บทที่ 3
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

1. การแยก และคัดเลือกยีสต์

จากตัวอย่าง ผลไม้ และ ดิน ที่นำมาแยกยีสต์ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นวายเอ็ม ทั้งหมด 54 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาทดสอบแบบรวดเร็วตามวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975) พบยีสต์ที่ให้ผลบวก 8 สายพันธุ์ ที่ให้ปฏิกิริยาสีม่วงแดงถึงน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะให้สีที่มีความเข้มต่าง ๆ กัน ได้จัดลำดับความเข้มดังตารางที่ 2 โดยสีม่วงแดงถึงน้ำตาลเข้มนี้ แสดงสีของไคตินหรือไคโตซานที่ผนังเซลล์ ซึ่งได้จากปฏิกิริยาตามวิธีดังกล่าว เมื่อตรวจพบไคตินหรือไคโตซาน จึงคาดว่ายีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสได้ เช่นเดียวกับรายงานของ White และคณะ (1979) ที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจผนังเซลล์ของรา *Mucor rouxii* ที่ผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ซึ่งมีไคโตซานเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จากวิธีดังกล่าวนี้สามารถคัดเลือกยีสต์ที่ให้ผลบวก 8 สายพันธุ์จาก 54 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ MS_1 MS_2 MS_3 MS_4 MS_5 MS_6 MS_7 และ MS_8 ดังแสดงในรูปที่ 5

รูปที่ 4 สีที่เกิดจากปฏิกิริยาการทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test)

หมายเหตุ 1 คือ หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อ

2 คือ หลอดควบคุมที่มีการเติมเชื้อ ที่ไม่เกิดปฏิกิริยา

$MS_1 - MS_8$ เป็นปฏิกิริยาสีที่เกิดจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ 8 สายพันธุ์

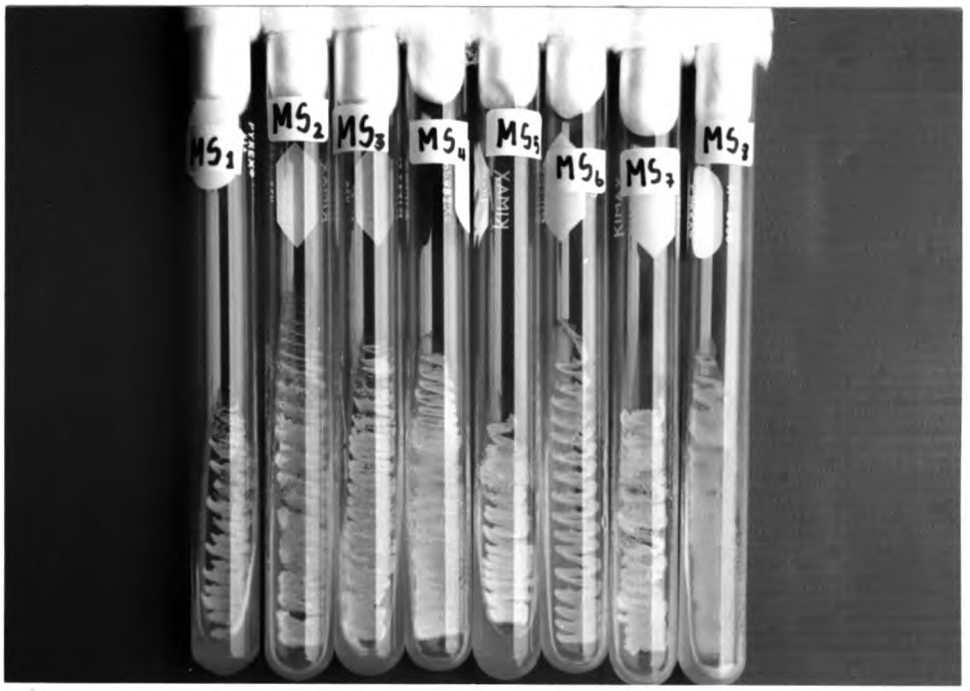
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลของการทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test) ตามวิธีของ Prakasam และ Azariah (1975)

สายพันธุ์	ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็งวายเอ็ม	แหล่งที่มา ผลไม้และดิน	Rapid test
MS_1	สีขาวขุ่น ผิวด้าน กลมขอบเรียบ Ø 0.5 - 0.8 มิลลิเมตร	ลำไย	+
MS_2	สีขาวขุ่น ผิวมันวาว กลมขอบเรียบ Ø 1.5 –2.0 มิลลิเมตร	องุ่น	+
MS_3	สีขาวขุ่น ผิวแห้ง นูน Ø 2.0 –2.5 มิลลิเมตร	องุ่น	+
MS_4	สีขาวขุ่น กลม ขอบไม่เรียบ Ø 2.0 – 2.5 มิลลิเมตร	ชมพู่	+
MS_5	สีขาวขุ่น กลมขอบไม่เรียบ Ø 1.8 – 2.0 มิลลิเมตร	เงาะ	+++
MS_6	สีขาวขุ่น ผิวมันวาว กลม ขอบเรียบ Ø 1.5 – 1.8 มิลลิเมตร	ฝรั่ง	+
MS_7	สีขาวขุ่น ผิวแห้ง ขอบไม่เรียบ Ø 1.8 – 2.0 มิลลิเมตร	ดิน	++
MS_8	สีชมพูอ่อนใส ผิวมัน เยิ้ม Ø 1.5 – 1.8 มิลลิเมตร	อังคณา , 2540	+++

\+ หมายถึง ความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของการทดสอบแบบรวดเร็ว เกิดสีน้อย

++ หมายถึง ความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของการทดสอบแบบรวดเร็ว เกิดสีปานกลาง

+++ หมายถึง ความเข้มของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของการทดสอบแบบรวดเร็ว เกิดสีเข้ม

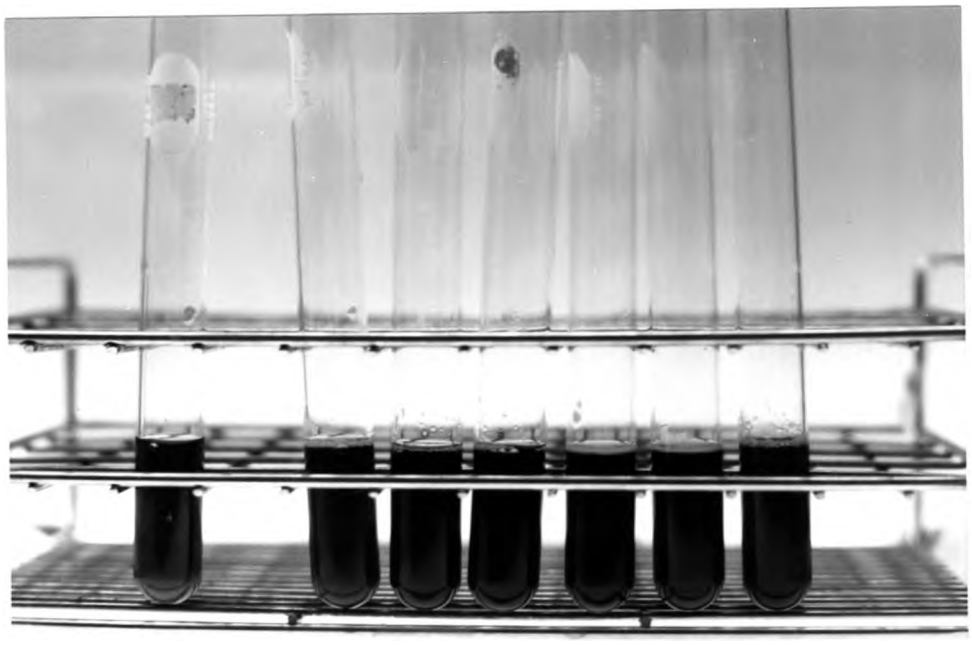


รูปที่ 5 แสดงลักษณะยีสต์ที่คัดเลือกได้ 8 สายพันธุ์ เจริญบนอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม

นำยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์มาทดสอบแหล่งของไคตินดีอะเซทิเลส และระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวสูตรวายพีจี บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 , 24 , 48 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่แยกเซลล์ออกแล้วมาศึกษา เป็นแหล่งเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ ส่วนเซลล์ยีสต์ถูกนำมาบดเพื่อศึกษาเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีการเทียบสีของ Ride และ Drysdale (1972) สีปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 6 ส่วนผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3 โดยสามารถตรวจพบไคตินดีอะเซทิเลสได้ทั้งภายในเซลล์ยีสต์ และส่วนที่ขับออกนอกเซลล์ของยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์ แต่จะพบเอนไซม์ส่วนที่ขับออกนอกเซลล์เป็นปริมาณที่สูงกว่า ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์นี้ถูกตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และจากผลการทดลอง พบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ทั้งหมดมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 20.26 มิลลิยูนิต ซึ่งผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์ MS_8 และแอคติวิตีที่ต่ำสุดผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์ MS_5 คือ 1.67 มิลลิยูนิต ซึ่งการตรวจพบปริมาณเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์สูงกว่าที่อยู่ภายในเซลล์นี้ สอดคล้องกับรายงานของ Siegrist และ Kauss (1990) ที่ศึกษาไคตินดีอะเซทิเลสใน *Colletotrichum lindemuthianum* และ *Colletotrichum lagenarium* พบว่าเป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ถึง 25 เท่า และรายงานของ นันทนา (พ.ศ. 2542) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* NS_1 จะขับเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสออกนอกเซลล์ ส่วนเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จะพบในปริมาณที่น้อยกว่า

ส่วนในแบคทีเรีย Ohishi และคณะ (1997) ตรวจพบเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสในส่วนน้ำใส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ของเชื้อ *Vibrio alginolyticus* H8 ในทางตรงกันข้ามไคตินดีอะเซทิเลสที่ผลิตโดย *Mucor rouxii* เป็นเอนไซม์ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์มากกว่า คือ ประมาณ 49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าจากส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์ ที่พบรองลงมา คือ 37 เปอร์เซ็นต์ และที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ 14 เปอร์เซ็นต์ (Davis และ Bartinicki-Garcia ,1984)

โดยที่ยีสต์สายพันธุ์ MS_1 และ MS_8 มีการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสแอคติวิตีสูงเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น (จากตารางที่ 3) ดังนั้นจึงได้เลือกยีสต์สายพันธุ์ MS_1 และ MS_8 ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และเวลาในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส คือ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 6 สีปฏิกิริยาของการตรวจสอบเอนไซม์โดยวิธีการเทียบสี
(Colorimetric method) ของ Ride และ Drysdale (1972)

I20515200

ตารางที่ 3 แหล่งของไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ 8 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายพีจี ทดสอบโดยวิธีเทียบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของ Ride และ Drysdale (1972)

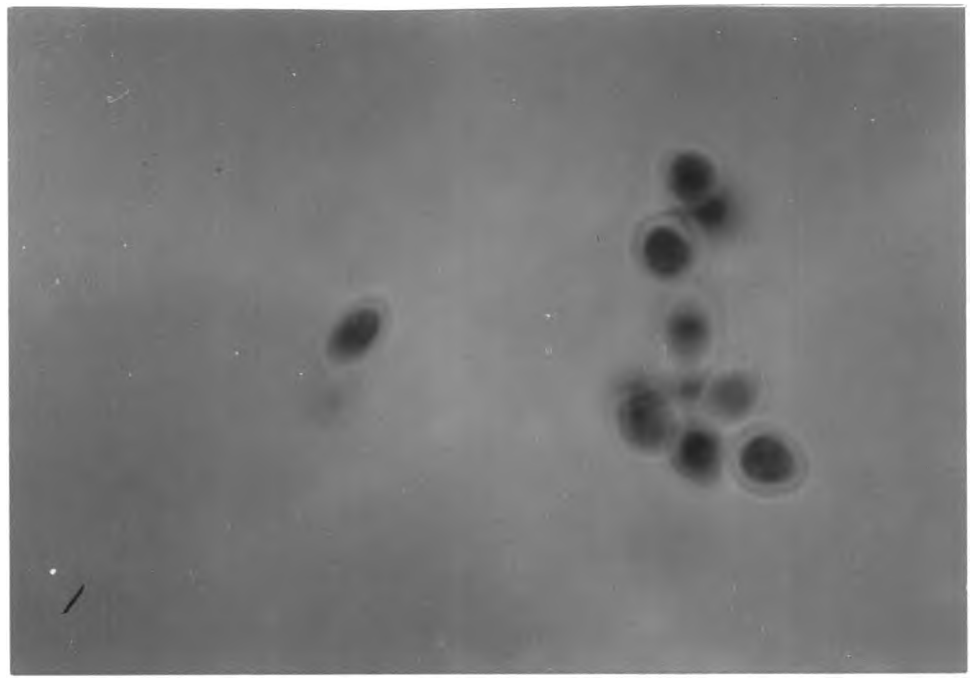
สายพันธุ์	เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดในเซลล์ (Intracellular enzyme) mU	ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดที่ขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) mU
MS_1	14	0.1610	15.23
	24	0.2113	13.50
	48	0.1093	17.85
	96	0.1420	17.42
MS_2	14	0.1528	7.09
	24	0.1011	8.59
	48	0.1030	15.54
	96	0.1634	15.20
MS_3	14	0.1747	7.83
	24	0.2017	6.48
	48	0.1914	13.82
	96	0.1679	15.82
MS_4	14	0.2097	2.72
	24	0.2480	8.45
	48	0.2419	12.38
	96	0.2220	15.41
MS_5	14	0.2021	16.00
	24	0.1689	1.67
	48	0.1646	12.02
	96	0.1889	15.62
MS_6	14	0.2355	8.35
	24	0.1678	11.59
	48	0.1360	16.89
	96	0.1396	16.65
MS_7	14	0.1430	7.40
	24	0.0900	1.79
	48	0.1266	16.33
	96	0.0935	14.68
MS_8	14	0.1167	19.31
	24	0.0972	20.26
	48	0.1173	16.82
	96	0.1200	16.19

2. **การจำแนกยีสต์**

นำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จากการทดลองข้อ 1 ที่ผลิตไคตินดีอะเซทิเลสแอคติวิตีสูง คือ สายพันธุ์ MS$_1$ และ MS$_8$ มาจัดจำแนกสายพันธุ์ทางอนุกรมวิธาน โดยวิธีของ Lodder (1970) และ Beneke (1970) ศึกษาสัณฐานวิทยา ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

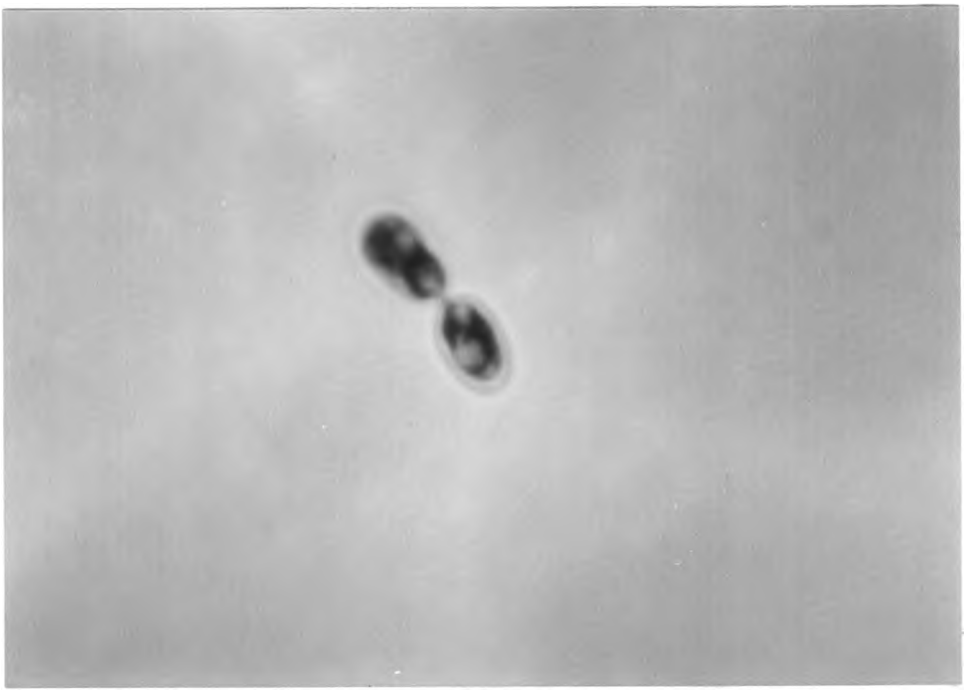
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาการจำแนกยีสต์ทางสัณฐานวิทยา

สายพันธุ์ยีสต์	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ตรวจพบ
MS$_1$	รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดของเซลล์ประมาณ 4 x 5 ไมครอน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการแตกหน่อแบบ multilateral budding ดังแสดงในรูปที่ 7 มีการเจริญบนผิวของอาหารทำให้เกิดฝ้าที่ผิวอาหารเหลว ดังแสดงในรูปที่ 8
MS$_8$	รูปร่างกลมรี มีขนาดของเซลล์ประมาณ 4 x 7 ไมครอน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการแตกหน่อแบบ multilateral budding ดังแสดงในรูปที่ 9 ไม่มีการเจริญแบบฝ้าที่ผิวอาหาร ยีสต์สร้างรงควัตถุสีส้ม (orange pigment) ดังแสดงในรูปที่ 10

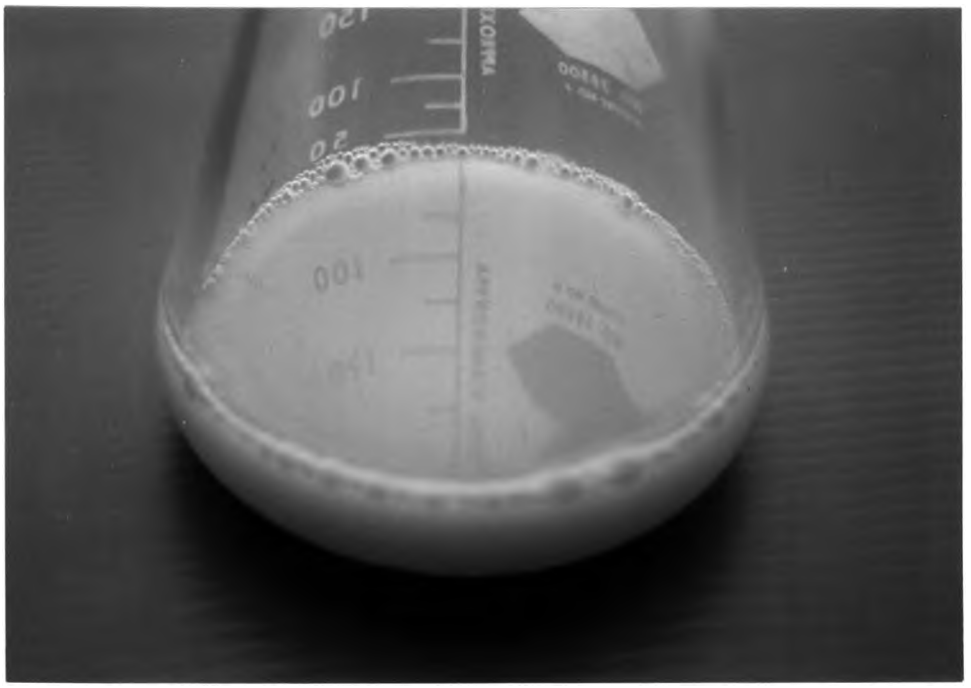


รูปที่ 7 แสดงลักษณะของยีสต์ MS, ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 8 แสดงลักษณะการเจริญแบบฝ้าของยีสต์ MS, บนผิวของอาหารเหลววายเอ็ม



รูปที่ 9 แสดงลักษณะยีสต์ MS_8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 10 แสดงสีของรงควัตถุสีส้มของยีสต์ MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็ม

และศึกษาทางสรีรวิทยา พบว่ายีสต์ MS_1 สามารถหมักน้ำตาล และใช้น้ำตาลได้ชนิดเดียว คือ กลูโคส โดยสังเกตุ จากแก๊สที่เกิดในหลอดดูแรห์มจากอาหารทดสอบการหมักน้ำตาล และการเจริญจากความขุ่นของเชื้อในอาหารทดสอบการใช้น้ำตาล ส่วนยีสต์สายพันธุ์ MS_8 ไม่มีความสามารถในการหมักน้ำตาล แต่สามารถใช้น้ำตาลเกือบทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้นน้ำตาลแลคโตส ผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาการหมักและการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ

การหมักน้ำตาล (Fermentation)	กลูโคส	กาแลคโตส	ซูโครส	มอลโตส	แลคโตส	เทฮาโลส	ราฟฟิโนส	ไซโลส
MS_1	+ / G	- / NG	- / NG	- / NG	- / NG	- / NG	- / NG	- / NG
MS_8	+ / NG	+ / NG	+ / NG	+ / NG	+ / NG	+ / NG	+ / NG	+ / NG
การใช้น้ำตาล (Assimilation)								
MS_1	+	-	-	-	-	-	-	-
MS_8	+	+	+	+	-	+	+	+

G หมายถึง มีแก๊สเกิดขึ้น

NG หมายถึง ไม่มีแก๊สเกิดขึ้น

\+ หมายถึง เกิดความขุ่น เนื่องจากการเจริญของเชื้อ

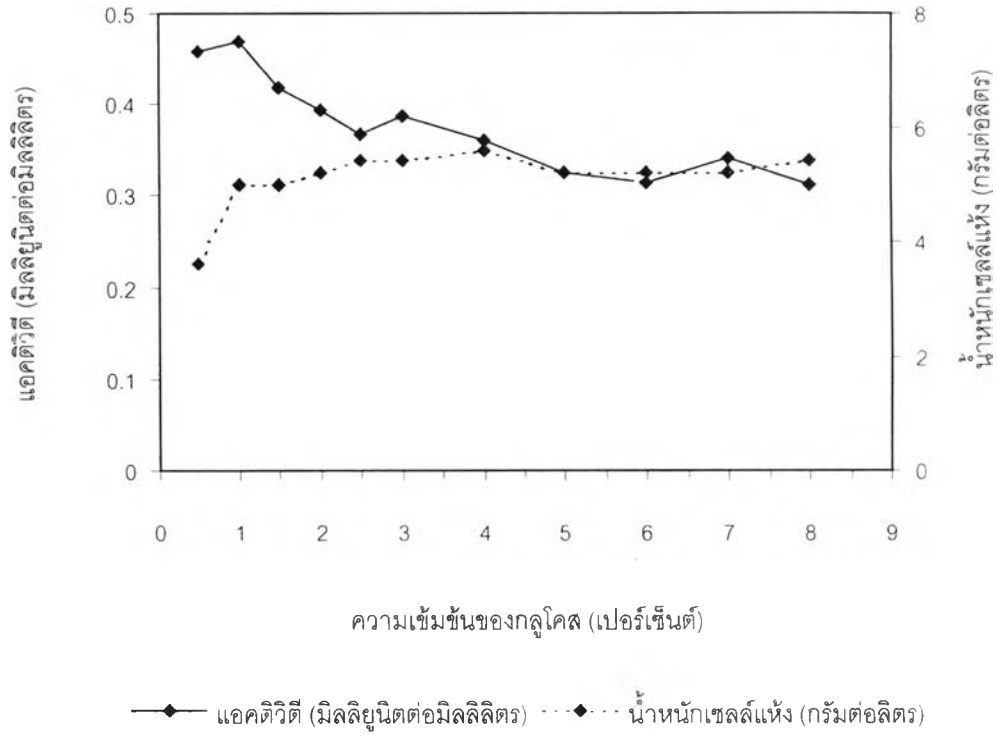
\- หมายถึง ไม่เกิดความขุ่น เนื่องจากไม่มีการเจริญของเชื้อ

จากการศึกษา สัณฐานวิทยา และสรีรวิทยาการหมักและการใช้น้ำตาล พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ MS_1 ให้ผลปฏิกิริยาการจัดจำแนกตาม Beneke (1970) เป็นสายพันธุ์ยีสต์ *Candida krusei* ส่วน MS_8 จำแนกได้เป็นยีสต์ *Rhodotorular rubra* ตามการจัดจำแนกตามคู่มือของ Lodder (1970) ต่อไปในการทดลอง วิทยานิพนธ์เล่มนี้จะใช้ชื่อตามที่จำแนกได้ และจะเรียก MS_1 ว่า *C. krusei* MS_1 และ MS_8 ว่า *R. rubra* MS_8

3. การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

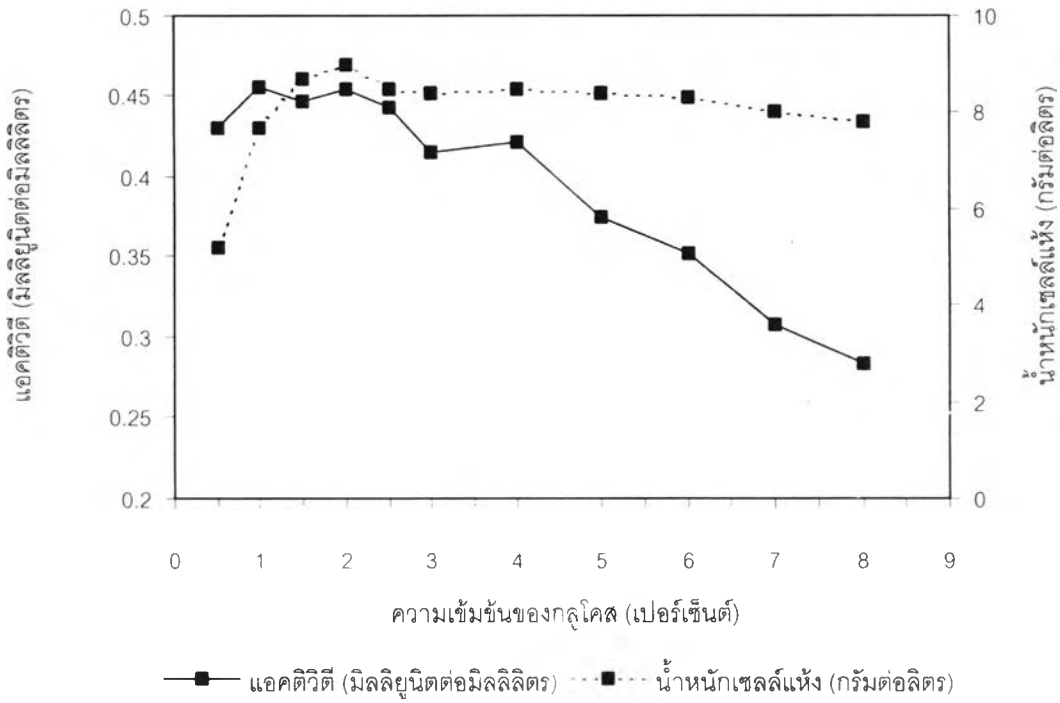
3.1 แหล่งคาร์บอน

หลังจากนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาทดสอบการใช้น้ำตาล ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 พบว่า *C. krusei* MS_1 ใช้แหล่งคาร์บอนได้ชนิดเดียว คือ กลูโคส ดังนั้นจึงเลี้ยง *C. krusei* MS_1 ในอาหารสูตรวายพีจี โดยมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส ตั้งแต่ 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลสสูงสุด คือ 0.4686 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และแอคติวิตีจะลดลง เมื่อมีความเข้มข้นของกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 11 ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของกลูโคสที่สูง มีผลยับยั้งการสร้างไคตินดีอะเซทิเลส การใช้กลูโคสความเข้มข้นต่ำในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลสนั้น สอดคล้องกับรายงานของ Kafetzopaulos และคณะ (1993) ที่ใช้กลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยง *Mucor rouxii* เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส , Alfonso และคณะ (1995) ใช้กลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยง *Aspergillus nidulan* เพื่อศึกษาบทบาทของไคตินดีอะเซทิเลสที่ทนร้อน ต่อการย่อยผนังเซลล์ของรา Tokuyasu และคณะ (1996) ใช้กลูโคสความเข้มข้นเพียง 0.4 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงรา *Colletotrichum lindemuthianum* ซึ่งเป็นราก่อโรคพืชที่สร้างไคตินดีอะเซทิเลส และ Ohishi และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ใช้กลูโคสความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* H8 เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ *Candida krusei* MS_1 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



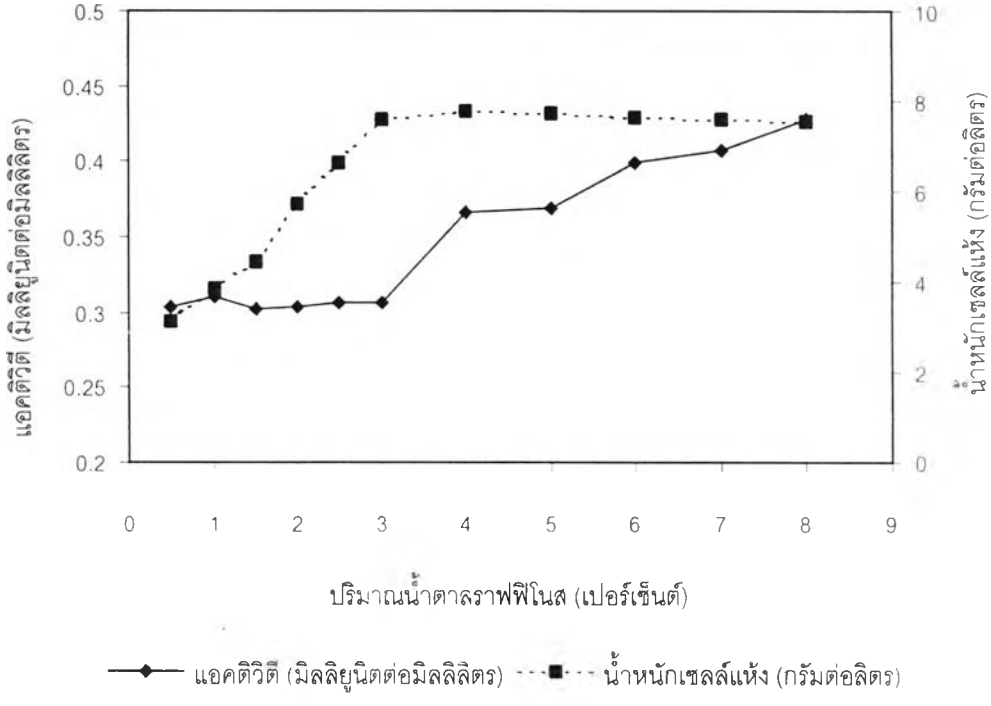
รูปที่ 11 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 2 องศา เซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 1)

ส่วนยีสต์ *R. rubra* MS_8 นั้น สามารถเจริญได้ในน้ำตาลหลายชนิด ได้เลือกน้ำตาลที่ยีสต์เจริญได้ดีสองอันดับ คือ กลูโคส และราฟฟิโนส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิด ตั้งแต่ 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4559 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแอคติวิตีจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้น ของกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นกลูโคส ในช่วง 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศา เซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
(ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 2)

แต่เมื่อใช้ราฟฟิโนสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของแหล่งคาร์บอน ไม่ได้ทำให้การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสลดลง แต่แอคติวิตีกลับเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ราฟฟิโนสความเข้มข้นสูง โดยที่ความเข้มข้นของราฟฟิโนสสูงถึง 4 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตี 0.3670 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ราฟฟิโนสความเข้มข้นต่ำ 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้แอคติวิตีอยู่ในช่วง 0.30 – 0.31 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 13 แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลูโคสและราฟฟิโนสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์ *R. rubra* MS_8 จะให้แอคติวิตีสูงกว่าเมื่อใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้น้ำตาลกลูโคสยังมีราคาถูกกว่าน้ำตาลราฟฟิโนส จึงเลือกกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับยีสต์ *R. rubra* MS_8 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

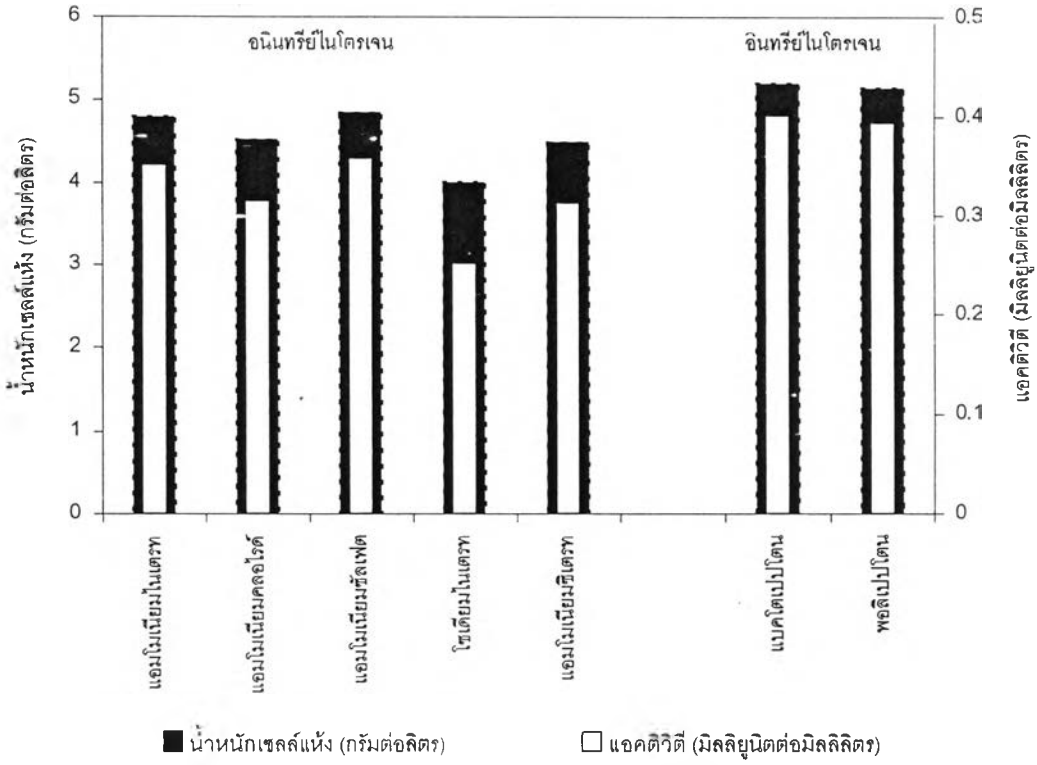


รูปที่ 13 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นราฟฟิโนส ในช่วง 0.5 – 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศา เซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 3)

3.2 ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

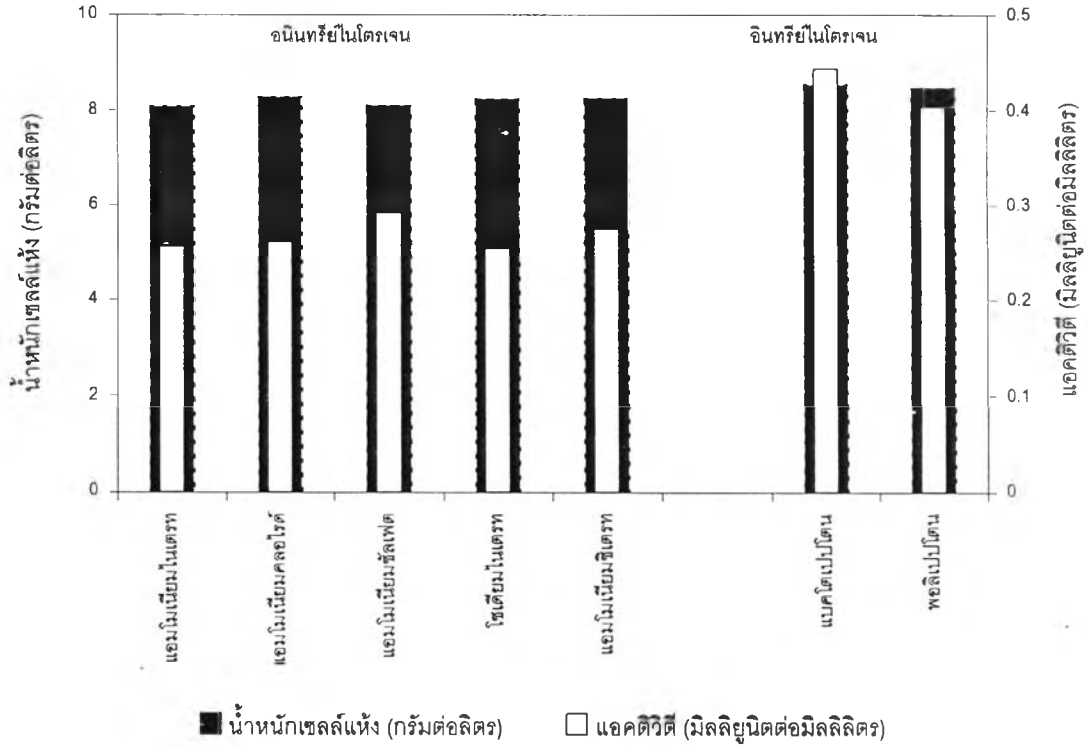
3..2.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MS_1 และสายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 โดยเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลววายพีจี ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยมีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 5 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมไนเตรท และ แอมโมเนียมซิเตรท สำหรับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด คือแบคโต-เปปโตน และพอลิเปปโตน ที่มีความเข้มข้นชนิดละ 1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *C. krusei* MS_1 ใช้ทั้งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนในการเจริญ และ ผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ผลแสดงดังรูปที่ 14 เมื่อใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแบคโตเปปโตน ยีสต์เจริญสูงสุดมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 8.2 กรัมต่อลิตร และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 0.4011 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกแบคโตเปปโตนเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อใช้ในการทดลองแปรผันปริมาณต่อไป เมื่อใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แอมโมเนียมไนเตรท จะให้แอคติวิตีสูงใกล้เคียงกันกับเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต คือ 0.3512 และ 0.3576 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่แอมโมเนียมไนเตรทมีราคาถูกกว่า จึงเลือกแอมโมเนียมไนเตรท มาใช้เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน มาใช้ในการทดลองแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 14 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และการผลิต ไคตินดีอะ-เซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 4)

ส่วนยีสต์ *R. rubra* MS_8 ใช้แหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ในการเจริญได้ดีเท่าๆ กัน โดยเปรียบเทียบได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ หลังการเลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 15 แต่ยีสต์จะผลิตไคตินดีอะเซทิเลสได้สูงสุดเท่ากับ 0.4434 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน คือ แบคโตเปปโตน ดังนั้นจึงเลือกแบคโตเปปโตนมาใช้ในการทดลองแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่อไป

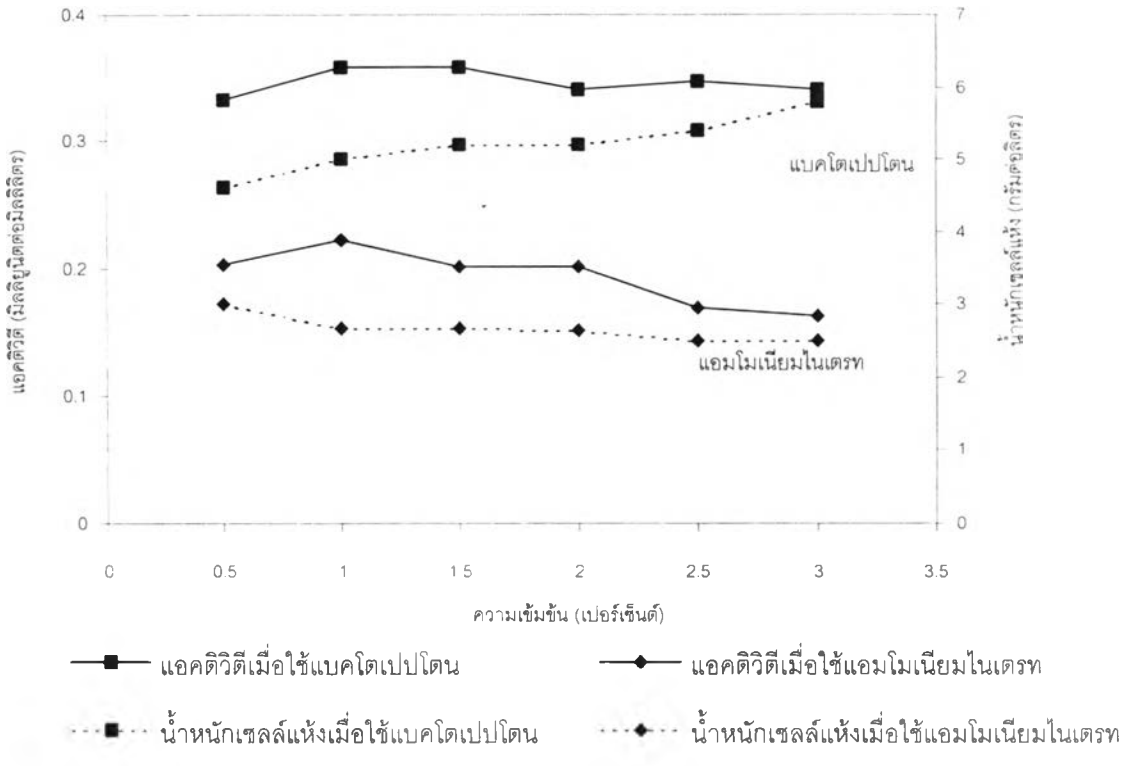


รูปที่ 15 เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และ การผลิตไคตินดีอะ-เซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 5)

ผลการทดลองในการเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือ แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงยีสต์ เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับในการทดลองของ นันทนา (พ.ศ. 2542) ใช้แบคโตเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับการเลี้ยง *R. oligosporus* NS_1 เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส Ohishi และคณะ (1997) ใช้แบคโตเปปโตน เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *V. alginolyticus* H8 และ Kafetzopaulos (1993) ใช้พอลิเปปโตนซึ่งเป็นอินทรีย์ไนโตรเจน ในการเลี้ยง *M. rouxii* เพื่อผลิตไคตินดีอะ-เซทิเลส

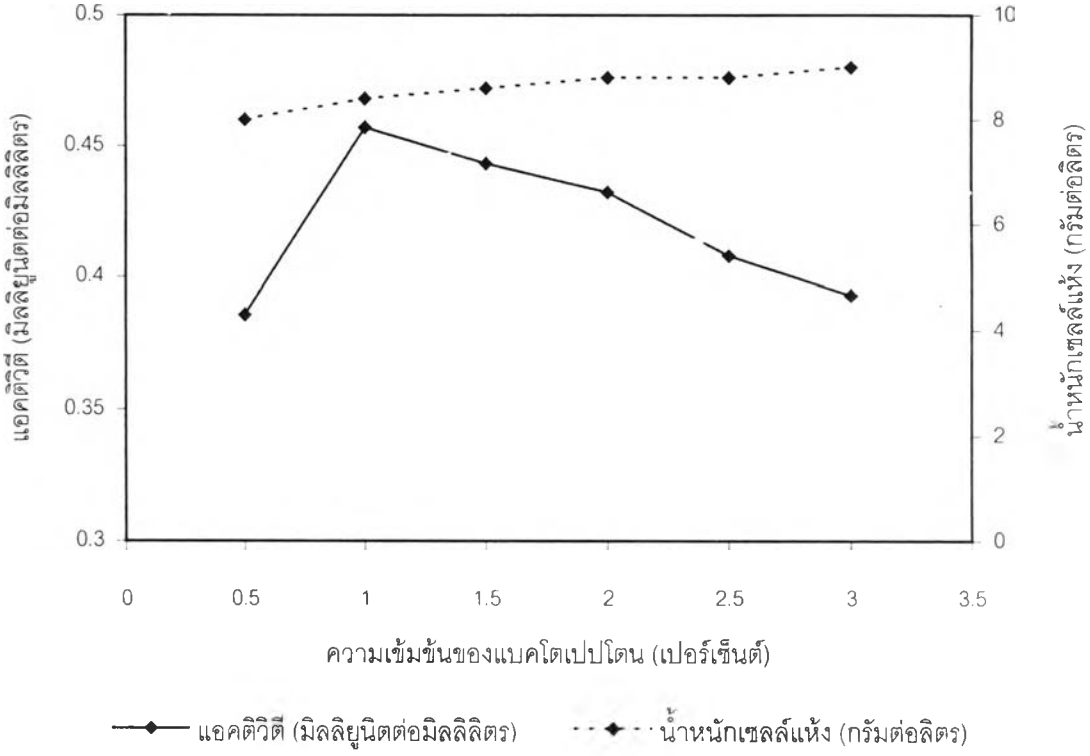
3.2.2 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เลือกได้จากการทดลองในข้อ 3.2.1 คือ แบคโตเปปโตน และ แอมโมเนียมไนเตรท สำหรับยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ แบคโตเปปโตน สำหรับยีสต์สายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 แล้วแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เลือกนี้ตั้งแต่ 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสำหรับ *C. krusei* MS_1 จะมีไคตินดีอะเซทิเลสแอคติวิตีสูงสุด 0.3587 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแบคโตเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.2211 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อมีความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 16 จากการทดลองยังพบว่า เมื่อยีสต์ *C. krusei* MS_1 ใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแบคโตเปปโตนในการเจริญ จะผลิตไคตินดีอะเซทิเลสได้ดีกว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ดังนั้นจึงเลือกแบคโตเปปโตน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 ต่อไป



รูปที่ 16 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน ในช่วง 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมไนเตรทในช่วง 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและการผลิต ไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 6)

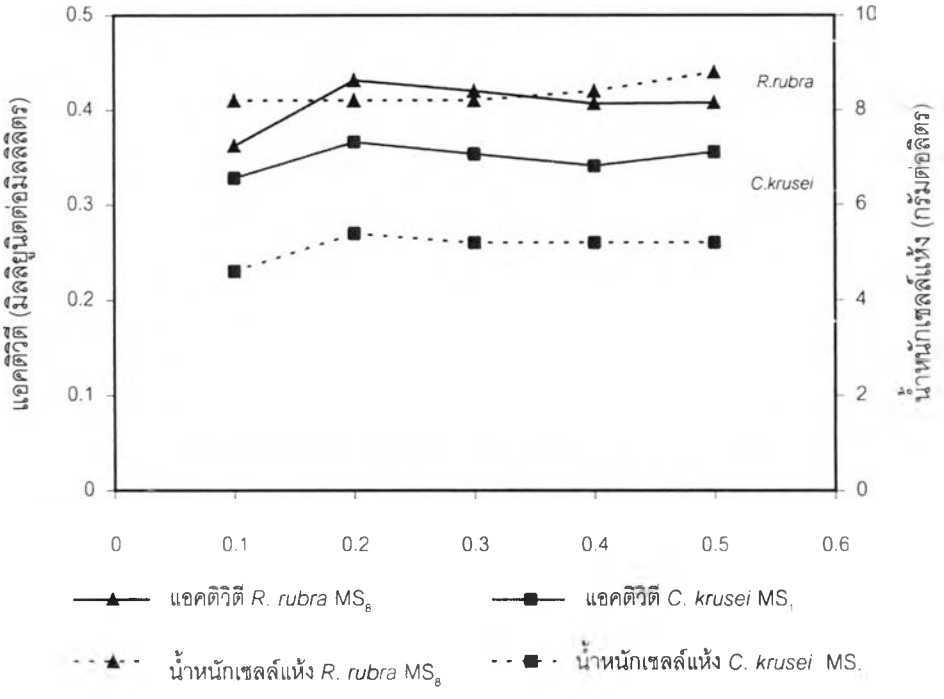
ส่วนใน *R. rubra* MS_8 พบว่าเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสมีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4570 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแบคโตเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 17 ดั้งนั้นจึงเลือกแบคโตเปปโตนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับยีสต์ *R. rubra* MS_8 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน ที่ใช้สำหรับยีสต์ทั้งสองนี้ มีความเข้มข้นต่ำกว่าที่ใช้ในการเลี้ยงรา *R. oligosporus* NS_1 (นันทนา , พ.ศ. 2542) ซึ่งใช้ที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 17 ผลการแปรผันความเข้มข้นของแบคโตเปปโตน ในช่วง 0.5 – 3.0 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 7)

3.3 แหล่งวิตามินรวม

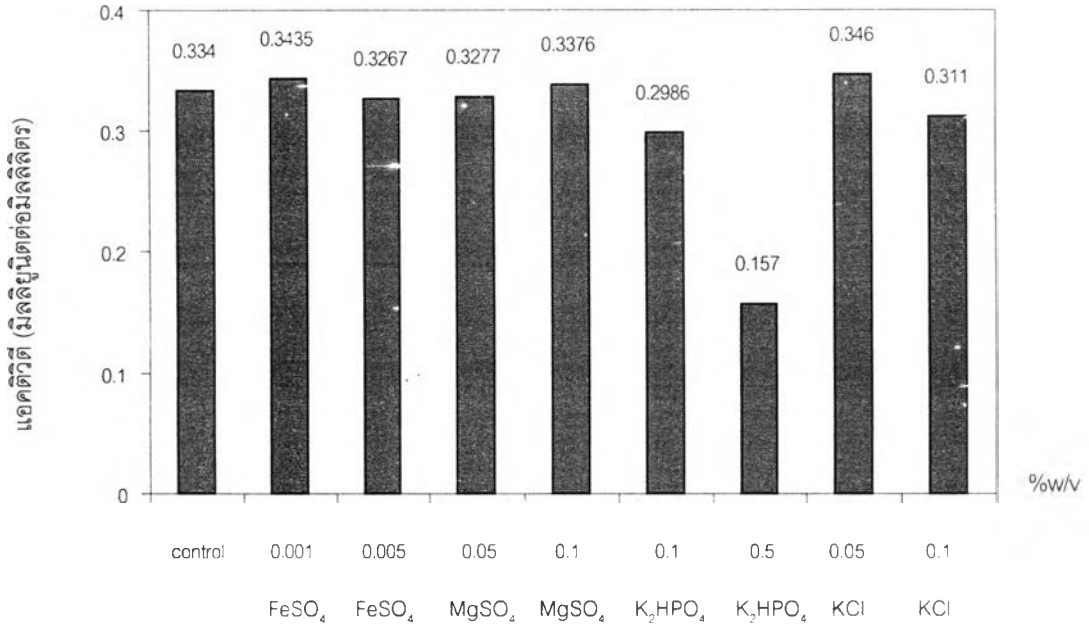
ใช้สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรปริมาณให้มีความเข้มข้น 0.1 – 0.5 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร พบว่าทั้ง *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 ให้แอคติวิตีสูงสุดเมื่อมี 0.2 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามิน คือ 0.3663 และ 0.4315 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18 ในขณะที่การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *Rhizopus oligosporus* NS_1 (นันทนา , พ.ศ. 2542) ใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงยีสต์ถึง 0.2 เปอร์เซ็นต์ Kafetzopoulos และคณะ (1993) ใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *M. rouxii* ในการวิจัยของ Goa และคณะ (1995) ได้ใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงรา *A. coerulea* แต่ในการทดลอง ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ใช้สารสกัดจากยีสต์เพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเติมสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่มากขึ้น ไม่มีผลต่อการเจริญและผลิตไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ สังเกตุได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ และแอคติวิตี มีค่าใกล้เคียงกัน แต่พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นยังต้องมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นอย่างน้อย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตเอนไซม์



รูปที่ 18 แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ในช่วง 0.1– 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที .ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 8)

3.4 แหล่งเกลือแร่

จากการศึกษาแหล่งเกลือแร่ชนิดต่างๆ ได้แก่ $FeSO_4$, $MgSO_4$, K_2HPO_4 และ KCl เพื่อส่งเสริมการเพิ่มการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส เปรียบเทียบกับไม่มีการเติมเกลือแร่ใดๆ ลงในอาหาร ในยีสต์ *C. krusei* MS_1 ผลดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่าเมื่อเติมเกลือแร่ $FeSO_4$, $MgSO_4$ และ KCl แอคติวิตีจะไม่เพิ่มหรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (control) แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อเติม K_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีลดลงเหลือ 0.2986 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงมาก เมื่อเติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 คือ 0.157 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีแอคติวิตี เท่ากับ 0.334 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ซึ่งต่างจากการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *A. nidulans* (Alfonso และคณะ , 1995) ที่ต้องมีการเติม ฟอสเฟต ในรูป KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจาก *V. alginolyticus* H8 ต้องมีการเติม 0.02 เปอร์เซ็นต์ ของ K_2HPO_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ohishi และคณะ , 1997)

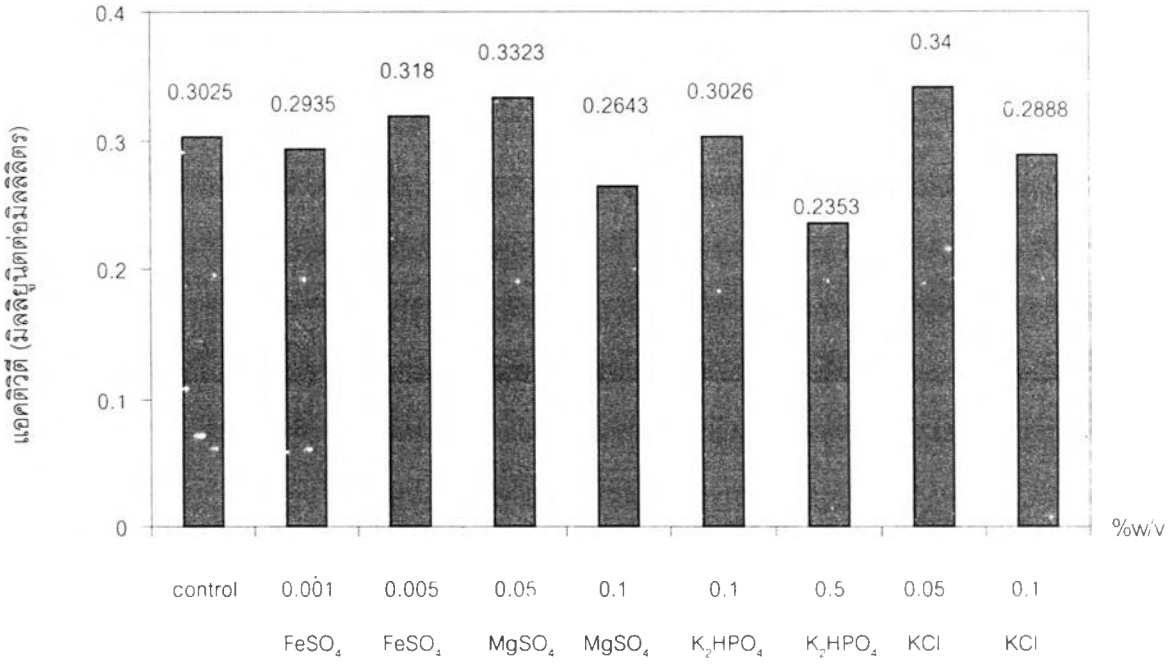


รูปที่ 19 เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุง ที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 9)

ส่วนสายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 ผลแสดงดังรูปที่ 20 พบว่าเมื่อเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 พบแอคติวิตี 0.2643 และ 0.2353 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีแอคติวิตี 0.3025 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl จะมีผลทำให้แอคติวิตีสูงขึ้น คือ 0.3323 และ 0.340 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับไม่มีการเติมเกลือแร่ มีแอคติวิตีเท่ากับ 0.3025 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้เติมทั้ง 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเทียบกับเมื่อเติมแต่ละชนิด ผลแสดงดังตารางที่ 6 พบว่า ในอาหารที่มีเกลือแร่ทั้งสองชนิด

มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 0.3441 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเติมเกลือแร่แต่ละชนิดแยกกันคือ 0.3316 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.3419 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl ซึ่งผลการทดลองนี้ต่างจากของ Alfonso และคณะ (1995) ที่ต้องมีการเติมเกลือแร่ทั้งสองชนิด คือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *A. nidulans*

ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงมีการเติมเกลือแร่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl สำหรับ *R. rubra* MS_8 ส่วน *C. krusei* MS_1 จากผลการทดลองพบว่าเกลือแร่ไม่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส จึงไม่มีการเติมเกลือแร่ในอาหาร



รูปที่ 20 เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของแหล่งเกลือแร่ที่เติมลงในอาหารสูตรปรับปรุง ที่มีผลต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
(ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 10)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตี เมื่อเติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl ลงอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8

เกลือแร่ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ	แอคติวิตี (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ไม่มีการเติมเกลือแร่	0.3014
0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$	0.3316
0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.3419
0.05 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ + 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl	0.3441

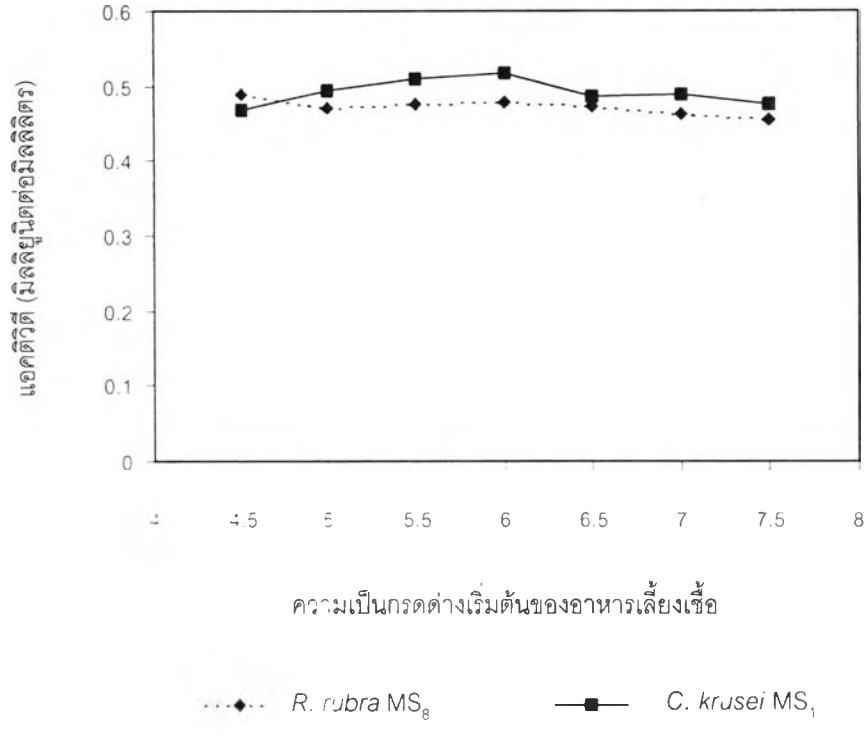
4. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส

4.1 ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น

เลี้ยงยีสต์สองสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่มีแอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลสสูงกว่าสายพันธุ์อื่น คือสายพันธุ์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 ในอาหารวายพีจีที่ปรับปรุงสูตรแล้ว โดยมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน , 1 เปอร์เซ็นต์ แบคโตเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน , 0.2 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินรวม และเติมเกลือแร่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ KCl สำหรับ *R. rubra* MS_8 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารในช่วง 4.5 – 7. 5 พบว่า ยีสต์ *C. krusei* MS_1 จะให้แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลสสูงสุดเท่ากับ 0.5168 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ดังแสดงในรูปที่ 21 ซึ่งความเป็นกรดด่างนี้เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ *C. lindemuthianum* เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส คือ 5.8 (Tokuyasu และคณะ , 1996) และเช่นเดียวกันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 เมื่อเลี้ยง *V. alginolyticus* H8 (Ohishi และคณะ , 1997) ส่วนสายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 ผลแสดงดังรูปที่ 21 พบแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4878 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kafetzopoulos และคณะ (1993) และ Goa และคณะ(1995) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรวายพีจีที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *M. rouxii* และ *A. coerulea* ตามลำดับ

ในขั้นต่อไปจึงเลือกความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 สำหรับเลี้ยง *C. krusei* MS_1 และความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 สำหรับ *R. rubra* MS_8

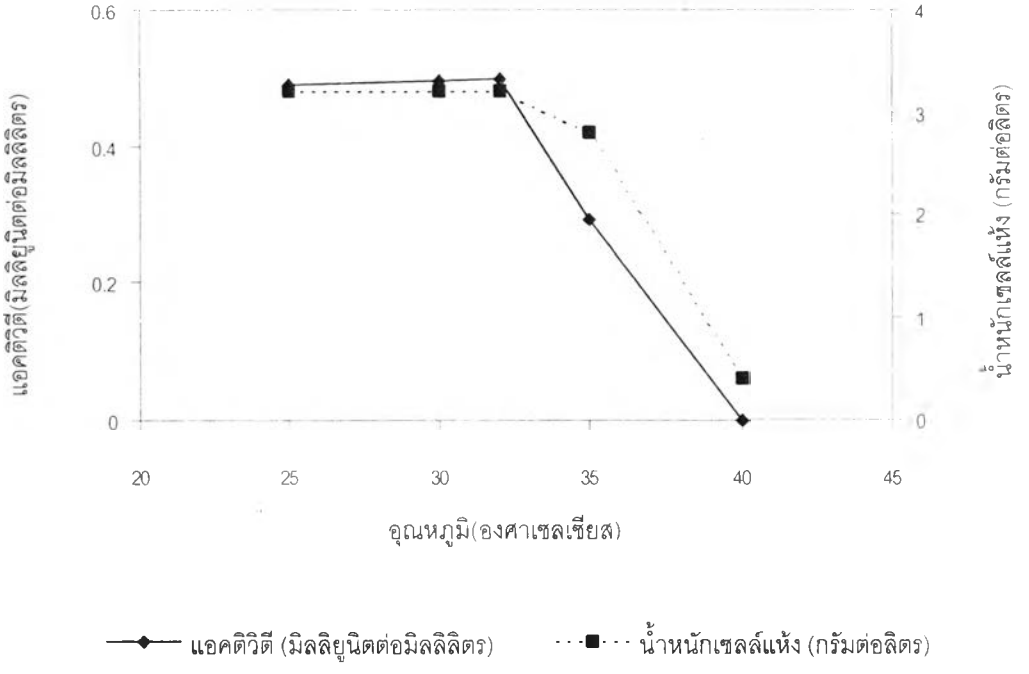
แต่อย่างไรก็ตามในรูปที่ 21 จะเห็นได้ว่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ให้ผลแตกต่างต่อการสร้างไคตินดีอะเซทิเลสมากนัก คือ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารในช่วง 4 – 7.5 ยังคงให้แอคติวิตีที่ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 21 ผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในช่วง 4.5 – 7.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 11)

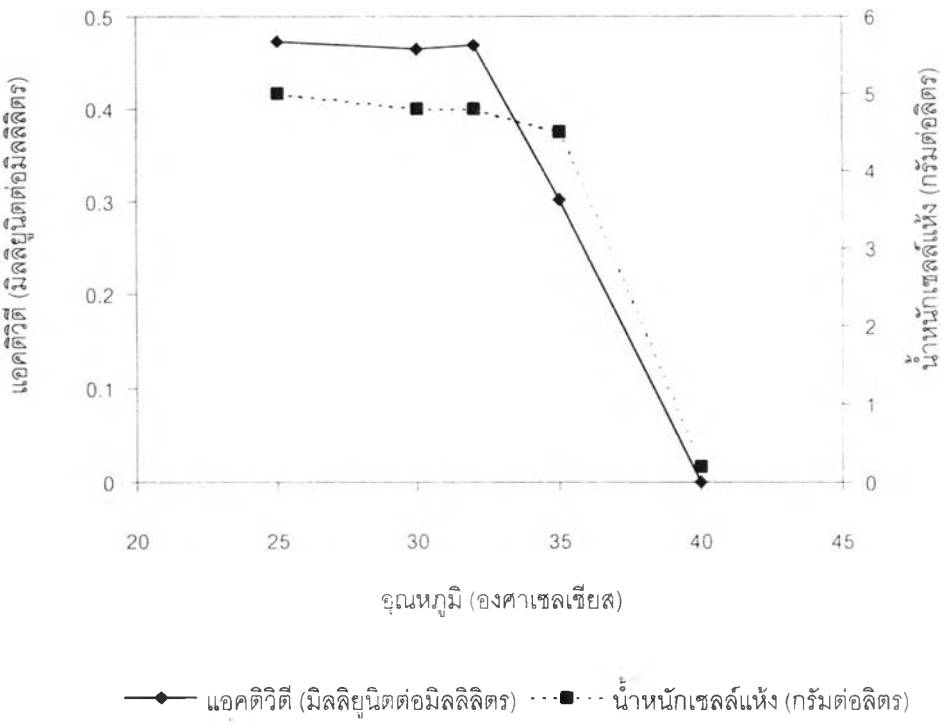
4.2 อุณหภูมิ

การแปรผันเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส โดยเลี้ยงยีสต์สองสายพันธุ์ คือ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_9 ในอาหารวายพีจีสูตรที่ปรับปรุงแล้ว โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 สำหรับ *C. krusei* MS_1 และ 4.5 สำหรับ *R. rubra* MS_8 แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *C. krusei* MS_1 จะให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4980 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในรูปที่ 22 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ นันทนา (พ.ศ. 2542) ที่ผลิตไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *R. oligosporus* NS_1 โดยใช้อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ในการเลี้ยงเชื้อ ต่อไปจึงได้เพาะเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 ที่อุณหภูมิห้อง ในการทดลอง



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงยีสต์ ต่อการเจริญและการผลิต ไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส), 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 12)

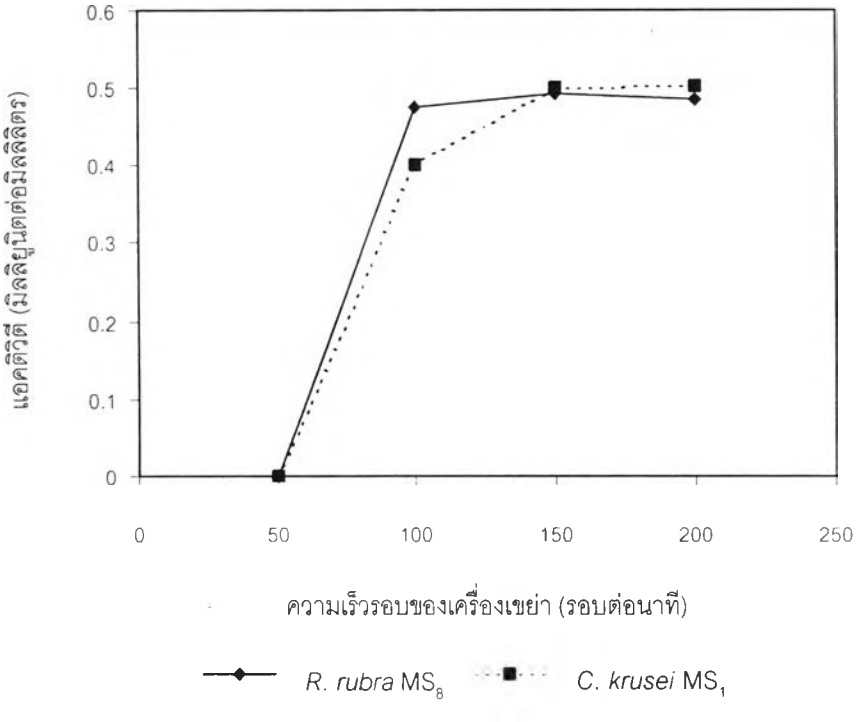
ส่วนสายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 ผลแสดงดังรูปที่ 23 พบแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4738 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.464 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีสต์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยดูจากน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์เมื่อเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง คือ 5.0 และ 4.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เนื่องจากทั้งสองอุณหภูมิมีแอคติวิตีใกล้เคียงกัน ในการทดลองต่อไป จะใช้อุณหภูมิห้องในการเพาะเลี้ยง เพื่อลดค่าใช้จ่ายและเพื่อความสะดวกในการทดลอง



รูปที่ 23 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ต่อการเจริญ และการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *R. rubra* MS_3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 , 30 , อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) , 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 13)

4.3 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า

การแปรผันความเร็วรอบของเครื่องเขย่า มีผลต่อปริมาณอากาศในอาหารเหลว เมื่อเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 ในอาหารวายพีจีสูตรที่ปรับปรุงแล้ว ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ทั้งสอง บ่มบนเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ โดยแปรผันความเร็ว 50 – 200 รอบต่อนาที ผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ แสดงดังรูปที่ 24 โดยยีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MS_1 พบว่าแอคติวิตีสูงสุด เท่ากับ 0.502 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ส่วน *R. rubra* MS_8 ให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.4921 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 24 ผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่า ต่อการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ของยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ *R. rubra* MS_8 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงสูตรแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 50 , 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 14)

เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด และให้แอคติวิตีของ ไคตินดีอะเซทิเลสสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ *C. krusei* MS_1 และภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8 ในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส มีข้อดีกว่าในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 คือ อาหารเลี้ยงยีสต์มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ช่วยลดการปนเปื้อนได้ดีกว่า ความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อให้อากาศต่ำ 150 รอบต่อนาที ในขณะที่การเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 ใช้ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงได้เลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 เพื่อใช้ในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส แล้วสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

5. สกัดไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์

5.1 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorular rubra* MS_8 ที่ปั่นเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกแล้ว นำน้ำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 50 – 90 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการทดลองบทที่ 2 ข้อ 5.1 พบว่าเอนไซม์จะมีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 12.29 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 5.06 เปอร์เซ็นต์ ผลแสดงดังตารางที่ 7

จากรายงานที่ผ่านมา การแยกไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์นั้น ในขั้นแรกจะมีการแยกโปรตีน ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ความเข้มข้น 60 - 85 เปอร์เซ็นต์ (Goa และคณะ , 1995 ; Davis และ Bartinicki-Garcia , 1984) Tokuyasu และคณะ (1996) ใช้ที่ความเข้มข้น 63 - 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Alfonso และคณะ (1995) ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ความเข้มข้น 50 - 90 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในการวิจัยนี้ ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ความเข้มข้น 50 - 90 เปอร์เซ็นต์ ในการตกตะกอนโปรตีน และได้โปรตีนที่ให้แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส

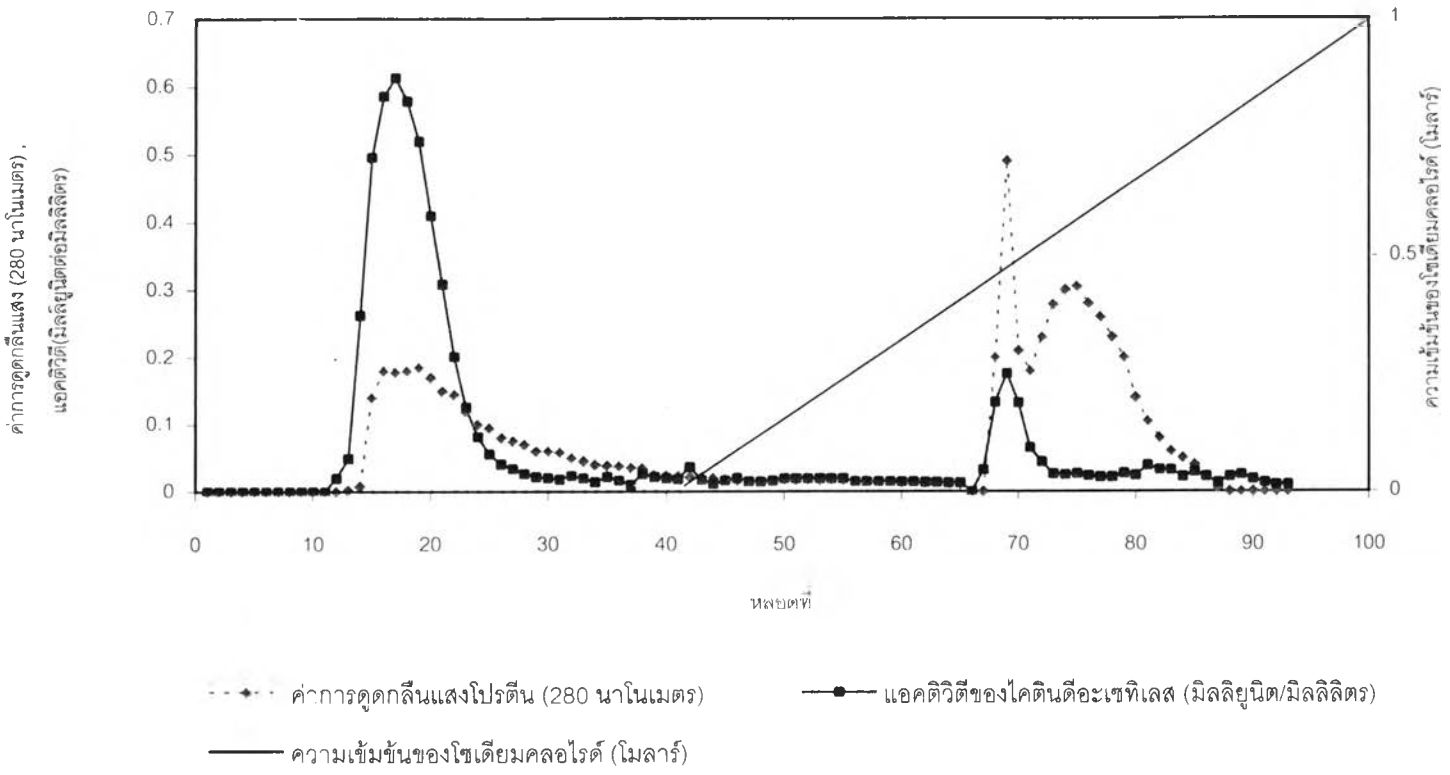
5.2 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน

แยกไคตินดีอะเซทิเลสออกจากโปรตีนชนิดอื่น โดยอาศัยความแตกต่างและความแรงของประจุ ทำโดยการนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 50 - 90 เปอร์เซ็นต์ มาผ่านคอลัมน์ที่มี DEAE-Cellulose เป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ ดังวิธีการในบทที่ 2 ข้อที่ 5.2 ผลแสดงดังรูปที่ 25 พบโปรตีนทั้งหมด 3 ยอด (peak) ยอดที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส คือ ยอดที่ 1 และยอดที่ 2 โดยที่ยอดที่ 1 คือโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วย DEAE-Cellulose เมื่อวัดแอคติวิตีพบว่าเอนไซม์จะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 14 – 28 และเมื่อรวมสารละลายเอนไซม์นี้เข้าด้วยกัน จะได้แอคติวิตี 11.05 มิลลิยูนิต เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 43.86 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 2.30 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 7 ส่วนในยอดที่ 2 เป็นโปรตีนส่วนที่ถูกจับด้วยประจุของตัวกลาง แล้วถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย เกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 - 1.0 โมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งโปรตีนในยอดที่ 2 นี้ให้แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลสที่ต่ำมาก ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกเอนไซม์ปริมาณส่วนใหญ่ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนในยอดแรก ลำดับส่วนที่ 14 – 28 มาใช้ในการทดลองต่อไป

จากผลในขั้นตอนการแยกด้วย วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนนี้ แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ *R. rubra* MS_8 นี้สามารถผลิตไคตินดีอะเซทิเลสได้ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีประจุบวกที่ไม่ถูกจับด้วยสารตัวกลาง และ ชนิดที่เป็นประจุลบที่ถูกจับโดยประจุบวกของตัวกลาง ซึ่งการพบไคตินดีอะเซทิเลส 2 ชนิดนี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Ohishi และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ที่รายงานว่า *Vibrio alginolyticus* H8 สามารถผลิตไคตินดีอะเซทิเลสได้ 2 ชนิด คือ CD1 และ CD2 ตามลำดับ เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสส่วนที่ถูกจับด้วยตัวกลางประจุบวก ในลำดับส่วน ที่ 66 – 73 ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ และมีปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ที่น้อยเกินไป ทำให้ไม่ได้นำมาวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้ ดังนั้นจึงเลือกศึกษาเฉพาะเอนไซม์ส่วนที่มีปริมาณมากกว่า คือ ส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยประจุบวกของตัวกลาง ซึ่งอยู่ในลำดับส่วนที่ 14 – 28 และมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูง

ตารางที่ 7 สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการแยกไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	โปรตีนรวม (mg)	แอคติวิตีรวม (mU)	แอคติวิตีจำเพาะ (mU/mg)	ปริมาณเอนไซม์ (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น	1,000	3,240	480	0.15	100	1
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 50 – 90 %	20	14.13	24.3	1.72	5.06	12.29
DEAE-Cellulose	10	1.80	11.05	6.14	2.30	43.86
Sephadex G-75	9	1.08	6.53	6.05	1.36	43.21



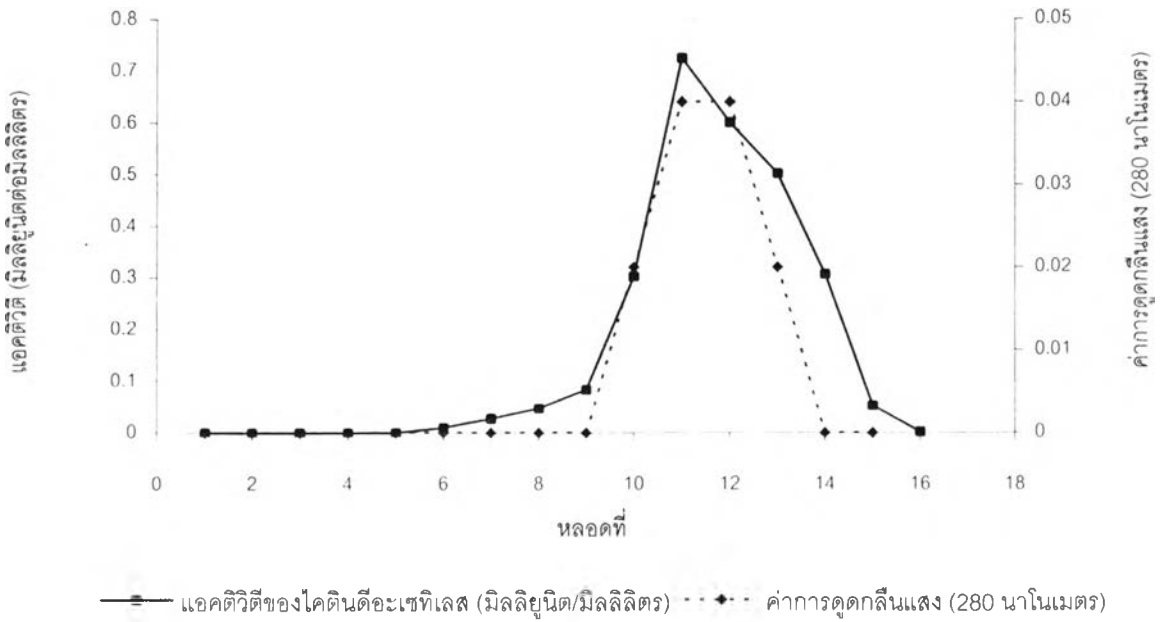
รูปที่ 25 โครมาโตกราฟีของไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 บนคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 1.5 x 30 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้วทำเกรเดียนท์โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 – 1 โมลาร์

5.3 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีน ที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยนำโปรตีนที่ผ่านการแยกในขั้นตอนที่ 5.2 ผ่านลงคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี -75 ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 5.3 แล้วเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 2 มิลลิลิตร นำมาวัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ผลแสดงดังรูปที่ 26 พบแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในลำดับส่วนที่ 10 – 14 และเมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ 6.53 มิลลิยูนิต แอคติวิตีจำเพาะ 6.05 มิลลิยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 43.21 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7

5.4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตร-โฟริซิสชนิดแผ่น

เป็นการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส โดยการนำเอนไซม์ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose และ Sephadex G – 75 ดังรายละเอียดของการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 5.4 ได้ผลดังรูปที่ 27 โดยได้ตรวจพบแถบของโปรตีนที่ติดสีย้อมของโคแมสซีเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งให้แอคติวิตีของไคตินดีอะเซทิเลส และพบว่าแอคติวิตีมีปริมาณค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของโปรตีนมีอยู่น้อย และอาจเนื่องจากการสูญเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟริซิส



รูปที่ 26 โครมาโตกราฟีของไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 ในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75 ขนาด 1 x 50 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

รูปที่ 27 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์ อิเล็กโตรโฟริซิส

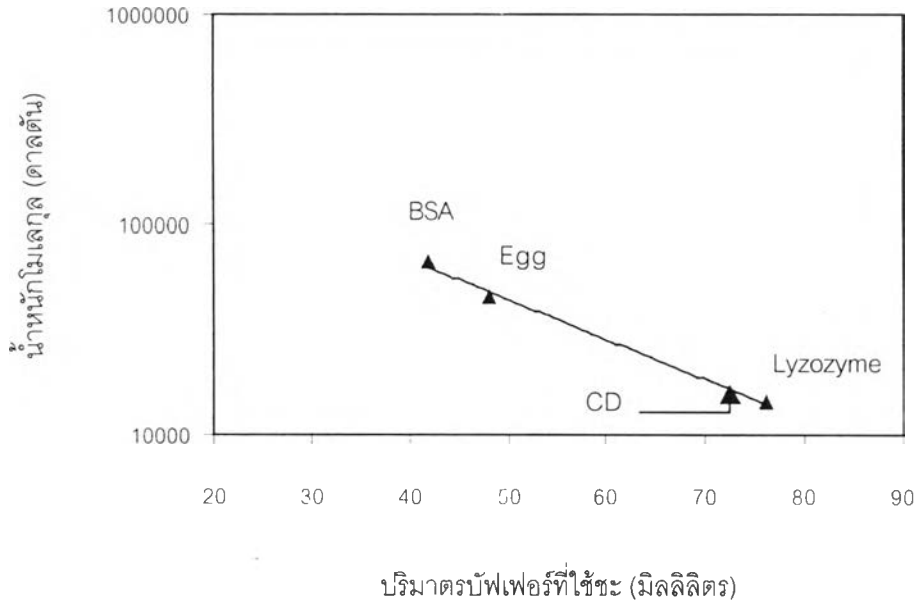
แถวที่ 1 เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

แถวที่ 2 เมื่อผ่าน ดีอีเออี-เซลลูโลส

6. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

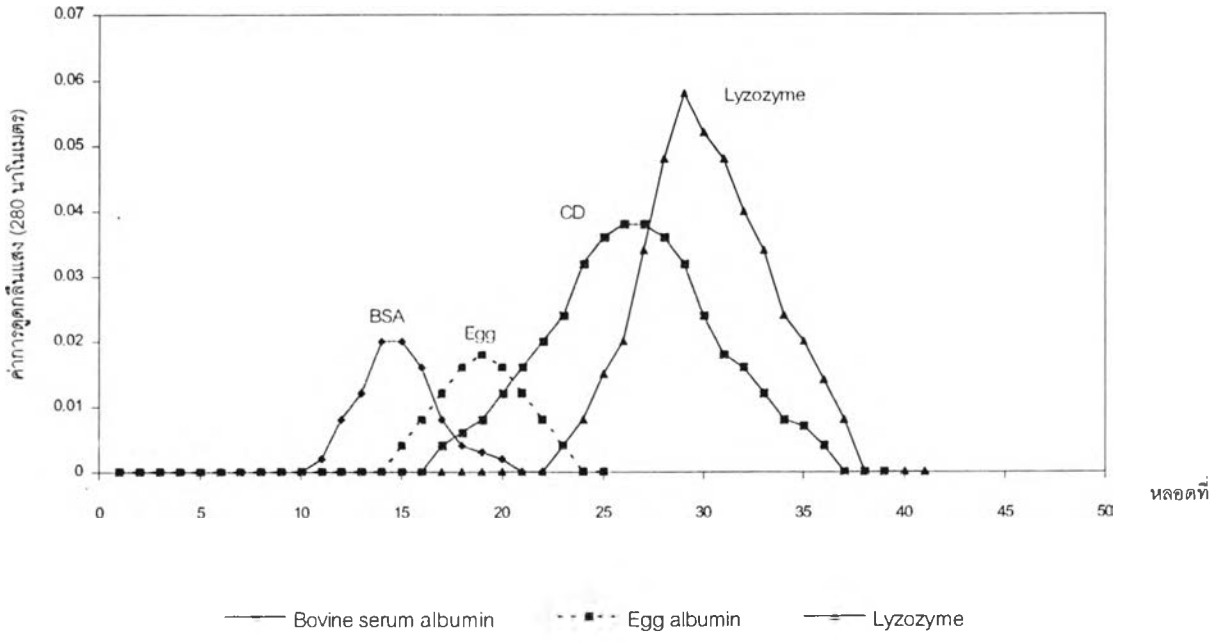
6.1 หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยวิธี เจลฟิลเตรชั่น

โดยผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ที่แน่นอน 3 ชนิด ได้แก่ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน , โอวัลบูมิน และ ไลโซไซม์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 45,000 และ 14,300 ตามลำดับ ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ติดตามลำดับส่วนของโปรตีนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ได้ผลดังรูปที่ 28 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะโปรตีนแต่ละชนิด ผลแสดงดังรูปที่ 29 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน ไคตินดีอะเซทิเลส จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,500 ดาลตัน



รูปที่ 29 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส โดยการทำเจลฟิลเตรชั่น ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 โดยมีโปรตีนมาตรฐานได้แก่

โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin)	66,000 ดาลตัน
โอวัล บูมิน (egg albumin)	45,000 ดาลตัน
ไลโซไซม์ (lyzozyme)	14,300 ดาลตัน
CD = ไคตินดีอะเซทิเลส	15,500 ดาลตัน



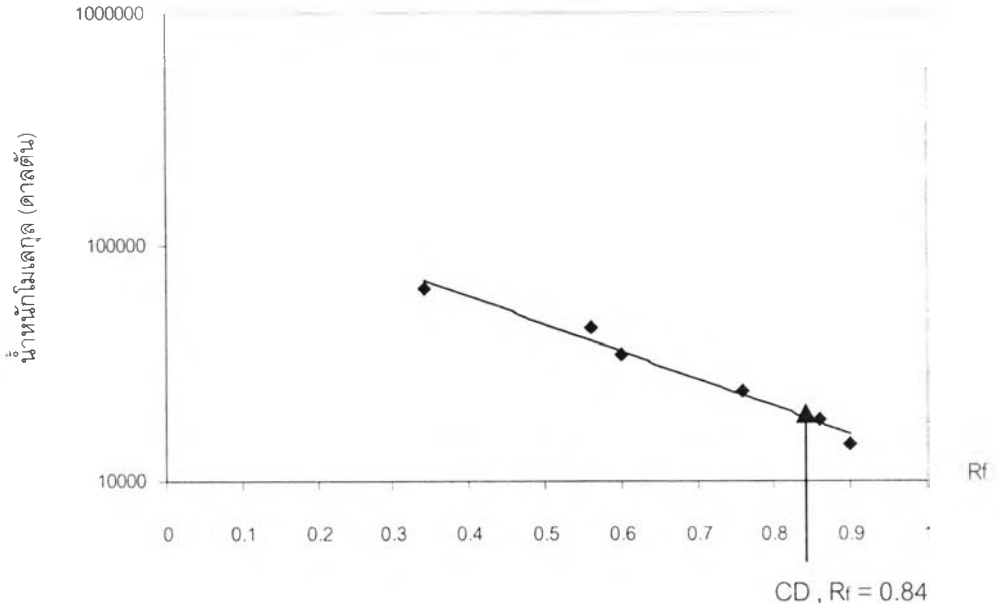
รูปที่ 28 โครมาโตกราฟีของโปรตีนมาตรฐาน บนคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75 ขนาด 1 x 50 เซนติเมตร เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 9 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

6.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีการทำ SDS-PAGE

นำไคตินดีอะเซทิเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโตรโฟริซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ผลแสดงดังรูปที่ 30 และจากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับค่า Rf พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส ประมาณ 19,000 ดาลตัน ดังรูปที่ 31

รูปที่ 30 เปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส กับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟริซิสชนิดแผ่น
โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่

โบวีน อัลบูมิน (bovine albumin)	66,000 ดาลตัน
ไอวัล อัลบูมิน (egg albumin)	45,000 ดาลตัน
เปปซิน (pepsin)	34,700 ดาลตัน
ทริบซิโนเจน (trypsinogen)	24,000 ดาลตัน
เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (β-lactoglobulin)	18,400 ดาลตัน
ไลโซไซม์ (lyzozyme)	14,300 ดาลตัน
CD = ไคตินดีอะเซทิเลส	19,000 ดาลตัน



รูปที่ 31 การหาน้ำหนักโมเลกุลไคตินดีอะเซทิเลส โดยการอิเล็กโตรโฟรีซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่

โบวีน อัลบูมิน (bovine albumin)	66,000 ดาลตัน
โอวัล อัลบูมิน (egg albumin)	45,000 ดาลตัน
เปปซิน (pepsin)	34,700 ดาลตัน
ทริบซิโนเจน (trypsinogen)	24,000 ดาลตัน
เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (β-lactoglobulin)	18,400 ดาลตัน
ไลโซไซม์ (lyzozyme)	14,300 ดาลตัน
CD = ไคตินดีอะเซทิเลส	19,000 ดาลตัน

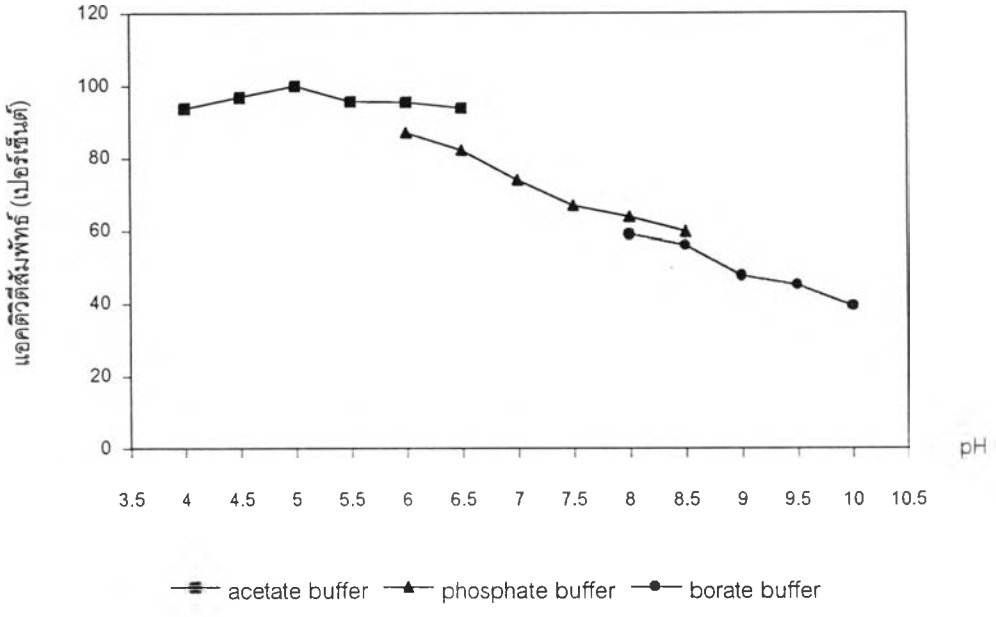
จากรายงานการทดลอง หาน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ หรือที่อยู่ภายในเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อนำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ SDS-PAGE จะมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากัน และจะมีความแตกต่างกันบ้าง ดังรายงานต่อไปนี้ Kafetzopoulos และคณะ (1993) รายงานไคตินดีอะเซทิเลสภายในเซลล์ของ *Mucor rouxii* ว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ดาลตัน ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 75,000 ดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE เช่นเดียวกับไคตินดีอะเซทิเลสภายในเซลล์ของรา *Absidia coerulea* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 75,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ SDS-PAGE ส่วนรายงานของไคตินดีอะเซทิเลสส่วนที่ถูกขับออกนอกเซลล์นั้น มีรายงานน้ำหนักโมเลกุลโดย Ohishi และคณะ (1995) ได้รายงานน้ำหนักไคตินดีอะเซทิเลสที่ขับออกนอกเซลล์โดยแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* H8 ว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 46,000 โดยวิธี SDS-PAGE Tokuyasu และคณะ (1996) รายงานไคตินดีอะเซทิเลสที่ขับออกนอกเซลล์รา *Colletotrichum lindemuthianum* 33,000 ดาลตัน เมื่อวัดโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 31,500 ดาลตัน เมื่อวัดโดยวิธี SDS-PAGE ส่วน Alfonso และคณะ (1995) รายงานน้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลส ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ของรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งเป็นเอนไซม์ทนร้อน ว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 27,300 ดาลตันโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ และ 27,500 โดยวิธี SDS-PAGE ส่วนในงานวิจัยนี้ได้น้ำหนักโมเลกุลของไคตินดีอะเซทิเลสที่ถูกขับออกนอกเซลล์ยีสต์ค่อนข้างต่ำ คือ 15,500 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 19,000 ดาลตันโดยวิธี SDS-PAGE

7. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว

7.1 ความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทสารละลายไคโตซาน ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด ที่มีช่วงของ pH ตั้งแต่ 4.0 – 10.0 คือ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 4.0 – 6.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 – 8.5 และ บอเรต บัฟเฟอร์ pH 8.0 – 10.0 ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 7.1 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ รูปที่ 30 แสดง แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ กับ pH พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ของอะซิเตทบัฟเฟอร์ แล้วแอคติวิตีจะลดลงเมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 6.0 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 - 8.5 และบอเรตบัฟเฟอร์ pH 8.0 – 10.0

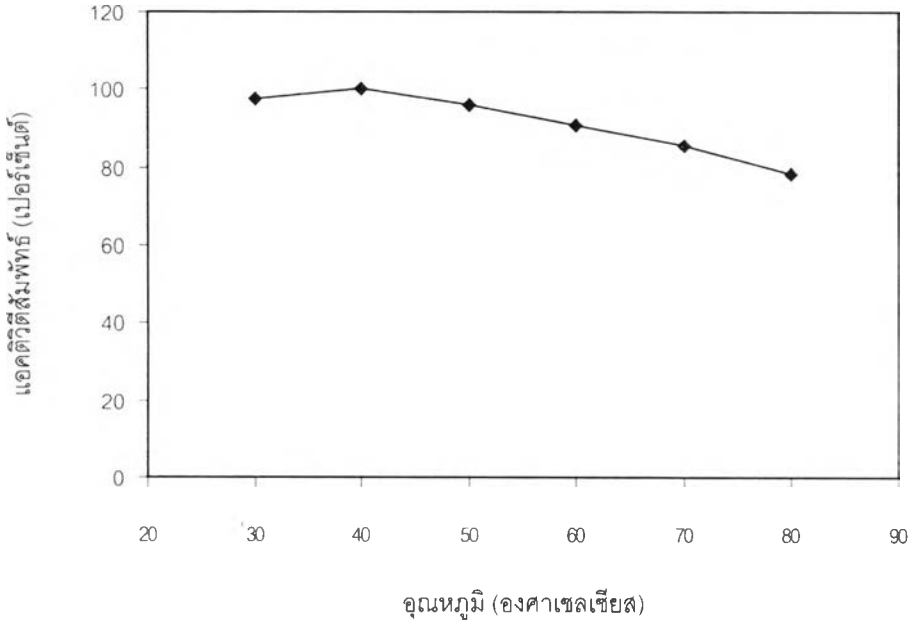
ซึ่งความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส ที่ผลิตจากยีสต์นี้คืออะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส ที่ผลิตจาก *Mucor rouxii* และ *Absidia coerulea* คือ pH 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ (Kafetzopoulos และคณะ ,1993 ; Goa และคณะ ,1995)



รูปที่ 32 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 15)

7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

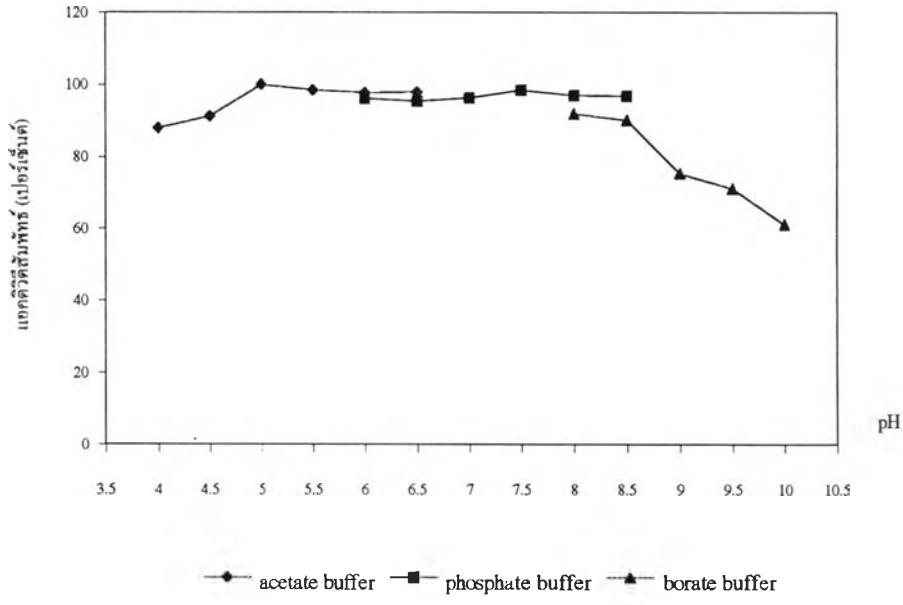
นำสารละลายเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส ที่สกัดให้บริสุทธิ์แล้ว 0.5 มิลลิลิตร ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ทำปฏิกิริยากับสารละลายไคโตซาน แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 – 80 องศาเซลเซียส ดังรายละเอียดวิธีการทดลองใน บทที่ 2 ข้อ 7.2 แสดงผลดังรูปที่ 33 จากกราฟแสดงผลการทดลองจะเห็นว่า เมื่อบ่มอุณหภูมิ 30 – 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรวจได้แตกต่างกันไม่มากนัก แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีสูงที่สุด และแอคติวิตี จะค่อยๆ ลดลง เมื่อบ่มในอุณหภูมิที่สูงขึ้นตั้งแต่ 50 ถึง 80 องศาเซลเซียส จากรายงานต่าง ๆ ที่ผ่านมา พบว่าไคตินดีอะเซทิเลสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 40 – 60 องศาเซลเซียส (บทนำ ตารางที่ 1)



รูปที่ 33 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ ไคตินดีอะเซทิเลส เมื่อตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ช่วงอุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส
(ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 16)

7.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

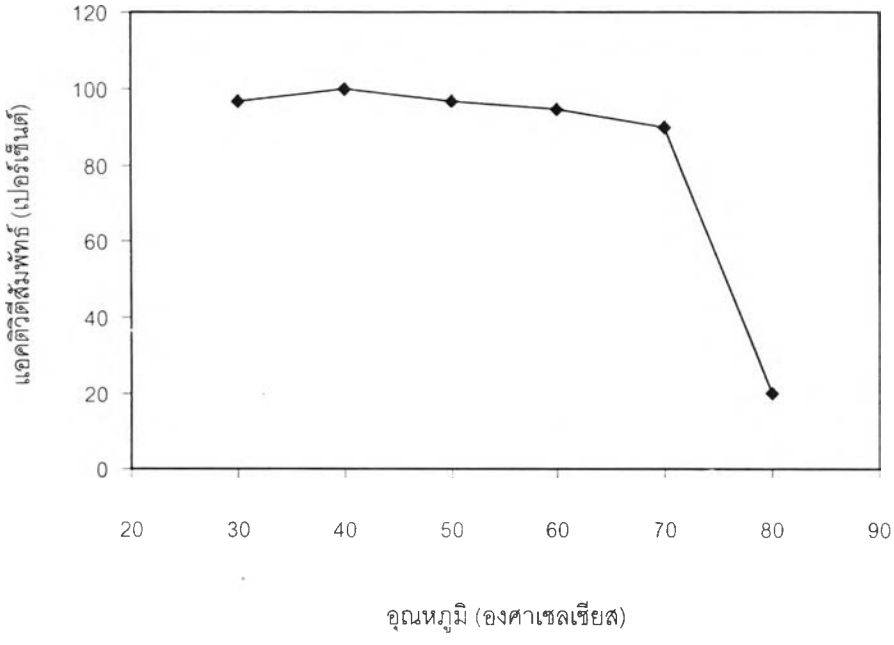
บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด ที่มีช่วงของ pH ตั้งแต่ 4.0 – 10.0 ได้แก่ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 4.0 - 6.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 – 8.5 และบอเรต บัฟเฟอร์ pH 8.0 – 10.0 เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น นำไปทำปฏิกิริยากับสับสเตรทไคโตซาน เพื่อตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 7.3 ผลการทดลองได้แสดงไว้ในรูปที่ 34 พบว่าไคตินดีอะเซทิเลสมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง ในช่วง 5.0 – 8.5 ในบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 – 6.5 และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 – 8.5 และเมื่อ ความเป็นกรดด่าง 8 – 10 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงและเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ที่ pH 10.0 ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Tokuyasu (1996) และ นันทนา (พ.ศ. 2542) ที่รายงานว่าไคตินดีอะเซทิเลส จาก *C. lindemuthianum* และ *R. oligosporus* NS_1 มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง 5 – 10.5 และ 4.5 - 9.0 ตามลำดับ



รูปที่ 34 ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลส ต่อความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่าง 4 –10 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 17)

7.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

นำสารละลายเอนไซม์ไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในช่วง 30 - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 35 พบว่าเอนไซม์จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 30 – 70 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ลดเหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Alfonso และคณะ (1995) ที่รายงานว่าไคตินดีอะเซทิเลสจาก *Aspergillus nidulans* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อน คือ เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 30 – 100 องศาเซลเซียส



รูปที่ 35 ความเสถียรของไคตินดีอะเซทิเลสต่ออุณหภูมิ โดยนำสารละลายเอนไซม์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.0 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจหาแอคติวิตี (ภาคผนวก ฉ ตารางที่ 18)