บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ไคทินเป็นโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine ที่ต่อกันเป็นสายตรงด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic มีสมบัติไม่ละลายน้ำและมีอยู่เป็นจำนวนมากในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบของเปลือกนอกแข็งของแมลง ครัสเตเชียน และผนังเซลล์ของรา มีผู้ประมาณการว่าไคทินที่ได้จากอาหารทะเลทั่วโลกมีปริมาณมากถึง 37,300 เมตริกตันต่อปี (Wang และ Chang,1997) ดังนั้นจึงมีความพยายามนำไคทินหรืออนุพันธุ์ของไคทินไปใช้ประโยนช์ในด้านต่างๆ ทั้งในด้านการแพทย์ การเกษตรเคมี (agrochemicals) การเพาะเลี้ยง ฯลฯ ข้อจำกัดของไคทินคือ เป็นโมเลกุลใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ และมีโครงสร้างที่แข็งแรงยากต่อการทำลาย วิธีที่นิยมนำไปใช้ย่อยไคทินให้มีขนาดเล็กลงคือการย่อยด้วยกรดเกลือเข้มข้นหรือการย่อยด้วยเอนไซม์ไคทิเนส

ไคทิเนสเป็นชื่อเรียกกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยไคทินให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กเช่น chitooligosaccharides chitobiose หรือ N-acetylglucosamine สิ่งมีชีวิตที่มีไคทินเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตไคทิเนสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต เช่น ช่วงของการลอกคราบหรือระยะในการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่ไม่มีไคทินเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตไคทิเนสได้เช่นกัน การที่พืชผลิตไคทิเนสออกมานั้นเป็นกลไกสำคัญที่ใช้ต้านทานเชื้อราตามธรรมชาติ ส่วนแบคทีเรียผลิตไคทิเนสเพื่อใช้ในการย่อยไคทินให้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจน มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ผลิตไคทิเนสได้เช่น *Serratia marcescens* (Roberts และ Cabib, 1982) *Streptomyces erythraeus* (Hara และคณะ, 1988) *Bacillus circulans* WL-12 (Watanabe และคณะ, 1990) *Aeromonas caviae* (Inbar และ Chet, 1991) *Vibrio hareyi* (Svitil และคณะ, 1997) และ *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang และ Chang, 1997) เป็นต้น โดยเหตุที่ไคทินมีคุณค่าทางเศรษฐกิจจึงก่อให้เกิดการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับไคทิเนสอย่างกว้างขวางเพื่อหาไคทิเนสที่มีสมบัติดีและราคาถูก เหมาะแก่การใช้งานในระดับอุตสาหกรรม

ในงานวิจัยนี้ได้นำ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากดินภายในประเทศและสามารถผลิตไคทิเนสได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์สำหรับนำมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

การศึกษาการเจริญและการผลิตไคทิเนสของ *Bacillus cereus* พบว่า *Bacillus cereus* สามารถผลิตและขับไคทิเนสออกนอกเซลล์เมื่อเหนี่ยวนำด้วยคอลลอยดัลไคทิน เมื่อตรวจวัดแอคติวิตีของไคทิเนสเปรียบเทียบกับการเจริญพบว่าเซลล์ผลิตไคทิเนสออกมาก่อนที่จะสังเกตเห็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งอธิบายได้ว่าไคทิเนสจำเป็นต่อการที่เซลล์จะนำคอลลอยดัลไคทินไปใช้เป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญ ในระยะต่อมาเมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นการผลิตไคทิเนสก็เพิ่มขึ้นตาม เซลล์ผลิตเอนไซม์สูงสุดที่ 32 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับช่วงที่การเจริญเข้าสู่จุดการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) และแอคติวิตีของเอนไซม์จะยังคงสูงคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดที่ 16 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงระยะการเจริญแบบทวีคูณ (logarithmic phase) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในระยะต้นนี้ *Bacillus cereus* ยังขับโปรตีนชนิดอื่นๆ ออกมาน้อยกว่าในช่วงหลัง ในช่วงชีวิตหลังของ *Bacillus* มักจะมีการขับเอนไซม์ต่างๆ ออกมาเพื่อประโยชน์ต่อการเปลี่ยนแปลงในช่วงสร้างสปอร์ สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้ติดตามว่า *Bacillus cereus* สร้างสปอร์ด้วยหรือไม่ แบบแผนการเจริญและการผลิตไคทิเนสในการศึกษานี้คล้ายกับ *Pseudomonas aeruginosa* K-187 แต่แตกต่างจาก *Serratia marcescens* (Robert และ Cabib, 1982) ซึ่งเซลล์จะผลิตไคทิเนสเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้ว เป็นที่น่าสังเกตว่ารายงานส่วนใหญ่ไม่รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียกับการผลิตไคทิเนสแต่จะเก็บเอนไซม์ในช่วงระยะการเจริญคงที่เหมือนๆกัน สาเหตุหนึ่งที่มีการศึกษาน้อยอาจจะเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคทินหรือคอลลอยดัลไคทินเป็นส่วนประกอบจะขุ่น ทำให้ไม่สามารถติดตามการเจริญของแบคทีเรียอย่างง่ายๆด้วยการวัดความขุ่นของเซลล์ สำหรับการศึกษานี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากการทำ pour plate เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ทั้งนี้ได้เคยทดลองติดตามการเจริญโดยการวัดปริมาณ DNA ด้วยสารละลายไดเฟนิลามีนตามวิธีของ Burton (1955) แต่ปรากฏว่าสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจางมาก จึงไม่เหมาะต่อการติดตามการเจริญด้วยวิธีการนี้ คาดว่าน่าจะเกิดจากจำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาที่นำมาทดสอบมีน้อยเกินไป

ในการเตรียมไคทิเนสให้บริสุทธิ์นั้นได้ปั่นเก็บเอนไซม์หลังจากที่เลี้ยงเชื้อได้ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ไคทิเนสสูงและมีปริมาณที่มากเพียงพอที่จะทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เมื่อเตรียมสารละลายเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำไปผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่าขั้นตอนการทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยกรองชนิดอัลทราซึ่งเลือกใช้เมมเบรนที่มี MW cut off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 20-120 กิโลดาลตัน (Wang และ Chang, 1997) และการใช้ aqua sorb ดูดน้ำออกล้วนมีผลทำให้ผลผลิตเอนไซม์และแอคติวิตีรวมลดลงอย่างมาก อีกทั้งความบริสุทธิ์ก็ไม่เพิ่มขึ้น (ตาราง ที่ 3 และรูปที่ 12,13) แอคติวิตีที่สูญเสียจากการกรองชนิดอัลทราไม่น่าจะเนื่องมาจากการเล็ดลอดออกไปกับส่วนกรองชั้นล่างเนื่องจากเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสในสารละลายส่วนที่ผ่านเมมเบรนออกไปไม่พบแอคติวิตีของไคทิเนส เป็นไปได้ว่าไคทิเนสถูกทำลายด้วยโปรตีเอสที่ปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์เนื่องจากมีรายงานจำนวนมากที่แสดงว่า *Bacillus* ขับโปรตีเอสออกนอกเซลล์ระหว่างการเจริญ ในการทดลองนี้ไม่ได้เติมสารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสลงไปในสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการเตรียมให้บริสุทธิ์เนื่องจากมีรายงานว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสบางชนิดเช่น ethylenediaminetetraacetate (EDTA) และ p-chloromercuribenzoate (pCMB) มีผลทำให้แอคติวิตีของไคทิเนสลดลง 58 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Park และคณะ, 1997) ส่วนการที่ aqua sorb ทำให้แอคติวิตีรวมและผลผลิตเอนไซม์ลดลงมากนั้นแสดงว่า aqua sorb (sodium carboxy methyl cellulose) หรือสารอื่นที่เจือปนอยู่น่าจะมีผลทำให้แอคติวิตีของไคทิเนสลดลง มีผู้ศึกษาในทำนองเดียวกันโดยใช้ polyethylene glycol เป็นตัวทำให้เข้มข้นพบว่าไม่มีผลต่อไคทิเนส (Inglis และ Peberdy, 1997) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้ aqua sorb โดยอาจจะเปลี่ยนมาใช้ polyethylene glycol หรือใช้วิธีอื่นในการทำเอนไซม์ให้เข้มข้นเช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์รีเจนเนอเรทไคทินซึ่งเป็นโครมาโตรกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) อาศัยการดูดซับระหว่างเอนไซม์กับรีเจนเนอเรทเทดไคทินที่มีความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ Molano และคณะ (1997) ได้รายงานว่ารีเจนเนอเรทเทดไคทินใช้เป็นสับสเตรทได้ดีกว่าคอลลอยดัลไคทินเนื่องจากในขั้นตอนของการทำคอลลอยดัลไคทินพบว่ามีการสูญเสียหมู่อะซิทิลจากการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นซึ่งอาจจะส่งผลต่อความไวในการย่อยของเอนไซม์ การยึดเกาะระหว่าง

ไคทิเนสกับรีเจนเนอเรทเทดไคทินจึงควรจะดีกว่าคอลลอยดัลไคทิน ด้วยเหตุนี้การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้รีเจนเนอเรทเทดไคทินจึงให้ผลผลิตเอนไซม์ค่อนข้างสูง นอกจากนี้การเตรียมคอลลอยดัลไคทินในปริมาณมากต้องใช้เวลานานและได้ผลผลิตต่ำ แต่ในทางตรงข้ามเราสามารถเตรียมรีเจนเนอเรทเทดไคทินในปริมาณมากได้โดยการเติมหมู่อะซิทิลให้กับไคโตแซน (acetylation of chitosan) เจลที่ได้จะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันตลอดและทำให้เป็นอนุภาคเล็กได้ตามต้องการ มีรายงานการทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินหลายรายงานได้แก่รายงานของ Bhushan และ Hoondal (1998) Yamamoto และคณะ (1995) Yanai และคณะ (1992) Molano และคณะ (1979) และ Vergauwen Leuven และคณะ (1998) ซึ่งได้ผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 38.0 86.0 15.2 25.0 และ 46.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 12.0 3.2 6.6 77.1 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการแยกไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะไม่ถูกดูดซับและชะออกได้ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 มีโปรตีนเพียงส่วนน้อย (ประมาณ 1.84 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด) ที่มีแอคติวิตีของไคทิเนสสูงซึ่งจะถูกดูดซับด้วยอนุภาครีเจนเนอเรทเทดไคทินที่ pH 7.4 เอนไซม์ถูกชะออกได้ด้วยบัฟเฟอร์ pH 4.73-3.10 ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 27.78 เท่า มีแอคติวิตีของเอนไซม์ (yield) คงเหลือ 28.89 เปอร์เซ็นต์ เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ pH 3.10 นี้เป็น pH ที่เอนไซม์ไม่เสถียร (รูปที่ 19) ดังนั้นเอนไซม์ส่วนหนึ่งถูกทำลายในระหว่างการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการแยกด้วยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส ที่ pH 8.3 พบว่าสามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ปนอยู่ออกไปได้มาก เหลือแถบโปรตีน 2 แถบในเจลซึ่งทั้งสองแถบนี้สามารถย้อมติดสี Fluorescent Brightener 28 ได้ อนึ่งในการทำดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส ทุกครั้งจะมีโปรตีนที่ติดสีย้อมแอคติวิตีตรงบริเวณหัวเจลเสมอ โปรตีนที่หัวเจลนี้น่าจะมีไคทิเนสที่มีประจุบวกสูงจึงไม่เคลื่อนที่ลงมาในเจล มีรายงานสนับสนุนว่าไคทิเนสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประจุสุทธิเป็นลบ (acidic pI) มีเพียง *Bacillus circulans* WL-12 เท่านั้นซึ่งมีไคทิเนส 6 ชนิด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ 5 ชนิด และประจุสุทธิเป็นบวก 1 ชนิด

(Watanabe และคณะ, 1990) ส่วนไคทิเนสจากพืชหรือรามีทั้งชนิดที่มีค่า pI เป็นลบ บวก หรือ กลาง ผลการทดลองในรูป 13ข. ยังอาจบ่งชี้ว่าอาจมีไคทิเนสบางตัวสูญหายไปในระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (แถวที่ 1 มีแถบมากกว่าแถวอื่นๆ)

วิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสในเจลได้ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Trudel และ Asselin (1989) โดยได้เติมสับสเตรทลงไปในเจลโดยตรงเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบแอคติวิตี เนื่องมาจากวิธีเดิมใช้เติมสับสเตรทใน overlay gel จะต้องใช้เวลานานในการที่จะให้เอนไซม์แพร่เข้าสู่ overlay gel และยังอาจมีการสูญเสียโปรตีนไปบางส่วนจากการแพร่ด้วย ไกลคอลไคทินเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการตรวจสอบแอคติวิตีในเจลเนื่องจากเป็นสับสเตรทที่ละลายน้ำได้เป็นเนื้อเดียวกับเจล ไม่เคลื่อนที่ในเจล และไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีนในเจล (Trudel และ Asselin, 1989) ได้เคยทดสอบโดยใช้คอลลอยดัลไคทินแทนไกลคอลไคทินพบว่าคอลลอยดัลไคทินกระจายไม่สม่ำเสมอในเจลและเคลื่อนที่ลงมาอยู่ด้านล่างเจลขณะที่เจลยังไม่เกิดการพอลีเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการทำ activity staining ส่วนการย้อมแอคติวิตีด้วย Calcofluor white M2R นั้น Maeda และ Ishida (1967) ได้ศึกษาความจำเพาะของ Fluorescent Brightener (หรือ Calcofluor white M2R) พบว่าสารนี้จับได้ดีกับ hexopyranose polymers ที่เป็น β-configuration เช่น pachyman cellulose carboxymethyl-cellulose diethylaminoethyl-cellulose และ chitin เป็นต้น ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสและไลโซไซม์ได้เช่นกัน ผลการทดลองในรูปที่ 20 พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ไม่ย่อยเซลลูโลสแสดงว่าไม่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสอยู่ส่วนจะมีแอคติวิตีของไลโซไซม์ร่วมอยู่ด้วยหรือไม่นั้นควรมีการตรวจสอบโดยการวัดอัตราการย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Martin, 1991) ผู้วิจัยเชื่อว่าเอนไซม์ที่แยกได้จาก *Bacillus cereus* เป็นไคทิเนสเนื่องจากใช้คอลลอยดัลไคทินเป็นสารเหนี่ยวนำและถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่าไคทิเนสบางชนิดมีแอคติวิตีของไลโซไซม์ร่วมอยู่ด้วยแต่มักเป็นไคทิเนสของพืชซึ่งจำเป็นต่อการต้านทานเชื้อรา มีเพียงรายงานของ Wang และ Chang (1997) เท่านั้นที่พบว่าไคทิเนสของ *Pseudomonas aeruginos* K-187 มีแอคติวิตีของไลโซไซม์ร่วมอยู่ด้วยแต่น้อยมากคือในอัตราส่วน 1:10-1:14 (Wang และ Chang, 1997) นอกจากนี้รายงานของ Hara และคณะ (1988) พบว่าไลโซไซม์ที่แยกได้จาก *Streptomyces erythraeus* สามารถไฮโดรไลซ์ผนังเซลล์ของ *Micrococcus*

lysodeikticus ได้แต่ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ไคทินได้ซึ่งมีความแตกต่างจากไลโซไซม์จากไข่ขาว (HEW lysozyme) ซึ่งมีทั้งแอคติวิตีของ N-acetylmuramidase และ ไคทิเนส การทดลองต่อมา Hara และคณะยังพบอีกว่าไคทิเนสที่แยกได้จาก *Streptomyces erythraeus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันนี้สามารถไฮโดรไลซ์ไคทินแต่ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ผนังเซลล์ของ *Micrococcus lysodeikticus* (Hara และคณะ, 1988)

ถึงแม้การตรวจสอบด้วยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส จะพบแถบโปรตีนเพียง 2 แถบ แต่เมื่อนำไปแยกโดยเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลพบว่ามีแถบที่ติดสีย้อมของไคทิเนสทั้งหมด 5 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตัน นอกจากนี้จะเห็นว่ามีการเลื่อนของแถบแอคติวิตีบางแถบอาจเนื่องมาจากที่ไคทิเนสมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนทำให้น้ำหนักโมเลกุลมีการความคลาดเคลื่อนเนื่องจากปริมาณคาร์โบไฮเดรทที่ประกอบอยู่ด้วยกันกับโปรตีน ส่วนที่แถบของแอคติวิตีย้อมติดสีย้อมของไคทิเนสได้ไม่เท่ากันอาจเนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการคือ ปริมาณโปรตีนไม่เท่ากันจากผลการทดลองในรูปที่ 13ข. แถบที่ 1 ในแถวที่ 2 มีแอคติวิตีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับแถวที่ 1 และ 3 ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในรูปที่ 13ก. แถวที่ 3 (แถบที่ตรงกับแถบของแอคติวิตีแถบที่ 1) ที่ติดสีย้อมโปรตีนจางมากเช่นกัน สาเหตุประการที่ 2 คือเอนไซม์มีความสามารถในการย่อยไคทินได้ไม่เท่ากันเช่น endochitinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไคทินแบบสุ่มภายในสายไคทินจึงสามารถย่อยไคทินได้ดีกว่า chitobiosidase หรือ N-acetylglucosaminidase ผลการทดลองนี้ยังสนับสนุนผลการทดลองที่แยกด้วยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสว่ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ไคทิเนสบางชนิดสูญหายไปหรือลดลงด้วย Robert และ Cabib (1982) ศึกษาการเตรียมไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* สายพันธุ์ QMB 1466 โดยรีเจนเนอเรทเทดไคทินแบบ batch พบว่ามีเอนไซม์บางส่วนที่ไม่เกาะไคทินเช่นเดียวกัน นอกจากนี้การศึกษาถึงความเสถียรของไคทิเนสที่ pH ต่างๆ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่ pH 3.0 แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ถึง 65.05 เปอร์เซ็นต์ จึงคาดว่าแอคติวิตีของเอนไซม์บางส่วนอาจจะสูญเสียไปเมื่อเอนไซม์ถูกชะที่ช่วงปลายของ linear pH gradient (pH 3.1) (รูปที่ 20)

จากการทำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนไปทดสอบไกลโคโปรตีนด้วยการย้อมสีด้วย Periodic Acid Schiff's reagent ซึ่งอาศัยหลักการที่ periodic acid จะออกซิไดซ์หมู่

ไฮดรอกซิลที่ติดกันของพอลีแซคคาไรด์ได้พอลีอัลดีไฮด์ซึ่งซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ fuchsin sulfite ที่อยู่ใน Schiff 's reagent ได้เป็นสารประกอบสีม่วง (McGuckin และ Mckenzie, 1958) พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏในดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจล ติดสีม่วงจางมาก (รูปที่ 15) แสดงว่าไคทิเนสของ *Bacillus cereus* มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน แต่คาดว่ามีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตเพียงเล็กน้อยเนื่องจากติดสีม่วงจางมากเมื่อเปรียบเทียบกับทรานสเฟอริน Kirsch และคณะศึกษาไคทิเนสจากผักชีฝรั่ง *Petroselinum crispum* พบว่าไคทิเนส 3 ชนิด จากทั้งหมด 6 ชนิดเป็นไกลโคโปรตีน ไคทิเนสจากแมลงหลายชนิดมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนด้วยเช่นกัน (Kramerov และคณะ, 1985) แต่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับไคทิเนสจากแบคทีเรีย

การวิจัยนี้ได้ตรวจสอบชนิดของเอนไซม์โดยใช้ p-nitrophenyl-chitooligosaccharides ซึ่งเป็นสับสเตรทอะนาลอกของเอนไซม์สามารถใช้วัดแอคติวิตีของไคทิเนสและใช้เป็นตัวบอกถึงรูปแบบในการเข้าตัดสายไคทินได้ สำหรับ p-nitrophenyl-chitooligosaccharides ที่ใช้ได้แก่ p-nitrophenyl-β-D-N-acetylglucosaminide (pNP-GlcNAc) p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose [pNP-$(GlcNAc)_2$] และ p-nitrophenyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose [pNP-$(GlcNAc)_3$] ซึ่งเป็น dimeric, trimeric และ tetrameric analogs ของ N-acetylglucosamine ที่ใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของ N-acetylglucosaminidase, chitobiosidase (exochitinase)และ endochitinase ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรทเหล่านี้แล้วปลดปล่อย p-nitrophenol ออกมาทำให้สารละลายมีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นด่าง (Robert และ Selitrennikoff, 1988; Tronsmo และ Harman, 1993) จากการทดลองพบว่าไม่มีแอคติวิตีของ N-acetylglucosaminidase และมีแอคติวิตีของ chitobiase มากกว่าแอคติวิตีของ endochitinase ประมาณ 10 เท่า การใช้ nitrophenyl derivatives ของ chitooligosaccharides เป็นตัวตรวจสอบชนิดและหรือตัววัดแอคติวิตีของไคทิเนสนั้นเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่มีราคาแพง ขนาดของแอคติวิตีของไคทิเนสชนิดต่างๆ จะมีความสัมพันธ์กันถ้าเปรียบเทียบภายในสายพันธุ์เดียวกันแต่ไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ (Tronso และ Harman, 1993)

พืชและแบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตไคทิเนสมากกว่า 1 ชนิด เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยไคทิน อนุพันธุ์ของไคทินหรือภาวะเครียด (stress) ยกเว้น *Bacillus cereus* strain 65 ซึ่งเป็น endophyte จากต้นมัสตาด *Sinapis* ซึ่งพบว่าจะผลิตไคทิเนสชนิด chitobiosidase เพียงชนิดเดียวเมื่อเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยคอลลอยดัลไคทินและวัดแอคติวิตีโดยการใช้ p-nitrophenyl chitooligosaccharides (Pleban และคณะ, 1997) การที่เซลล์ขับไคทิเนสหลายชนิดออกมาช่วยเพิ่มโอกาสและประสิทธิภาพในการย่อยไคทินให้ดีขึ้น เซลล์ที่มี endochitinase จำนวนมากน่าจะช่วยให้เซลล์เจริญได้เร็วขึ้นมากด้วยเนื่องจากจะทำให้สายพอลีเมอร์ของไคทินถูกย่อยเป็นสายสั้นๆ และช่วยเพิ่มจำนวนปลาย nonreducing ให้แก่เอนไซม์เหมาะแก่การย่อยให้เล็กลงด้วย chitobiosidase หรือ N-acetyl-β-D-glucosaminidase ต่อไป

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสพบว่าเอนไซม์อย่างหยาบและเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 เช่นเดียวกัน แต่เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินจะมีช่วงกว้างในการทำงานมากกว่าคือ ช่วง pH 4-6 ในขณะที่เอนไซม์อย่างหยาบทำงานได้ดีในช่วง pH 4-5 เอนไซม์ทั้งสองส่วนจะสูญเสียแอคติวิตีมากในช่วง pH ที่เป็นด่าง ส่วนความเสถียรต่อ pH ต่างๆ นั้นพบว่าเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินค่อนข้างเสถียรในช่วง pH 4-10 ผลงานนี้สอดคล้องกับรายงานของ Park และคณะ (1997) ซึ่งระบุว่าไคทิเนสจากพืชและจุลชีพส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีในช่วง pH 4.0-7.5 Pleman และคณะ (1997) รายงานค่า pH ที่เหมาะสมของไคทิเนสอย่างหยาบจาก *Bacillus cereus* strain 65 คือ 4.5-7.5 และมีความเสถียรในช่วง pH 4.0-8.5 อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* มี pH เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 8.5-9.0 และ *Saccharomyces cerevisiae* มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 1.5-2.5 ซึ่งเป็นภาวะที่เป็นกรดจัด Inglis และคณะ (1997) อธิบายเหตุผลที่ไคทิเนสทำงานไม่ดีในด่างว่าเนื่องจากกรดอะมิโนที่ active site ซึ่งจำเป็นต่อการไฮโดรไลซ์พันธะ glycosidic เป็นกรดอะมิโนชนิดกรดซึ่งไวต่อด่าง (Inglis และคณะ, 1997)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างหยาบจะแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินคือเอนไซม์อย่างหยาบทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศา

เซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินจะเสียสภาพ และไม่มีแอคติวิตีแต่จะทำงานได้ดีที่ 40-50 องศาเซลเซียส

การที่เอนไซม์อย่างหยาบและเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีรูปแบบแตกต่างกันน่าจะเนื่องมาจากส่วนประกอบในเอนไซม์อย่างหยาบและในเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมีความแตกต่างกัน ในเอนไซม์อย่างหยาบมีโปรตีน สารเคมีขนาดเล็กบางชนิด และอิออนของโลหะต่างๆ ที่ช่วยสร้างความเสถียรหรือไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วที่ได้กำจัดโปรตีนและสารอื่นๆที่ปนอยู่ออกไปเป็นจำนวนมาก มีรายงานว่าอิออนหลายชนิดมีผลต่อการทำงานของไคทิเนส (Wang และ Chang, 1987; Hiraga และคณะ, 1997; Sakai และคณะ, 1998)

ไคทิเนสสามารถย่อยสับสเตรทได้หลายชนิด ในการศึกษานี้ได้ทดสอบความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่าไคทิเนสสามารถย่อยคอลลอยด์ไคทินได้ดีที่สุด รองลงมาคือรีเจนเนอเรทไคทิน ไกลคอลไคทิน (6-O-ไฮดรอกซีเอทธิลไคทิน) ไคทินผงบริสุทธิ์ ไกลคอลไคโตแซน และไคโตแซน (~90% deacetylation) ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสได้และเมื่อพิจารณาโครงสร้างของเซลลูโลสและไคทินแล้วมีความแตกต่างกันเฉพาะหมู่ R ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เท่านั้นคือเป็น –OH group และ –acetamido group ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไคทิเนสมีความจำเพาะกับ –acetamido group ของ N-acetylglucosamine ที่ต่อกันเป็นสาย ซึ่งให้ผลเหมือนกับไคทิเนสจาก *Tricoderma hazianum* (Ulhoa และ Peberdy, 1992) จากผลการทดลองนี้มีข้อน่าสังเกตว่าไคทิเนสสามารถย่อยไคทินได้ดีกว่าไคโตแซนแสดงว่าไคทิเนสมีความจำเพาะกับ GlcNAc-GlcNAc ซึ่งเป็น homooligosaccharides มากกว่า GlcNAc-GlcN หรือ GlcN-GlcNAc ซึ่งเป็น heterooligosaccharides Brameld และคณะ (1998) อธิบายกลไกการไฮโดรไลซ์ไคทินของไคทิเนส Family 18 ซึ่งเป็นไคทิเนสตระกูลที่พบมากในพืช สัตว์ แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยอาศัย hevamine เป็นต้นแบบพบว่า oxazoline ion intermediate ที่เกิดขึ้นระหว่างการไฮโดรไลซิสต้องการหมู่ acetamido ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในการเกิดพันธะโควาเลนท์กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของ N-acetylglucosamine (Brameld และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตามไคทิเนสสามารถย่อยไกลคอลไคโตแซนได้ประมาณ 29.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับไกลคอลไคทิน ตามรายงานของ Inui และคณะ

(1996) พบว่าไคทิเนสจาก *Bacillus* สามารถย่อย series ของ N-acyl analogues และอนุพันธุ์ของไคทินบางชนิดที่ประกอบด้วย 6-O-substitute ซึ่งได้แก่ 6-O-hydroxyethylchitin (glycol chitin หรือ HE-chitin) และ 6-O-carboxymethychitin (CM-chitin) เป็นต้น และถ้าหากปริมาณของหมู่ 6-O-hydroxyethyl สูงจะทำให้ค่า Km เพิ่มขึ้น และ Vmax ลดลง ส่วนในกรณีที่ไคทิเนสไม่ย่อยไคทินผงที่ไม่บริสุทธิ์แต่ย่อยไคทินผงที่บริสุทธิ์แล้วนั้นให้ผลเช่นเดียวกับ Ohtakara และคณะ (1979) จึงคาดว่าอาจมีอิออนของโลหะต่างๆ ปนอยู่มากในไคทินผงที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งอาจไปมีผลต่อการแอคติวิตีของเอนไซม์ อิออนของโลหะที่มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ Ag^{+} Mn^{2+} Mg^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของไคทิเนสมีค่า Km ของไคทิเนสเท่ากับ 0.922 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินยังไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นหากมีการศึกษาเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วผลที่ได้น่าจะแตกต่างจากการวิจัยนี้ มีรายงานหลายรายงานได้อธิบายถึงจลนพลศาสตร์ของไคทิเนสโดยใช้คอลลอยดัลไคทินซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำว่าไคทิเนสจะไม่ผ่านเข้าไปภายในอนุภาคของไคทิน แต่จะadsorb และทำการไฮโดรไลซ์ไคทินที่บริเวณผิวด้านนอกของอนุภาคไคทิน ดังนั้นสมบัติจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่เกาะอยู่ที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคไคทินจึงมีลักษณะคล้ายกับการทำงานของเอนไซม์ในสารละลาย และคำนวณหาค่า Km หรือ Vmax ของเอนไซม์ได้โดยอาศัยหลักการเดียวกัน (Skujins และคณะ, 1970; Young และ Bell, 1984)

จากการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* เปรียบเทียบกับไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ที่ใช้ในทางการค้าโดยดูจากขนาดวงใสที่เกิดขึ้นพบว่าไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* สามารถย่อยคอลลอยดัลไคทินได้ดีกว่าไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* เล็กน้อย

สรุปผลการทดลอง

1. *Bacillus* sp. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็น *Bacillus cereus* คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย และสามารถผลิตไคทิเนสออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตไคทิเนสพบว่าแบคทีเรียจะผลิตไคทิเนสได้ก่อนที่จะสังเกตเห็นการเจริญของเซลล์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ 32 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่และระดับเอนไซม์ยังคงสูงอยู่ตลอด 120 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา

3. ไคทิเนสที่เชื้อผลิตได้สามารถย้อมติดสีย้อมไคทิเนสในเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสทั้งหมด 5 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตัน ในขณะที่แยกในดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส ได้เพียง 2 แถบ

4. เอนไซม์มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน

5. ขั้นตอนในการทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 27.78 เท่า และมีผลผลิตเอนไซม์ 28.89 เปอร์เซ็นต์

6. pHและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างหยาบในการย่อยคอลลอยดัลไคทินคือ 5.0 และ 60-65 องศาเซลเซียส

7. ส่วน pHและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินแล้วคือ 4-6 และ 40-50 องศาเซลเซียส

8. เอนไซม์ค่อนข้างเสถียรในช่วง pH ที่กว้างคือ pH 4-10

9. เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทิน รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไคทินผงที่บริสุทธิ์ ไกลคอลไคโตแซน และ ไคโตแซน (~90% deacetylation)ได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย และไม่ไฮโดรไลซ์ไคทินผง (ที่ไม่บริสุทธิ์ขนาด 60 mesh) เซลลูโลส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส

10. เอนไซม์มีแอคติวิตีของไคโทไบโอซิเดสและเอ็นโดไคทิเนสเท่ากับ 24.60 และ 2.43 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่มีแอคติวิตีของเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส

11. ค่า Km ของเอนไซม์ต่อคอลลอยดัลไคทินเท่ากับ 0.922 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย