บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อแยก คัดเทียบและจำแนกสายพันธุ์รา ที่มีความสามารถในการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสได้แอคติวิตีสูง ศึกษาสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์นี้จากราที่คัดเทียบได้ รวมทั้งสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และหาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ จากผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. จากการคัดแยกรา 67 สายพันธุ์ จากผลไม้ ลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยการคัดเทียบจากสองวิธี ได้แก่ การตรวจสอบแบบรวดเร็ว (rapid test) และวิธีเปรียบเทียบสี (colorimetric method) พบว่ามีรา 26 สายพันธุ์ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกโดยวิธีตรวจสอบแบบรวดเร็ว ซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไคโตแซน และมี 18 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากราทั้งหมดที่แยกได้ ด้วยการตรวจสอบวิธีเปรียบเทียบสีจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อจำแนกสายพันธุ์ราที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด โดยการศึกษาลักษณะเฉพาะตัวทางสัณฐานวิทยา ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะเส้นใยและสปอร์ พบว่าเป็น *Rhizopus oligosporus* NS_1 ซึ่งจัดเป็นราในกลุ่ม Zygomycetes

2. เมื่อปรับปรุงสูตรอาหารวายพีจี ให้เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *R. oligosporus* NS_1 พบว่าสูตรอาหารประกอบด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส 2.5 เปอร์เซ็นต์ของ แบคโตเปปโตน และ 0.4 เปอร์เซนต์ของสารสกัดจากยีสต์ โดยปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรดังกล่าว โดยใช้สปอร์ที่มีอายุ 2 วัน จำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ภายใต้ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที และเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

ซึ่งจะพบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตและให้แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลสสูงสุด ดังนั้น ไคติน - ดีอะเซทิลเลส จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นเอนไซม์ส่วนถูกขับออกนอกเซลล์ จะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตระหว่างเชื้อมีการเจริญเติบโต

3. การใช้สารบางอย่าง ได้แก่ ผงไคติน และผงไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 65 75.9 และ 85.4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกระตุ้นการสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากผลการทดลองพบว่า การสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลสของ *R.oligosporus* NS_1 ไม่แตกต่าง เมื่อมีหรือไม่มีสารกระตุ้นดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงทำการผลิตเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสจากเชื้อ ในระดับขยายส่วน เพื่อนำเอนไซม์ที่มีปริมาณมากพอมาสกัดให้บริสุทธ์ โดยขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวได้ดี ในช่วง 55-85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose ได้โปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ ในช่วงโซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ ที่มีความเข้มข้น 0.43 ถึง 0.47 โมลาร์ และนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ตามลำดับ จากขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าว ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24.4 เท่า โดยมีปริมาณโปรตีนเอนไซม์เหลืออยู่ 6.7 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น และมีแอคติวิตีจำเพาะ 6.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาทดสอบความบริสุทธิ์ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าสามารถแยกแถบโปรตีนออกได้ 1 แถบ ซึ่งวัดค่า Rf ได้เท่ากับ 0.44 และเมื่อตัดแถบวุ้นมาตรวจสอบพบ แอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากแถบโปรตีนดังกล่าว

5. จากการศึกษาสมบัติของไคติน-ดีอะเซทิลเลสจากรา *R.oligosporus* NS_1 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28,000 และ 29,000 ดาลตันโดยวิธี SDS-PAGE และเจลฟิลเตรชั่น ตามลำดับ และจากการศึกษาค่าKm สำหรับสับสเตรทที่เป็นไคโตแซนซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ ดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ค่า Km เท่ากับ19.7

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ และpH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียสและ6.5 ตามลำดับ ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์อยู่ในช่วง 20-50 องศาเซลเซียส และความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 4.5-9.0 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ค่อนข้างทนร้อนและทนต่อสภาพความเป็นกรดและด่างได้ดี

6. เมื่อใช้สับสเตรทของเอนไซม์ในรูปของผงไคติน และผงไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่น เท่ากับ 75.9 85.4 และ 93.8 เปอร์เซ็นต์ มาบ่มกับเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้น้อยมาก แต่เมื่อใช้สับสเตรทเป็นสารละลายไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าว พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดี โดยเมื่อใช้สารละลายไคโตแซน 75.9 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรท เอนไซม์ใช้เวลาในการไฮโดรไลส์โดยสมบูรณ์ที่เวลาประมาณ 80 นาที และสำหรับสารละลายไคโตแซน 85.4 และ 93.8 เปอร์เซ็นต์จะใช้เวลาน้อยลงคือ 50 และ 25 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สับสเตรท ที่มีเปอร์เซ็นต์ดีอะเซทิลเลชั่นต่ำ เอนไซม์จะใช้เวลาในการไฮโดรไลส์อย่างสมบูรณ์นานกว่าสารละลายที่มีเปอร์เซ็นต์ดีอะเซทิลเลชั่นสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย