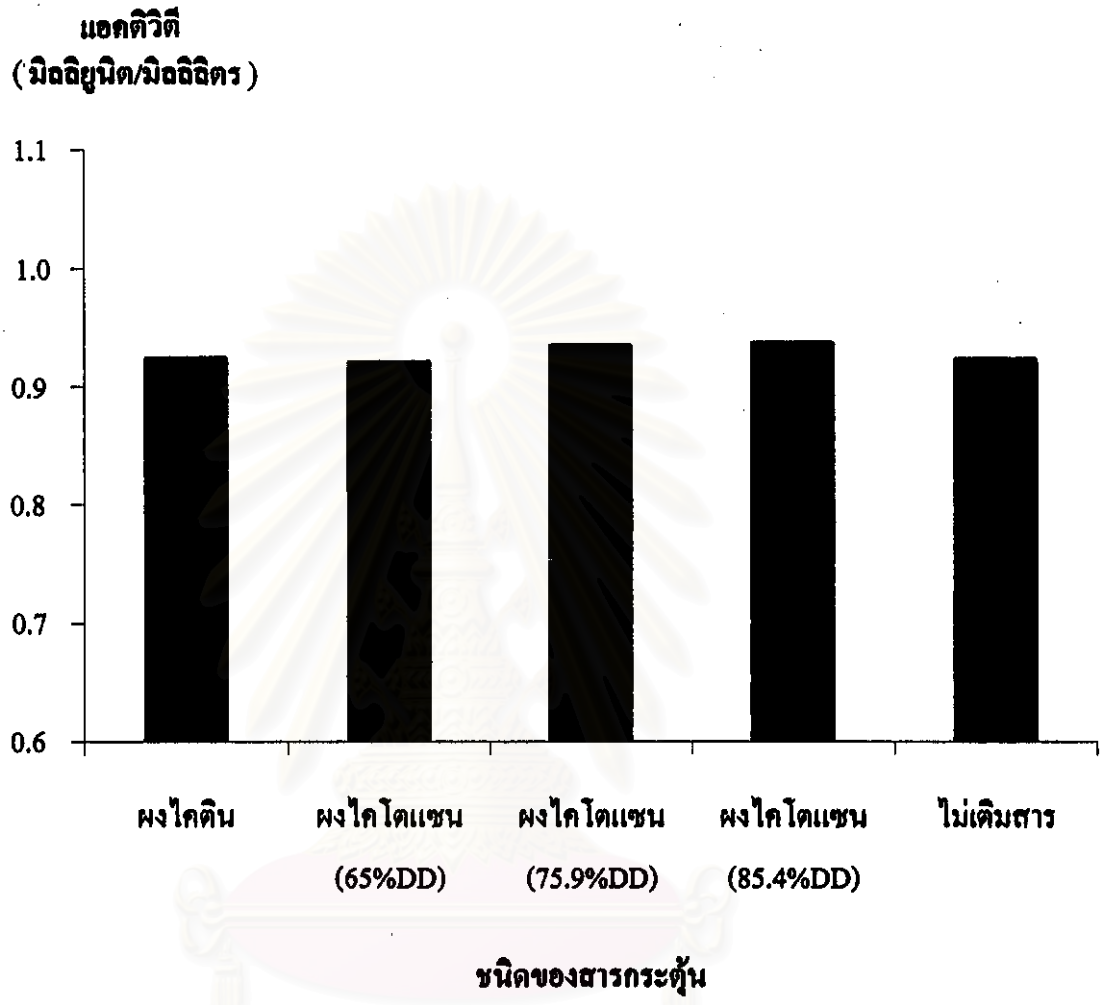
รอบต่อนาที แอคติวิตีกลับลดลง . ดังนั้นความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่จะใช้ในขั้นต่อไป เท่ากับ 150 รอบต่อนาที

4. การเติมสารบางชนิดเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์

จากการทดลองใช้ผงไคติน และผงไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์ดีอะเซทิลเลชั่นต่าง ๆ เป็นสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ โดยเติมสารกระตุ้นแต่ละชนิดในอาหารเหลวสูตรปรับปรุง ด้วยความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว เปรียบเทียบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส กับอาหารที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว จากผลการทดลองพบว่าไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 และ 85.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้เล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบที่ไม่ได้เติมสาร ส่วนผงไคตินและไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 65 เปอร์เซ็นต์ จะได้ผลแอคติวิตีไม่แตกต่างกับที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 17 จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อสามารถสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลสได้อยู่แล้ว โดยไม่ต้องอาศัยสารกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งสารกระตุ้นที่ใช้บางชนิดทำหน้าที่เป็นสับสเตรท ดังนั้นจึงไม่เติมสารต่างๆ ดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไป จากรายงานที่เลี้ยงเชื้อ *M. rouxii* *A. coerulea* และ *C. lindemuthianum* เพื่อผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส จะไม่มีการเติมสารกระตุ้นใด ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน (Kafetzopoulos และคณะ, 1993 ; Goa และคณะ, 1995 ; Tokuyasu และคณะ, 1996)

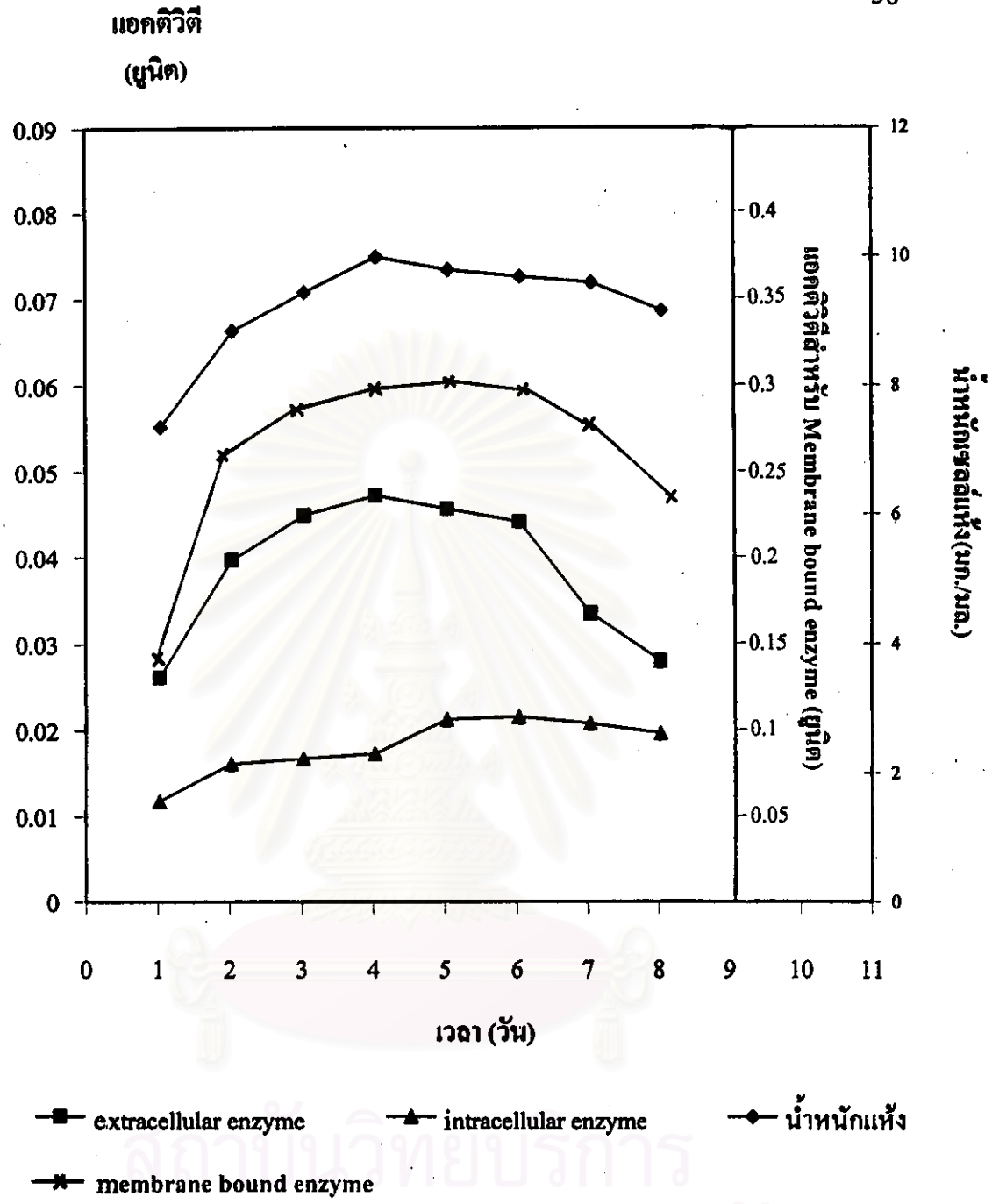
5. แหล่งการสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส กับการเจริญของเชื้อ

จากผลการทดลอง ในรูปที่ 18 ได้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน และตรวจหาแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากแหล่งการสร้าง 3 แหล่ง คือ จากเอนไซม์ส่วนที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) จากเอนไซม์ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และเอนไซม์ส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound enzyme) พบว่าการเจริญของเชื้อสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 8 วัน และในขณะเดียวกัน



รูปที่ 17 ผลการเติมสารบางชนิด เพื่อกระตุ้นการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง เปรียบเทียบกับเมื่อไม่เติมสาร

ได้พบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ส่วนที่เป็น extracellular enzyme สูงสุดเช่นกัน โดยได้แอคติวิตีเท่ากับ 0.0474 ยูนิต หลังจากวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อแอคติวิตีจะค่อย ๆ ลดลง แสดงให้เห็นว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลสในส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์ ถือว่าเป็น primary metabolism ซึ่งถูกขับออกมาในช่วง exponential phase จากนั้น จะค่อย ๆ ลดลง เอนไซม์ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ จะพบแอคติวิตีน้อยกว่า ในส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์ และส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากผลการทดลองจะพบแอคติวิตีในส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลของการตรวจพบตำแหน่งของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ในส่วนช่องว่างเพอริพลาสมิค จากเชื้อ *A. coerulea* (Goa และ คณะ, 1995) แต่ในการทดลองครั้งนี้ แอคติวิตีที่วัดได้ จากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าสูงมาก ซึ่งเป็นค่าที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองได้ใช้กากเซลล์หลังการบดให้เซลล์แตก มาเป็นแหล่งของเอนไซม์ โดยไม่ได้แยกส่วนของเอนไซม์ออกจากผนังเซลล์เสียก่อน ที่ผนังเซลล์มีองค์ประกอบของไคโตแซน และ หมู่ amine จากไคโตแซนนี้ เป็นส่วนที่ไปรบกวนการตรวจสอบหาแอคติวิตีโดยวิธีเปรียบเทียบสี ดังนั้นในการศึกษาไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ควรมีขั้นตอนการแยกเอนไซม์ออกจากผนังเซลล์ให้ละเอียดมากกว่านี้ จากการทดลองพบว่าแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสจาก *R. oligosporus* NS_1 ในส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์มีค่าสูงกว่าจากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ และคาดว่าจากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะมีแอคติวิตีสูงที่สุด ในเชื้อต่างชนิด จะพบไคติน-ดีอะเซทิลเลสจากส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์ จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ และจากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ในสัดส่วนที่ต่างกัน ดังเช่น ในรายงานของ Davis และ Bartinicki - Garcia (1984) ได้ศึกษาไคติน-ดีอะเซทิลเลส ใน *M. rouxii* พบว่ามีเอนไซม์จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าจากส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์ที่พบรองลงมา คือ 37 เปอร์เซ็นต์ และ พบเอนไซม์ในส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่พบในเชื้อ *C. lindemuthianum* และ *C. lagenarium* จากส่วนที่ถูกขับออก



รูปที่ 18 น้ำหนักเซลล์แห้งและแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular enzyme) จากส่วนสกัดจากเซลล์ (intracellular enzyme) และจากส่วนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound enzyme) โดยการเลี้ยงเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 เป็นเวลา 8 วัน ในอาหารสูตรปรับปรุงและเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม

มานอกเซลล์สูงกว่าส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยเฉพาะ *C. lindemuthianum* จะพบอยู่ในส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์สูงกว่าถึง 25 เท่า (Siegrist และ Kauss, 1990)

6. การสกัดเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสให้บริสุทธิ์

6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) เพื่อแยกเส้นใยออก และนำมาตกตะกอนโปรตีน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 55-85 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 2.92 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 42.3 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2

และจากการทดลองสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา ในการศึกษาการสกัดเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสให้บริสุทธิ์ในขั้นแรกจากรา *A. coerulea* และ *M. rouxii* ใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 60-85 เปอร์เซ็นต์ (Goe และ คณะ 1995 ; Davis และ Bartinicki - Garcia, 1984) และจากเชื้อ *C. lindemuthianum* ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 63-80 เปอร์เซ็นต์ (Tokuyasu, 1996)

6.2 การทำโครมาโตกราฟี แบบ แอนไอออนเอ็กซเชนจ์

การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อมานี้ เพื่อกำจัดโปรตีนที่มีประจุตรงข้ามกับโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนบางชนิดที่มีความแรงของประจุแตกต่างกับเอนไซม์มากๆออกไปอีกด้วย จากการชะโปรตีนที่จับอยู่กับ DEAE anion exchanger ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน

จากการนำเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 55-85 เปอร์เซ็นต์ มาผ่านคอลัมน์ซึ่งมีตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุเป็นลบ DEAE - cellulose ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อที่ 10.2 ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 19 พบว่าเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสจะผ่านคอลัมน์ออกมา ในช่วงลำดับส่วนที่ 74-80 โดยการชะ

ตารางที่ 2 สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการสกัดเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	โปรตีนรวม (mg)	แอคติวิตีรวม (mU)	แอคติวิตีจำเพาะ (mU/mg)	ปริมาณเอนไซม์ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารสกัดเริ่มต้น	1,570	5741.2	1451.8	0.25	100	1
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 55-85%	40	844.3	614.7	0.73	42.3	2.92
DEAE-cellulose	20	70.5	183.2	2.60	12.6	10.4
Sephadex G-75	24	16.2	97.4	6.01	6.7	24.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

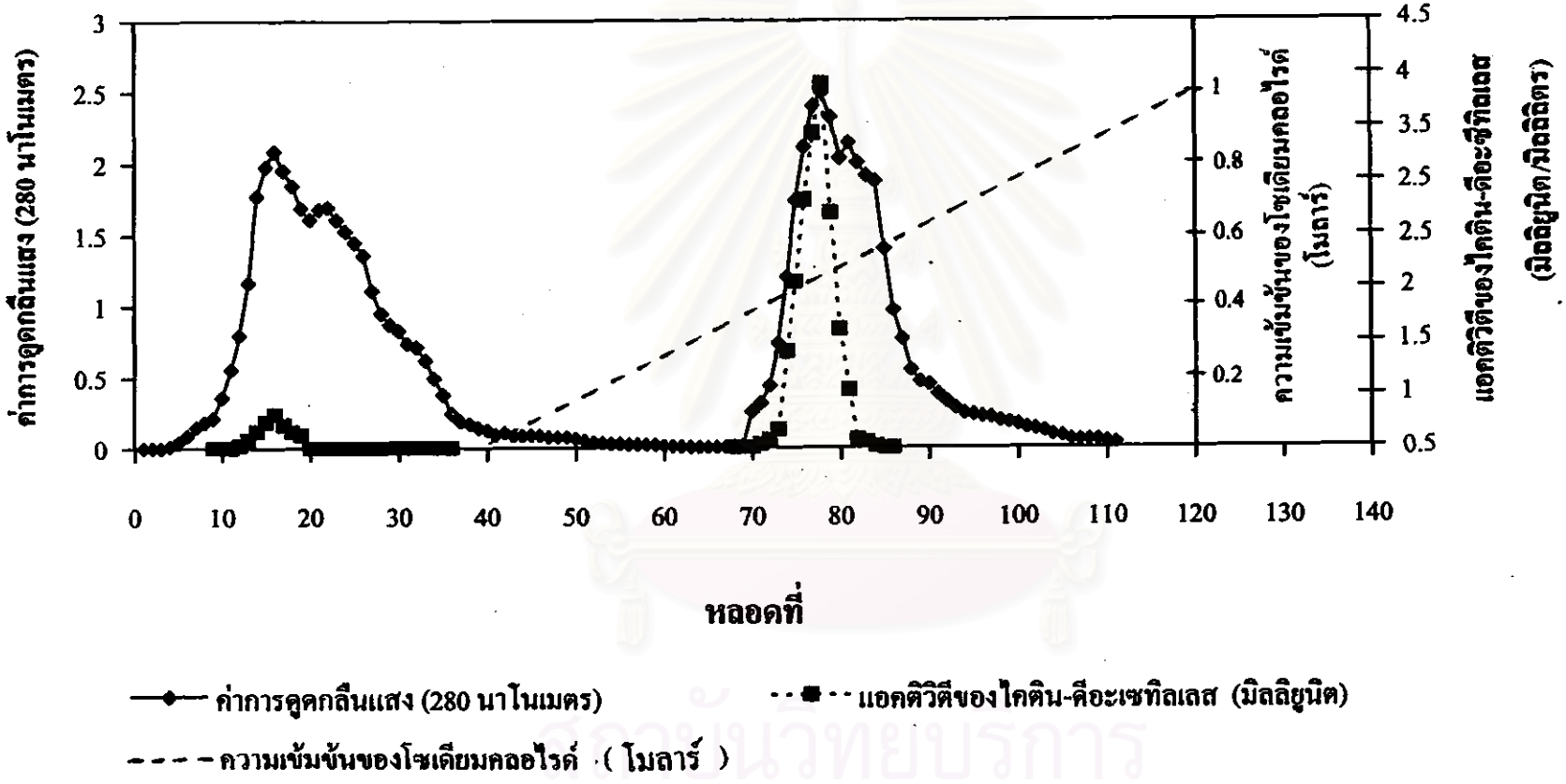
คอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 พบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส เพียงยอด(peak)เดียว หลังจากถูกชะด้วยความเข้มข้นของเกลือ 0.43 ถึง 0.47 โมลาร์ เมื่อรวมสารละลายเอนไซม์เข้าด้วยกัน ได้แอคติวิตีรวมของเอนไซม์เท่ากับ 183.2 มิลลิยูนิต มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.4 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 12.6 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 สรุปได้ว่า เอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R.oligosporus* NS_1 มีประจุเป็นลบค่อนข้างสูง เนื่องจากถูกชะออกมาที่ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ค่อนข้างสูง (0.43-0.47 โมลาร์) พบโปรตีนที่มีไคติน-ดีอะเซทิลเลสเป็นส่วนน้อย ในช่วงหลอดที่ยังไม่มีการชะด้วยเกรเดียนท์ของเกลือ แต่การที่เอนไซม์หลุดออกมาในช่วงแรกนี้ ปะปนมากับโปรตีนส่วนใหญ่ที่ไม่มีแอคติวิตีของไคติน - ดีอะเซทิลเลส ดังนั้นจึงไม่นำเอนไซม์ในช่วงนี้มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

6.3 การทำโครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-75

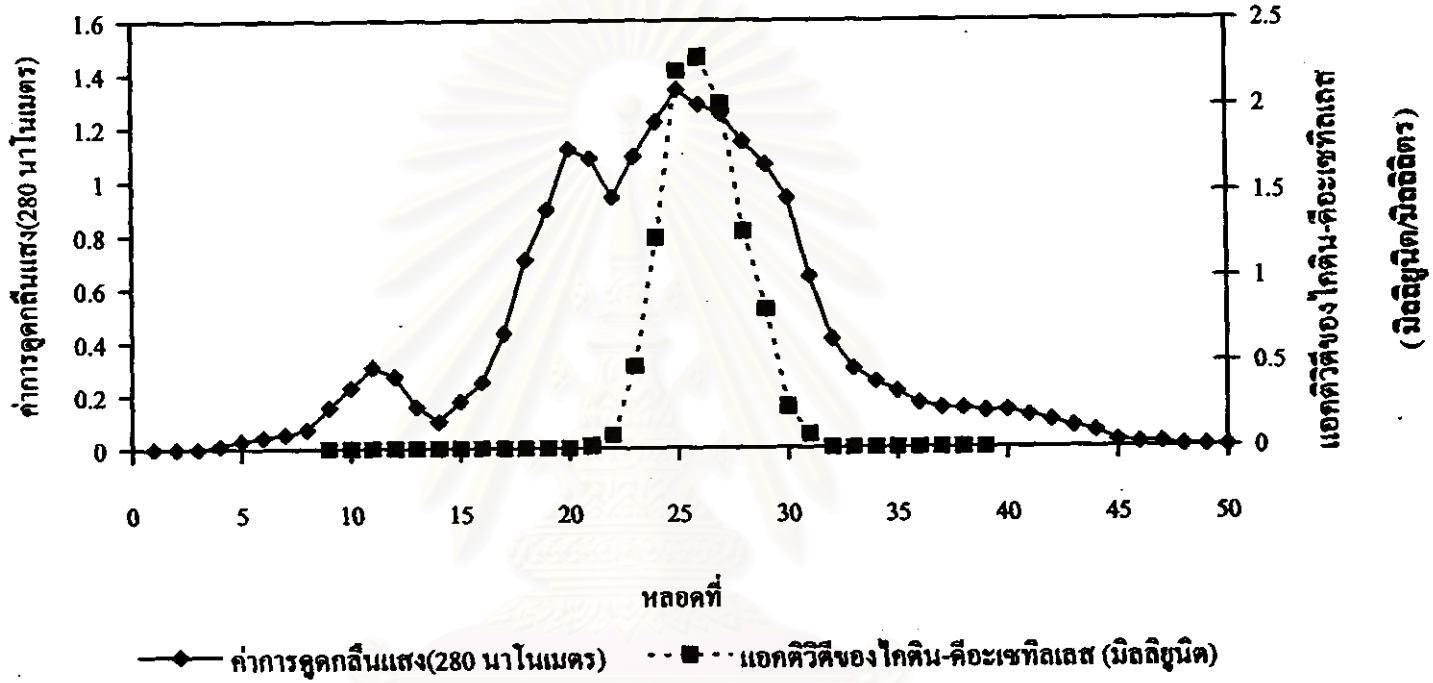
การทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสออกไป โดยการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ดังวิธีการทดลอง ในบทที่ 2 ข้อ 10.3 โดยผ่านโปรตีน 70.5 มิลลิกรัม ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ลงบนคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร มาวัดโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ผลดังรูปที่ 20 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในลำดับส่วนที่ 23-29 และเมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีรวมของเอนไซม์ได้ 97.4 มิลลิยูนิต แอคติวิตีจำเพาะ 6.01 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 24.4 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 2

7. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

เป็นการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ดังรายละเอียดของการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 10.4 พบโปรตีน 1 แถบบนเจล วัดค่า Rf ได้ 0.44



รูปที่ 19 โครมาโตกราฟีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสจาก *Rhizopus oligosporus* NS_1 บนคอลัมน์ DEAE - cellulose ขนาด 45x2.5 เซนติเมตร ชะเอนไซม์โดยใช้ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราไหล 24 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 20 โครมาโตกราฟีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1 บนคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 60x1.6 เซนติเมตร ชะเอนไซม์โดยใช้ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราไหล 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังรูปที่ 21 ตรวจพบแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยตัดชิ้นเจลบริเวณที่มีเอนไซม์ไปตรวจ พบแอคติวิตีของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณของโปรตีนมีน้อย และอาจเป็นเพราะการสูญเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างทำอิเลคโตรโฟริซิส แต่อย่างไรก็ตาม ได้พบแอคติวิตีชัดเจนจากแถบเจล

ได้นำเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ คือส่วนที่หนึ่ง เป็นสารละลายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 55-85 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่สอง สารละลายหลังผ่านคอลัมน์ DEAE - cellulose และสารละลายที่ได้หลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 นำทั้งสามส่วน มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล ดังรายละเอียดของการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 11.1 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยจำนวนแถบโปรตีนลดลง และในขั้นตอนสุดท้ายปรากฏ แถบโปรตีน 1 แถบ ดังแสดงในรูปที่ 22

มีรายงานที่ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ ของ Kafetzopoulos และคณะ (1993) ได้ใช้วิธี SDS-PAGE เช่นเดียวกันนี้ พบว่าสามารถเปรียบเทียบและแสดงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์ และสุดท้ายได้ 1 แถบโปรตีนของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการทดลองนี้

8. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

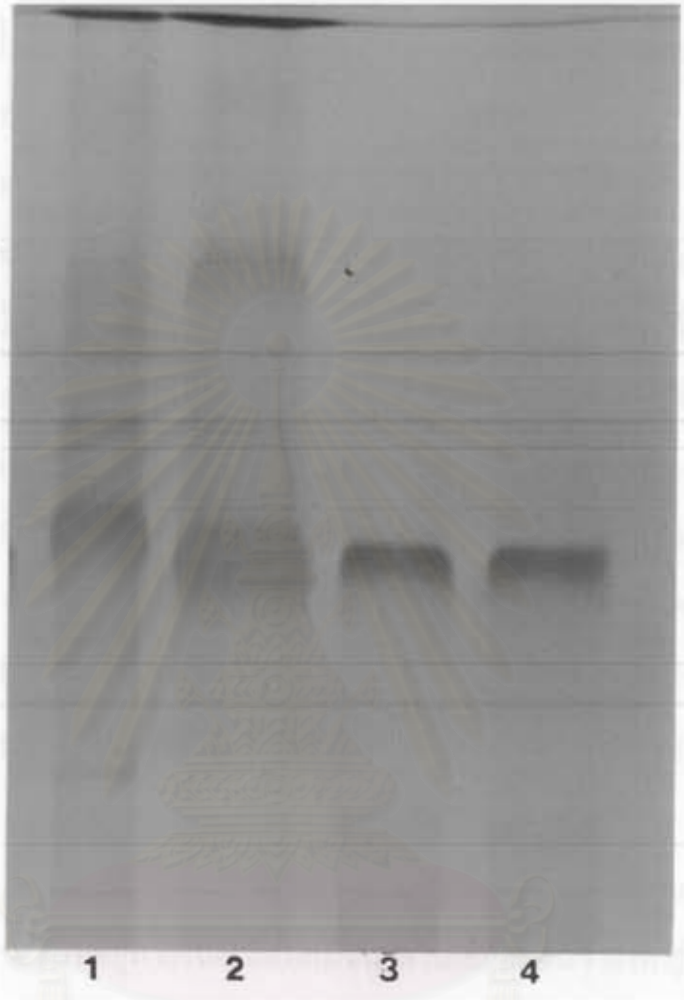
การหาน้ำหนักโมเลกุลของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ทำได้โดย สองวิธีด้วยกัน คือ โดยการหาน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE และหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนทั้งหมด โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

8.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยทำ SDS-PAGE

จากการนำไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และผ่านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยทำอิเลคโตรโฟ

รูปที่ 21 ผลการเคลื่อนที่โปรตีนของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 ด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์อิเลคโตรโฟริซิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ผลเปรียบเทียบโปรตีนของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1 บนเจลอิเลคโตรโฟริซิส จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

(1) ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

(2) DEAE- cellulose

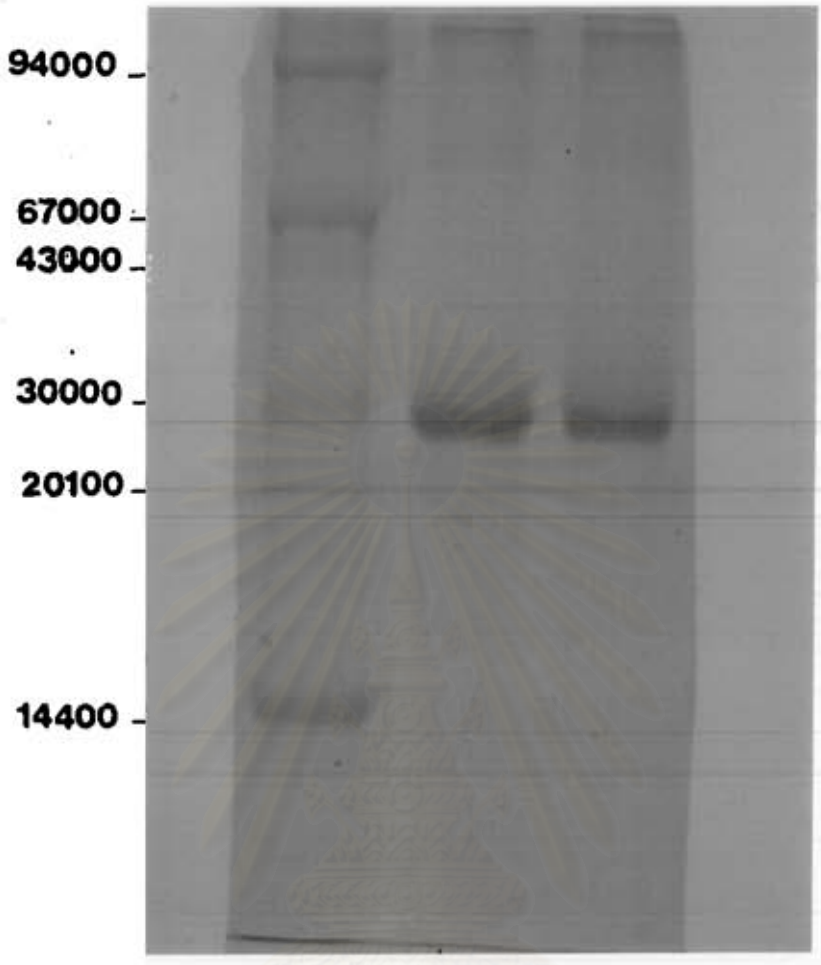
(3) , (4) Sephadex G-75

ริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ในรูปที่ 23 และจากผลการทดลองในรูปที่ 24 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไดติน-ดีอะเซทิลเลสประมาณ 28,000 ดาลตัน

8.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

โดยผ่านโปรตีนมาตรฐานบริสุทธิ์ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน คือ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน โอวัลบูมิน และไซโตโครม ซี ลงบนเซฟาเด็กซ์ จี-75 ซึ่งเป็นคอลัมน์เดียวกัน และภายใต้ภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ ติดตามลำดับส่วนที่โปรตีนถูกชะออกมาจากคอลัมน์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สำหรับโปรตีน และวัดที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ซึ่งจำเพาะสำหรับไซโตโครม ซี เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการีทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่โปรตีนเหล่านี้ถูกชะออกจากคอลัมน์ ดังในรูปที่ 25 พบว่าไดติน-ดีอะเซทิลเลส เมื่อเทียบขนาดแล้วควรจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29,000 ดาลตัน

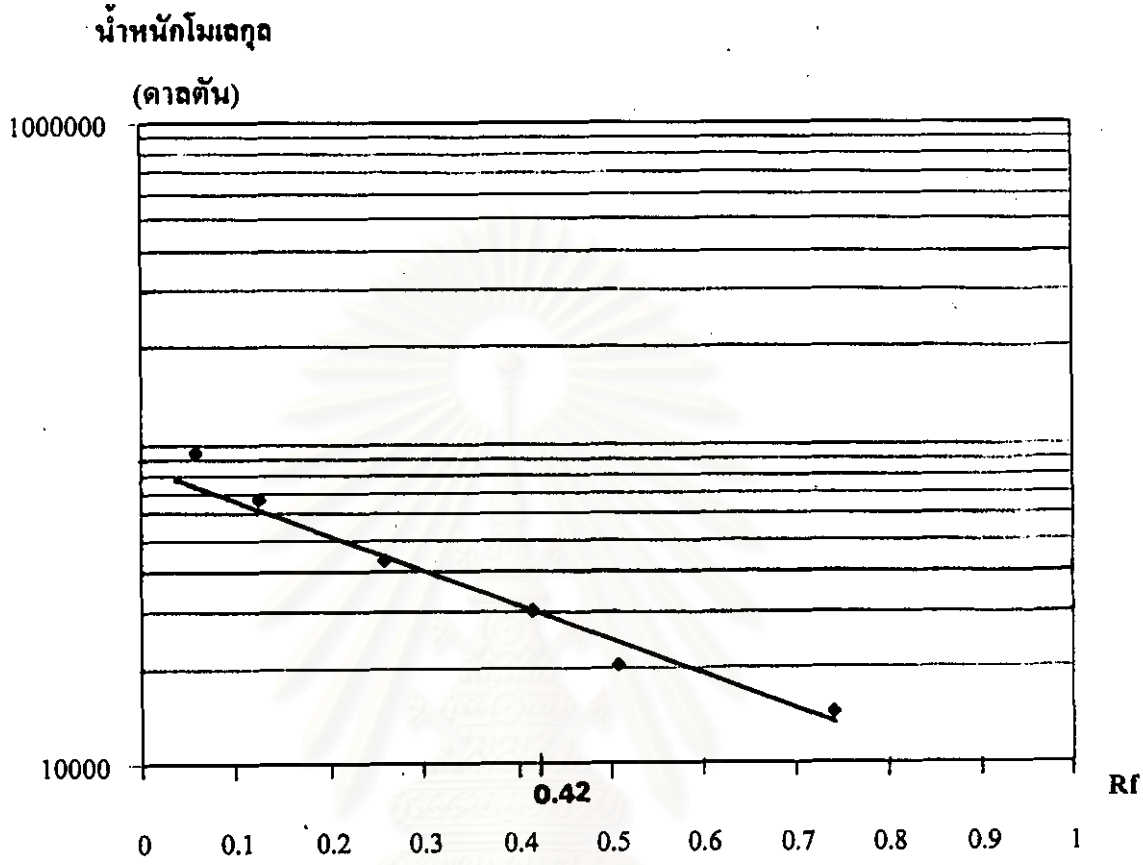
จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าโดยส่วนใหญ่น้ำหนักโมเลกุลของไดติน-ดีอะเซทิลเลส จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์มักมีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่กว่าเอนไซม์จากส่วนที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ ดังเช่น ในรายงานไดติน-ดีอะเซลทิลเลส จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ของ เชื้อ *M. rouxii* พบน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75,000 ดาลตัน โดยวิธีวิเคราะห์ SDS-PAGE และประมาณ 80,000 ดาลตันโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น (Kafetzopoulos และคณะ, 1993) เช่นเดียวกับเอนไซม์จากเชื้อ *A. coerulea* พบน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75,000 ดาลตัน โดยวิธีวิเคราะห์ทั้งสองวิธี คือ SDS-PAGE และเจลฟิลเตรชั่น (Goa และคณะ, 1995) ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของไดติน-ดีอะเซทิลเลส ในส่วนที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ ได้มีรายงานของ Tokuyasuและคณะในปี 1996 จากเชื้อ *C. lindemuthianum* พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ประมาณ 31,500 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE และประมาณ 33,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ ที่ได้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์



รูปที่ 23 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของไคติน-ดีอะเซทิลเลส กับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส ชนิดแผ่น

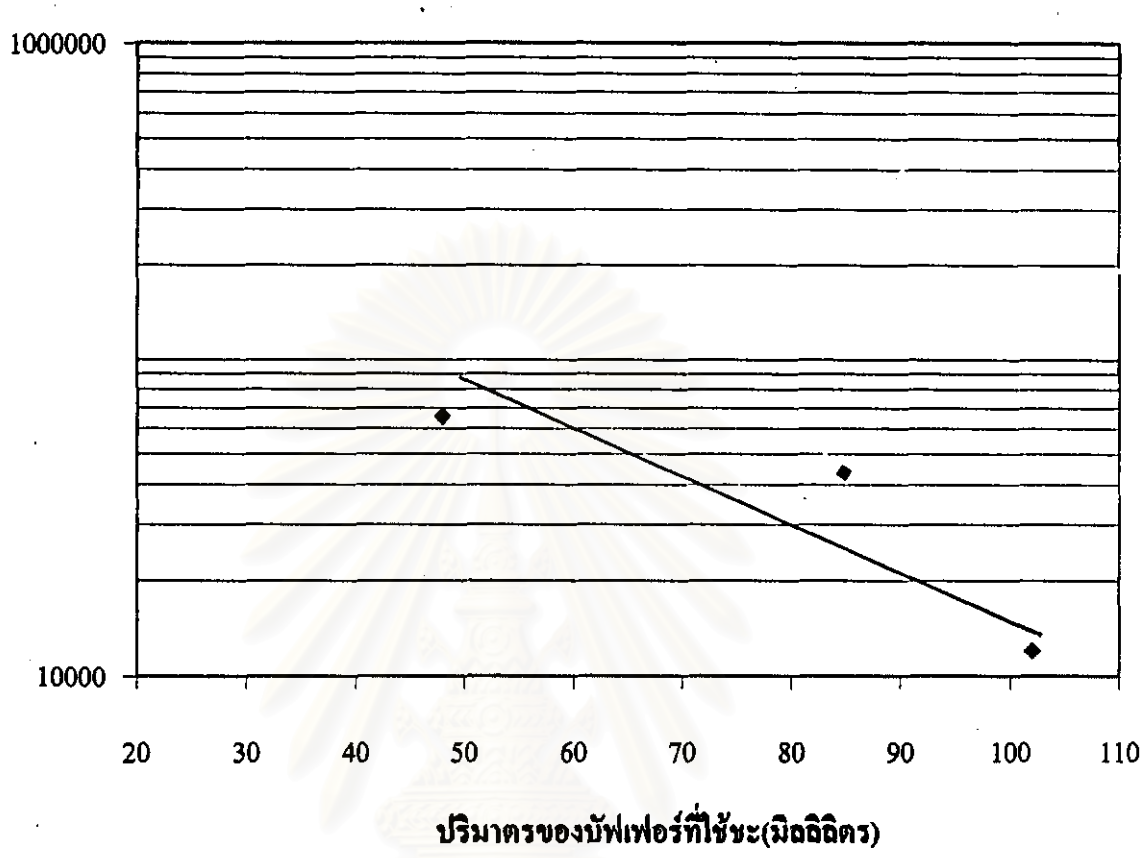
โปรตีนมาตรฐานได้แก่

ฟอสโฟริเรสบี(phosphorylase b)	94,000	ดาลตัน
อัลบูมิน(albumin)	67,000	ดาลตัน
โอวัลบูมิน(ovalbumin)	43,000	ดาลตัน
คาร์บอนิค แอนไฮเดรส(carbonic anhydrase)	30,000	ดาลตัน
ทริบซิน อินฮิบิเตอร์(trypsin inhibitor)	20,100	ดาลตัน
แอลฟา-แลคตาลบูมิน(∝-lactal bumin)	14,400	ดาลตัน



รูปที่ 24 การหาน้ำหนักโมเลกุลไดติน-ดีอะเซทิลเลสโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น โดยมีโปรตีนมาตราฐาน ได้แก่

ฟอสโฟริเรสบี(phosphorylase b)	94000 ดาลตัน
อัลบูมิน(albumin)	67000 ดาลตัน
โอวัลบูมิน(ovalbumin)	43000 ดาลตัน
คาร์บอนิค แอนไฮเดรส(carbonic anhydrase)	30000 ดาลตัน
ทริบซิน อินฮิบิเตอร์(trypsin inhibitor)	20100 ดาลตัน
แอลฟา-แลคตาลบูมิน(∝-lactallbumin)	14400 ดาลตัน



รูปที่ 25 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ ไดติน-ดีอะเซทิลเลส โดยการทำเจลฟิลเตชั่น ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 โดยมีโปรตีนมาตรฐาน ดังนี้

โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)	68000 ดาลตัน
โอวัล อัลบูมิน (oval albumin)	43000 ดาลตัน
ไซโตโครม ซี (cytochrome c)	12000 ดาลตัน

ในส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ดังกล่าวข้างต้น และจากวิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลทั้งสองวิธี อาจได้น้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากัน เช่นเดียวกันกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่ได้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ จากการทำ SDS-PAGE ประมาณ 28,000 ดาลตัน ขณะที่น้ำหนักโมเลกุลจากวิธีเจลฟิลเตรชั่นจะสูงกว่าเล็กน้อย โดยได้น้ำหนักประมาณ 29,000 ดาลตัน

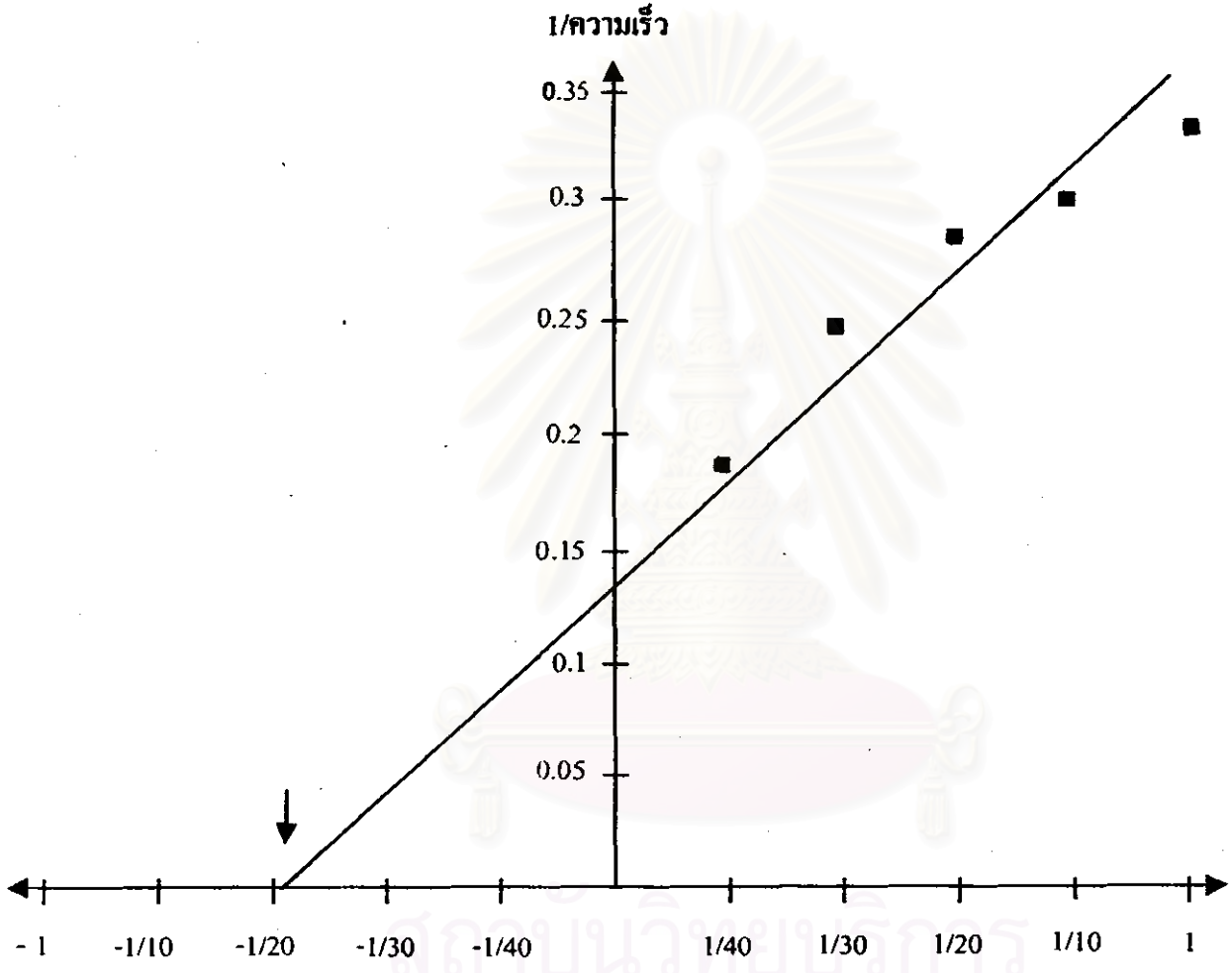
9. สมบัติบางประการของเอนไซม์

9.1 การหาค่า Km

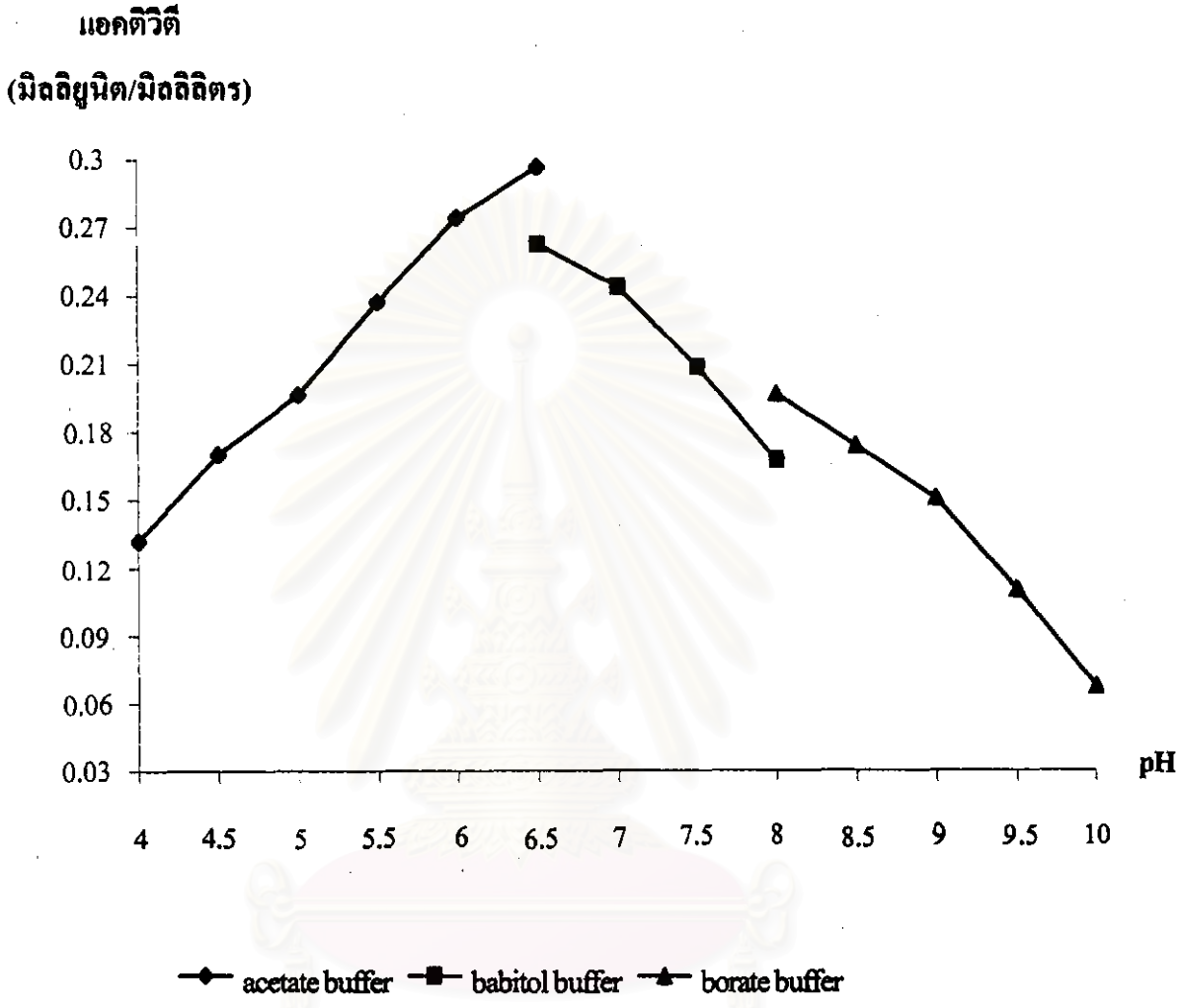
การหาค่าKmของไคติน-ดีอะเซทิลเลส เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของเอนไซม์ที่เตรียมได้ต่อสับสเตรท คือไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 เปอร์เซ็นต์ จากการแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรทที่เวลาต่าง ๆ กัน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ แล้วนำมาเขียนกราฟ แบบไลน์- วีเวอร์เบิร์ก ดังแสดงในรูปที่ 26 พบว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลส มีค่าKm เท่ากับ 19.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีช่วงของ pH ต่างกัน ตั้งแต่ 4-10 ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.2 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา60 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ผลดังรูปที่ 27 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 ของอะซิเตทบัฟเฟอร์ เมื่อ pH สูงขึ้นหรือต่ำกว่านี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ในขณะที่เอนไซม์จากเชื้ออื่นมีการรายงานผลที่แตกต่างกันโดย ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ใน *M. rouxii* ให้แอคติวิตีสูงสุดที่ pH ประมาณ 4.5 (Kafezopuolos, และคณะ 1993) ส่วนใน *A. coerulea* พบว่า pH 5.0 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด (Gao และคณะ, 1995) และไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *C. lagenarium* พบว่า pHที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ที่ 7.5 ส่วนในเชื้อ *C. lindemuthianum* pHที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงที่เป็นด่างประมาณ 11.5-12.0 (Tokuyasu และคณะ, 1996)



รูปที่ 26 การหาค่าความจำเพาะต่อสับเสตรท (Km) ของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อไคโตแซน ที่มีเปอร์เซนต์ดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9



รูปที่ 27 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไคติน-คีอะเซทิลเลส โดยตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรผันความเป็นกรดด่างต่างๆ ในการบ่มปฏิกิริยา

9.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

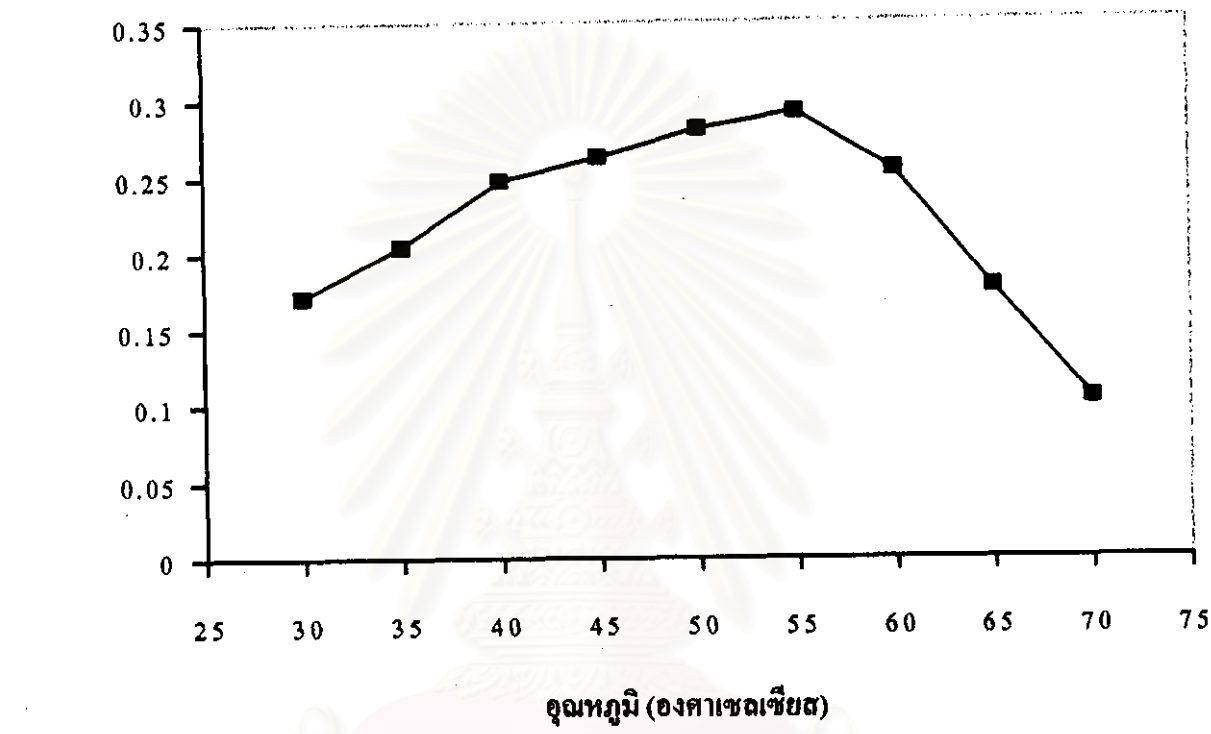
นำสารละลายเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส 0.5 มิลลิลิตร ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.5 ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตแซน 0.75 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังรายละเอียดในวิธีการทดลอง บทที่ 2 ข้อ 12.3 ได้ผลดังในรูปที่ 28 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *M. rouxii* และ *A. coerulea* โดยพบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เท่ากัน คือ 50 องศาเซลเซียส (Kafetzopoulos และคณะ, 1993 ; Goa และคณะ, 1995) และยังใกล้เคียงกับไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *C. lindemuthianum* ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 60 องศาเซลเซียส (Tokuyasu และคณะ, 1996)

9.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อ pH

บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 3-10 นาน 60 นาที จากนั้นนำไปหาแอคติวิตีที่เหลือภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อที่ 12.4 พบว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลส มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 4.5-9 แต่ที่ pH ต่ำกว่า 4 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว และที่ pH 10 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง 48 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 29 ซึ่งใกล้เคียงกับไคติน-ดีอะเซทิลเลสที่ได้จาก *C. lindemuthianum* ที่มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5.0-10.5 (Tokoyasu และคณะ, 1996)

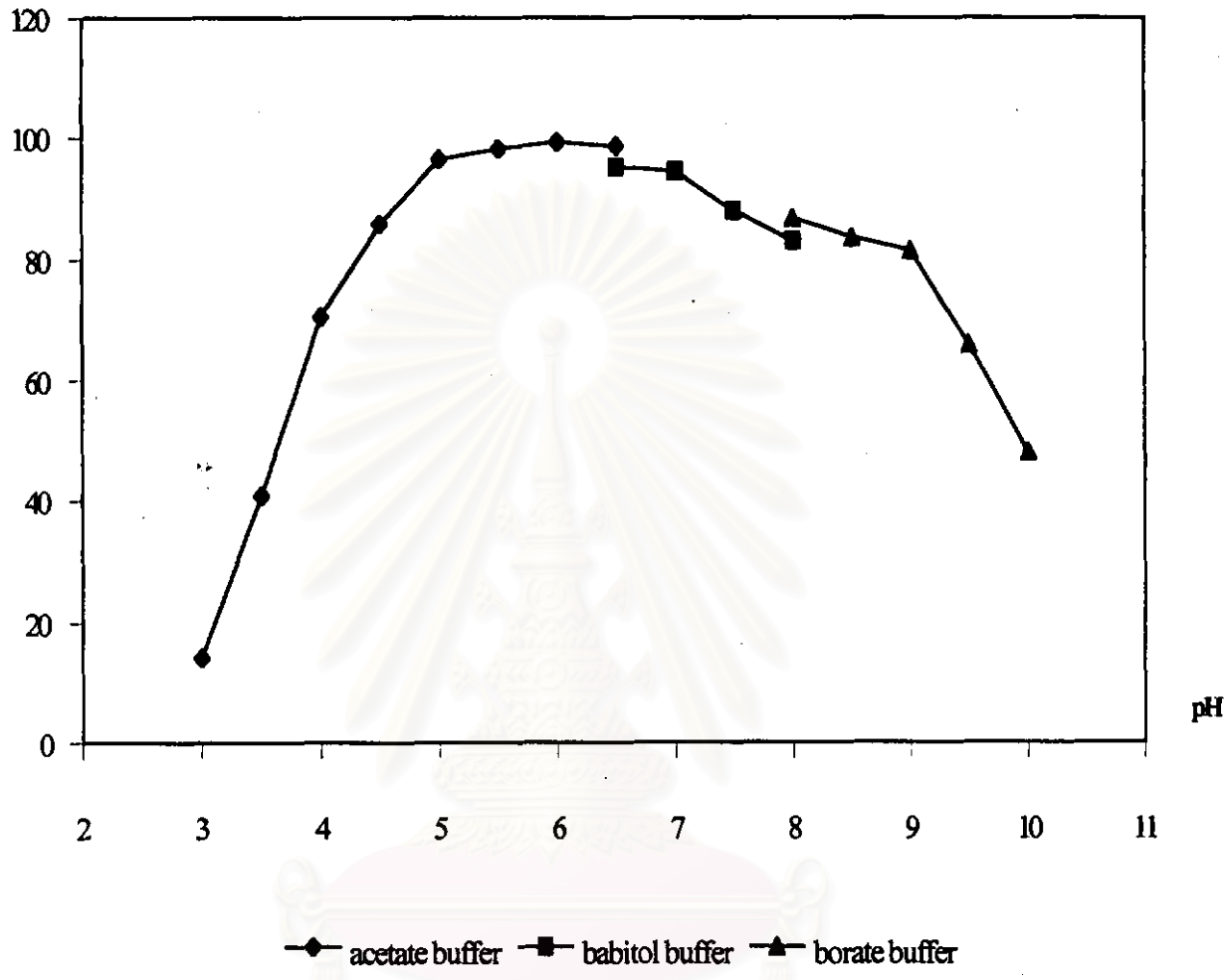
9.5 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12.5 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 30 พบว่าเอนไซม์ เสถียรที่ช่วงอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ ลดลงเหลือเพียง 5.8 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ได้จากเชื้อ *A. coerulea* ซึ่งมีความ

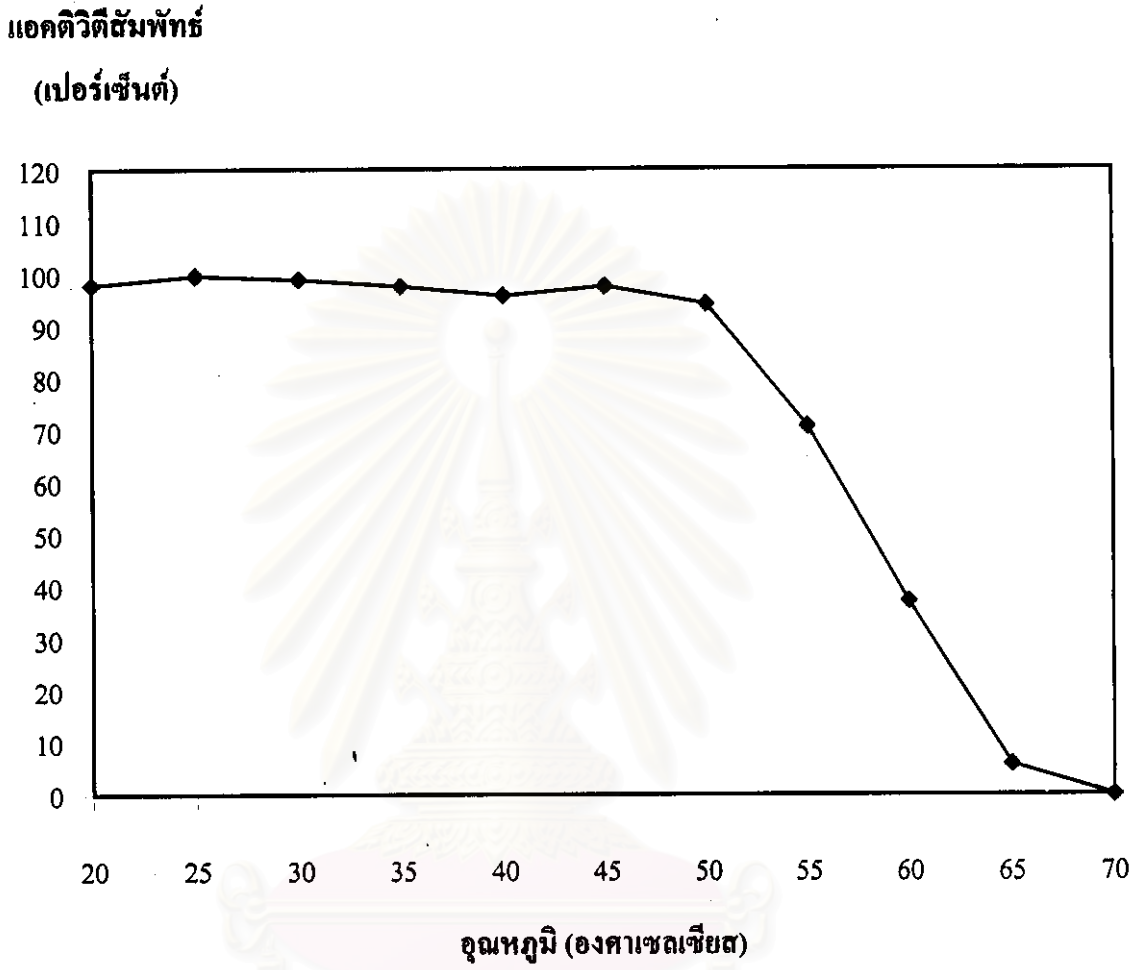


รูปที่ 28 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *R. oligosporus* NS_1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 ความเสถียรของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่pH 3-10 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์



รูปที่ 30 ความเสถียรของไคติน-ดีอะเซทิลเลสต่ออุณหภูมิ โดยบ่มเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส

เสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที เช่นกัน (Goa และคณะ, 1995) ในขณะที่เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อก่อโรคพืชอย่าง *C. lindemuthainum* โดย Tokuyasu และคณะ (1996) พบว่า ช่วงความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์อยู่ในช่วงกว้าง คือ 0 ถึง 50 องศาเซลเซียสภายในเวลา 20 นาที และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีจะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

10. การไฮโดรไลส์ไคโตแซนด้วยเอนไซม์

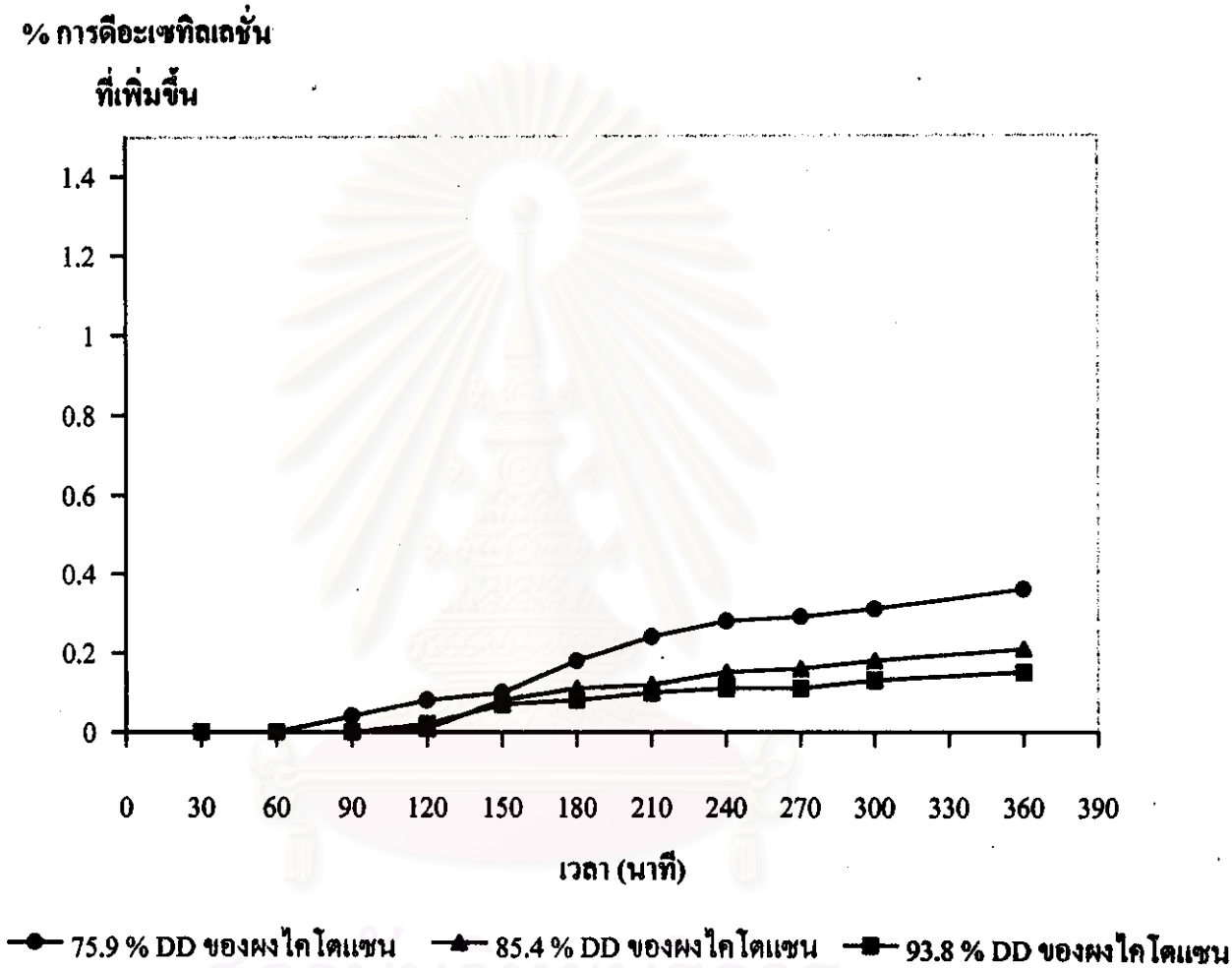
10.1 การไฮโดรไลส์ไคโตแซนในรูปของผง

ได้นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วบ่มกับผงไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นต่าง ๆ (% DD) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเขย่าเป็นเวลาต่าง ๆ กัน เพื่อเปรียบเทียบ ค่าเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นที่เพิ่มขึ้นของสับสเตรทแต่ละชนิด จากการทำงานของเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 31 พบว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลสใช้สับสเตรทในรูปของแข็งที่เป็นผงได้น้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์ สามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ผิวของสับสเตรทเท่านั้น และอาจเป็นไปได้ว่าไคโตแซนที่อยู่ในรูปผงมีการเรียงตัวของโพลีเมอร์เป็นก้อน อาจมีเฉพาะบางส่วนของหมู่อะเซทิล ซ่อนอยู่ภายในไม่ได้คลี่ออกมาทำให้เอนไซม์เข้าไปไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลได้ยาก เมื่อคำนวณแล้วพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของสับสเตรทแต่ละชนิดที่ใช้ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ผงไคโตแซนที่มี % DD เท่ากับ 75.9 85.4 และ 93.8 ถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซม์ และมี %DD เพิ่มขึ้นเพียง 0.36 0.21 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น สับสเตรทของเอนไซม์ควรอยู่ในรูปที่คลี่กระจายของแกนโมเลกุลที่ทำให้หมู่อะเซทิลได้สัมผัสกับสารละลายเอนไซม์ได้ดี ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Tsigos และ Bouriotis (1995) โดยให้รายงานว่า เมื่อนำไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *C. lindemuthianum* ไปไฮโดรไลส์ผงไคติน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ได้ผลการดีอะเซทิลชั่น

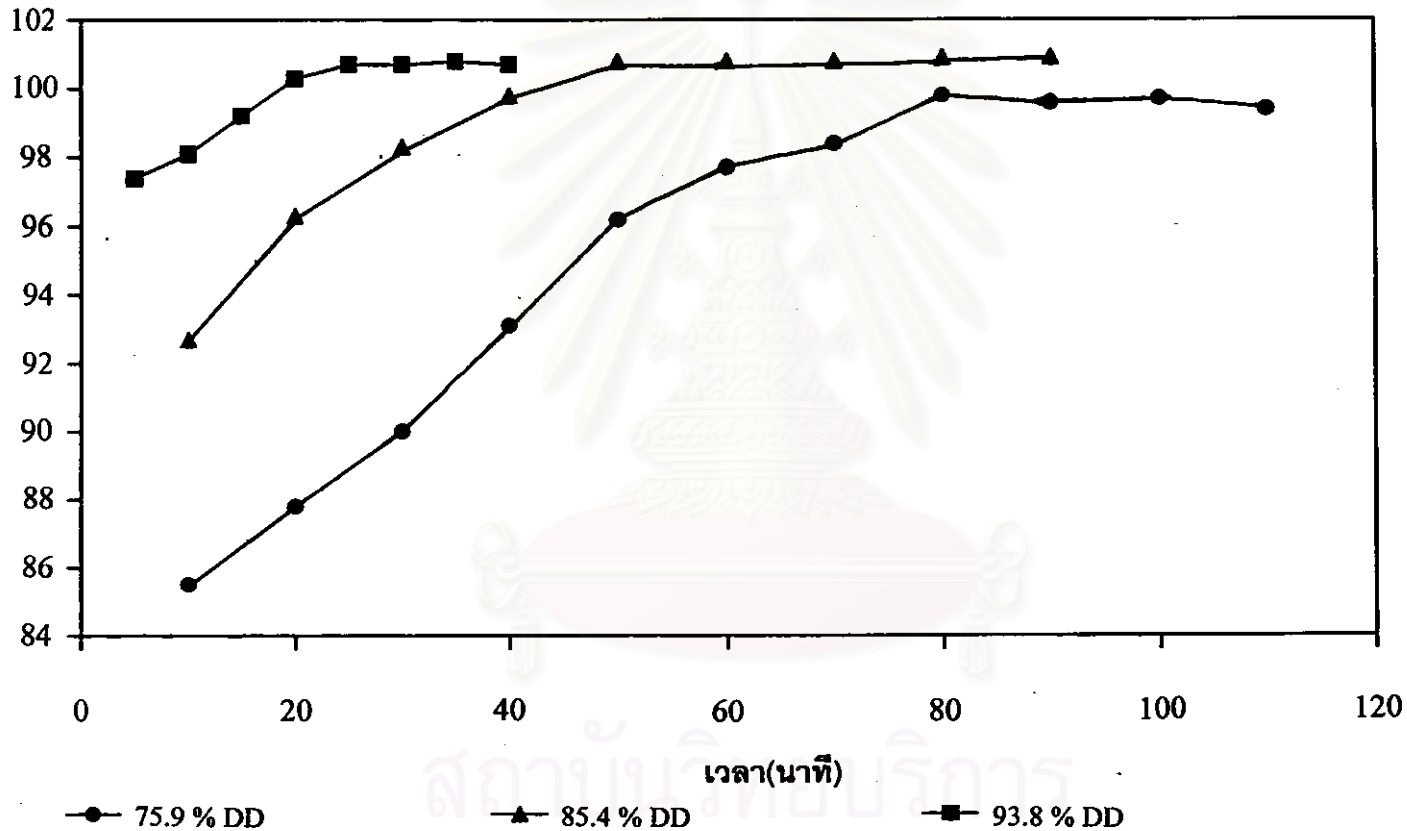
เพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไฮโดรไลส์ผงไคตินได้ต่ำมาก เมื่อเทียบกับการไฮโดรไลส์สับสเตรทในรูปสารละลาย

10.2 การหาเวลาในการไฮโดรไลส์ให้สมบูรณ์ของเอนไซม์

จากการนำสารละลายไคโตแซนที่มี % DD เท่ากับ 75.9 85.4 และ 93.8 เปอร์เซ็นต์ มาบ่มกับสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ในเวลาที่ต่างๆ กัน จากผลการทดลองพบว่า สารละลายไคโตแซน 75.9% DD ใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์นาน 80 นาที สีของปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ส่วนสารละลายไคโตแซน 85.4 % DD ใช้เวลาเร็วขึ้น คือ 50 นาที และสำหรับสารละลายไคโตแซน 93.8% DD พบว่าใช้เวลา 25 นาที สีของปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่เช่นกัน และเมื่อคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น จะพบว่าเมื่อสีของปฏิกิริยาเริ่มคงที่ มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นอยู่ในช่วง 98-100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 32 จะเห็นได้ว่าเมื่อสับสเตรทที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซเลชั่นสูง เวลาในการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์จะลดลง การที่สีของปฏิกิริยาเริ่มคงที่ แสดงให้เห็นว่า สับสเตรทที่ใช้ถูกไฮโดรไลส์เอาหมู่อะเซทิลออกจนหมด ซึ่งจะใช้เวลาต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่อะเซทิลที่ถูกตัดออก นอกจากนี้การย่อยของเอนไซม์ยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะที่เอนไซม์มีต่อสับสเตรทด้วย โดยจากรายงานของ kafetzopoulos และคณะ (1993) พบว่าสับสเตรท สำหรับไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเชื้อ *M. rouxii* ต้องประกอบไปด้วย N-acelylglucosamine อย่างน้อย 4 โมเลกุลเรียงต่อกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gao และคณะ (1995) พบว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลส จาก *A. coerulea* จะไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลก็ต่อเมื่อมี N-acctylglucosamine 3 โมเลกุลเรียงต่อกัน หรือเรียงต่อกันมากขึ้นจะทำให้แอคติวิตีสูงขึ้น ซึ่งรา *R. oligosporus* NS_1 จัดเป็นราที่อยู่ในกลุ่ม Zygomycetes เหมือนราทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น ดังนั้น เอนไซม์จากรา *R. oligosporus* NS_1 น่าจะมีสมบัติใกล้เคียงกันด้วย นอกจากนี้ เอนไซม์ที่ได้จากพวกราชั้นสูง (higher fungi) อย่างเช่น *C. lindemuthianum* จะให้ผลเช่นเดียวกัน คือ สามารถไฮโดรไลส์ chitooligosaccharide ที่มีโมเลกุล N-acetylglucosamine เรียงต่อกันอย่างน้อย 4 โมเลกุล



รูปที่ 31 การใช้ไคติน-ดีอะเซทิลเลสไฮโดรไลส์ผงไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์ การดีอะเซทิลเลชั่น 75.9 85.4 และ93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 32 เวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ให้สมบูรณ์ของไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น 75.9 ,85.4และ93.8 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นของสับเสตรทหลังบ่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์จะไม่สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรทที่เป็นของแข็ง ซึ่งไม่ละลายน้ำหรือกรดอ่อนที่อยู่ในรูปสารละลายได้ดี เอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสจะไฮโดรไลส์ได้ทั้ง สับสเตรทที่มีแกนโมเลกุลสายสั้น และสายยาว แต่อย่างไรก็ตาม สับสเตรทควรอยู่ในรูปที่สามารถให้เอนไซม์เข้าไปจับได้ง่าย โดยมีความจำเพาะต่อหมู่อะเซทิลโดยเฉลี่ยอย่างน้อย 3 ตัวขึ้นไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย