บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ แยกและคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ซึ่งยังไม่เคยมีงานวิจัยรายงาน การผลิตไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์มาก่อน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส แล้วแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี รวมทั้งหาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว จากผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. แยกสายพันธุ์ยีสต์จากตัวอย่างผลไม้ชนิดต่าง ๆ และดินจากแหล่งต่าง ๆ ได้ทั้งหมด 54 สายพันธุ์ แล้วนำมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส โดยคัดเลือก 2 วิธี ได้แก่ การทดสอบแบบรวดเร็ว (rapid test) และวิธีการเปรียบเทียบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท (colorimetric method) จากการทดสอบได้ยีสต์ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบแบบรวดเร็ว 8 สายพันธุ์ ซึ่งการให้ผลบวกแสดงถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไคตินและไคโตซาน จากนั้นจึงนำยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์ ไปทดสอบวิธีที่สอง ซึ่งพบว่ายีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์มีความสามารถให้ปฏิกิริยาของไคตินดีอะเซทิเลส จากนั้นศึกษาแหล่งผลิตเอนไซม์ และระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม จากผลการทดลองพบว่าไคตินดีอะเซทิเลสของยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ มีปริมาณมากน้อยต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และพบปริมาณเอนไซม์สร้างได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงยีสต์ โดยที่ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ MS_1 และ MS_8 ผลิตเอนไซม์ที่มีปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์อื่นอีก 6 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงเลือกยีสต์ สายพันธุ์ MS_1 และ MS_8 เลี้ยงในอาหารสูตรมาตรฐาน และเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ 48 ชั่วโมง ใช้ในการทดลองต่อไป

2. นำยีสต์ที่คัดเลือกได้ คือ สายพันธุ์ MS_1 และสายพันธุ์ MS_8 มาจัดจำแนกสายพันธุ์ทางอนุกรมวิธาน พบว่าลักษณะและสรีรวิทยาของยีสต์ MS_1 จัดจำแนกเป็นสายพันธุ์ *Candida krusei* ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักและ การเจริญได้เพียงชนิดเดียว ส่วน MS_8 คือ สายพันธุ์ *Rhodotorular rubra* สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดเพื่อการเจริญ ได้แก่ กลูโคส ราฟฟิโนส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส เทฮาโลส ไซโลส ยกเว้นน้ำตาลแลคโตส ซึ่งยีสต์ไม่สามารถเจริญได้

3. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส มีสูตรอาหารเหมือนกัน คือ 1 กรัมเปอร์เซ็นต์กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน , 1 กรัมเปอร์เซ็นต์แบคโตเปปโตน เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และ 0.2 กรัมเปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งวิตามินรวม สำหรับยีสต์ *R. rubra* MS_8 มีการเติม 0.05 กรัมเปอร์เซ็นต์ KCl เพื่อเป็นแหล่งเกลือแร่ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 สำหรับการเลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 และ 4.5 สำหรับ *R. rubra* MS_8 เลี้ยงยีสต์ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เลี้ยงยีสต์ *C. krusei* MS_1 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8 นั้น ใช้ภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการทดลองแปรภาวะในการเลี้ยงยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์พบว่า *R. rubra* MS_8 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า ดังนั้นจึงใช้ยีสต์สายพันธุ์ *R. rubra* MS_8 ในการศึกษาการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

4. เลี้ยงยีสต์ *R. rubra* MS_8 เพื่อผลิตไคตินดีอะเซทิเลส โดยนำโปรตีนที่ขับออกนอกเซลล์ มาสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นตอนแรกทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ความเข้มข้น 50 – 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นละลายตะกอนที่ผ่านการเอาแอมโมเนียมซัลเฟตออกแล้ว มาผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose และ Sephadex G-75 ตามลำดับ จากขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ดังกล่าว ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 43.21 เท่า โดยมีปริมาณเหลืออยู่ 1.36 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น ซึ่งนับว่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมาก แต่ปริมาณของเอนไซม์เหลืออยู่ค่อนข้างต่ำ

5. สมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการสกัดให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการทำงานของเอนไซม์คือ pH 5.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเอนไซม์ อยู่ในช่วง 5.0 – 8.5 และความเสถียรต่ออุณหภูมิ อยู่ในช่วง 30 – 70 องศาเซลเซียส จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสจาก *R. rubra* MS_8 จัดเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนร้อน

6. จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าไคตินดีอะเซทิเลสที่ขับออกนอกเซลล์จากยีสต์ *R. rubra* MS_8 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15,500 ดาลตันโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น และ 19,000 ดาลตัน โดยใช้วิธี SDS-PAGE

ข้อเสนอแนะ

จากตารางที่ 7 สรุปขั้นตอนต่าง ๆ ในการแยกเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 ให้บริสุทธิ์ พบว่าเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 14.13 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นที่มีเท่ากับ 3,240 มิลลิกรัม เนื่องจากในการทดลองนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เช่นเดียวกับรายงานของ Goa และคณะ (1995) , Davis และ Bartinicki-Garcia (1984) ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 – 85 เปอร์เซ็นต์ ในการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Absidia coerulea* และ *Mucor rouxii* ในการสกัดไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์ Alfonso และคณะ (1995) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 – 90 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดไคตินดีอะเซทิเลสจาก *Aspergillus nidulans* ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 50 – 90 เปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการทดลองนี้ อาจเป็นช่วงที่ไม่เหมาะสมในการแยกไคตินดีอะเซทิเลสที่ผลิตจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 จึงควรมีการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีน

ในขั้นตอนการแยกไคตินดีอะเซทิเลสด้วยการทำโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส พบว่าเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสจากยีสต์ *R. rubra* MS_8 นี้มี 2 ชนิด ตามความแรงของประจุโปรตีน คือ ชนิดที่มีประจุบวกที่ไม่ถูกจับด้วยตัวกลาง ลำดับส่วนที่ 14 – 28 และชนิดที่เป็นประจุลบถูกจับด้วยตัวกลาง ลำดับส่วนที่ 66 – 73 ในการทดลองได้เลือกศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในลำดับส่วนที่ 14 – 28 เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่า อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในส่วนที่ถูกจับด้วยตัวกลาง เพื่อเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนต่างชนิดกัน