บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียจากดินในนาข้าว

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้บน chitin agar ได้จำนวน 220 ไอโซเลท ตัวอย่างแบคทีเรียบางไอโซเลท และแหล่งที่เก็บ (ตาราง 10)

ตาราง 10 ผลการแยกแบคทีเรียจากดินในนาข้าว

แหล่งที่พบ	ไอโซเลท	ลักษณะของดิน
อ.หางดง		
บ.ไร่ หมู่ 2	MC101	ดินเหนียวสีดำ มีเศษใบไม้ปน ความชื้นสูง
บ.ไร่ กม.ที่ 15	MC76-77	ดินเหนียวสีดำ เนื้อดินร่วนซุย
บ.หนองถาย	MC79-93	ดินเหนียวสีดำ เนื้อดินเกาะกันแน่น
อ.แม่ริม		
บ.สันทราย	MC115-116	ดินเหนียว สีน้ำตาลอ่อน มีเศษซากพืชปน
อ.แม่แตง		
บ.คงป่าลัน	MC104-114	ดินเหนียว สีดำเข้ม เม็ดดินเกาะกันแน่น
บ.โป่ง	MC116-119	ดินเหนียว สีดำเข้ม เนื้อดินละเอียด
บ.เกษตรใหม่	MC96-97	ดินเหนียว สีน้ำตาลอ่อน เนื้อดินละเอียด เม็ดดินเกาะกันแน่น
อ.สารภี		
บ.สันกับตองเหนือ	MC158	ดินเหนียว สีดำเข้ม เม็ดดินเกาะกันแน่น
บ.แฝก	MC98-103	ดินเหนียวสีดำเข้ม เม็ดดินเกาะกันแน่น มีความชื้นสูง
อ.สันป่าตอง	MC120-131	ดินเหนียวสีดำเข้ม เม็ดดินเกาะกันแน่น
อ.สันทราย	MC176, 180, 220	ดินเหนียวสีดำเม็ดดินเกาะกันแน่น มีเศษต้นข้าวปน
อ.เมือง		
แปลงทดลองปลูกข้าวคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	MC1-17	ดินเหนียว สีน้ำตาลดำ เม็ดดินเกาะกันแน่น มีเศษต้นข้าวปน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

จากการคัดเลือกแบคทีเรียทั้งสิ้น 220 ไอโซเลท โดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตไคติเนสบนอาหารแข็ง จำนวน 180 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสบนอาหารแข็ง จำนวน 36 ไอโซเลท
โดยมีค่า chitinase activity น้อยกว่า 0.5 U/gIDS

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสบนอาหารแข็ง จำนวน 10 ไอโซเลท
โดยมีค่า chitinase activity ระหว่าง 0.5-1.0 U/gIDS

กลุ่มที่ 4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสบนอาหารแข็ง จำนวน 12 ไอโซเลท
โดยมีค่า chitinase activity มากกว่า 1.0 U/gIDS

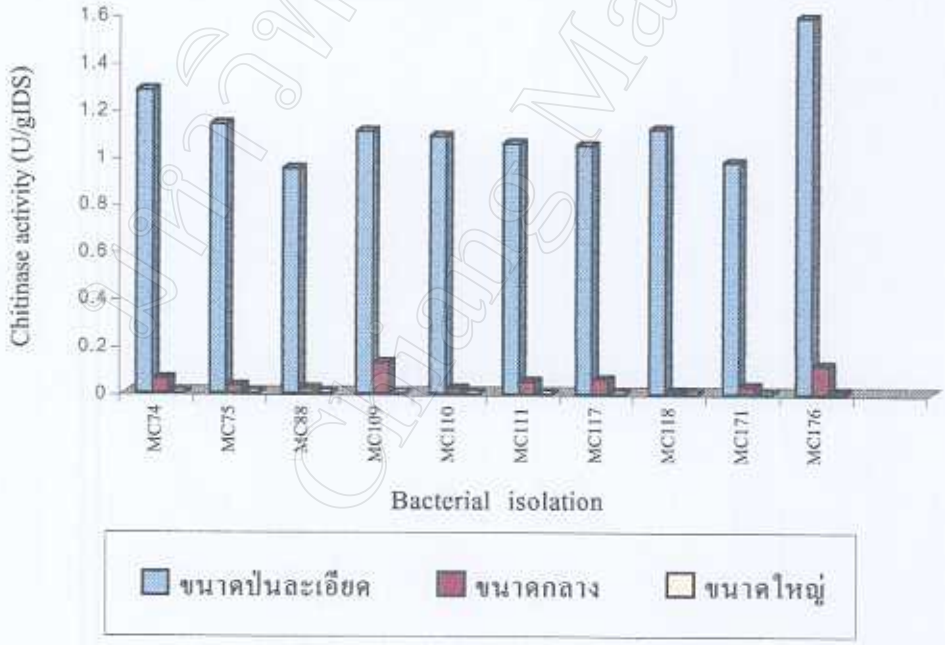
จากผลการทดลองข้างต้นจึงทำการเลือกแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 มาศึกษาขนาดอนุภาคของเปลือกกุ้งที่มีความเหมาะสมในการผลิตไคติเนส และ การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไคติเนสในอาหารเหลวและอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสได้สูงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง ขนาดต่าง ๆ

จากการนำแบคทีเรียในกลุ่มที่ 4 จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในนาข้าว ทดสอบความสามารถในการผลิตไคติเนสโดยการหมักในสภาพแข็งโดยการใช้เปลือกกุ้งขนาดต่าง ๆ คือ ขนาดป่นละเอียด ขนาดกลาง (0.5-1.0 mm) และขนาดใหญ่ (1.0-3.0 mm) พบว่าแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท คือ MC74, MC75, MC88, MC109, MC110, MC111, MC113, MC117, MC118, MC171, MC176 และ MC181 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงในเปลือกกุ้งและเปลือกกุ้งที่มีขนาดเหมาะสมในการผลิตไคติเนสได้สูงที่สุด คือ เปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด ในชุดการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโวเลท MC176 ให้ค่าการทำงานสูงสุด คือ 1.59U/gIDS (ตาราง 11 และ รูป7)

ตาราง 11 ผลเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไคติเนสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ขนาดของเปลือกกุ้งและค่า Chitinase activity (U/gIDS)		
	ป่นละเอียด	ขนาดกลาง (0.5-1.0 mm)	ขนาดใหญ่ (1.0-3.0 mm)
MC74	1.28	0.06	0
MC75	1.14	0.03	0
MC88	0.95	0.02	0
MC109	1.11	0.13	0
MC110	1.09	0.02	0
MC111	1.06	0.02	0
MC117	1.05	0.05	0
MC118	1.12	0.06	0
MC171	0.98	0.01	0
MC176	1.59	0.12	0.01



รูป 7 ค่า Chitinase activity ของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

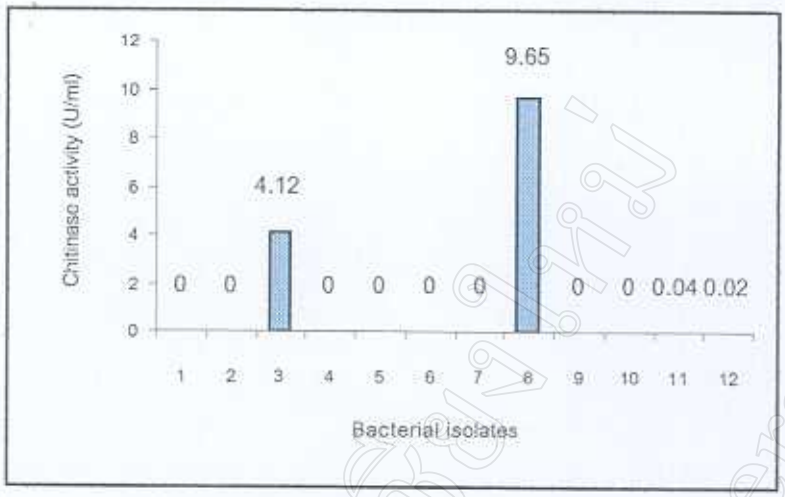
3. ผลเปรียบเทียบการผลิตไคติเนสในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีเปลือกกุ้งเป็นส่วนประกอบ

จากการเลี้ยงแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท คือ MC74, MC75, MC88, MC109, MC110, MC111, MC113, MC117, MC118, MC171, MC176 และ MC181 ในอาหารเหลว Enzyme Production Medium (EPM) เทียบกับในอาหารแข็งเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด ที่อุณหภูมิห้อง (26-28°C) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในอาหารเหลว EPM ไอโซเลท MC117 ให้ค่า chitinase activity สูงที่สุด โดยมีค่า 9.65 U/ml และ specific activityเท่ากับ 0.50 U/mg protein ส่วนไอโซเลท MC74, MC75, MC109, MC110, MC111, MC113, MC118 และ MC171 ไม่พบ chitinase activity (ตาราง 12 และ รูป 8) ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด ไอโซเลท MC176 ให้ค่า chitinase activity สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.47 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 1.02 U/mgprotein ส่วนไอโซเลท MC74, MC75, MC88, MC109, MC118, MC171, MC181 ไม่พบ chitinase activity (ตาราง 12 และ รูป 9)

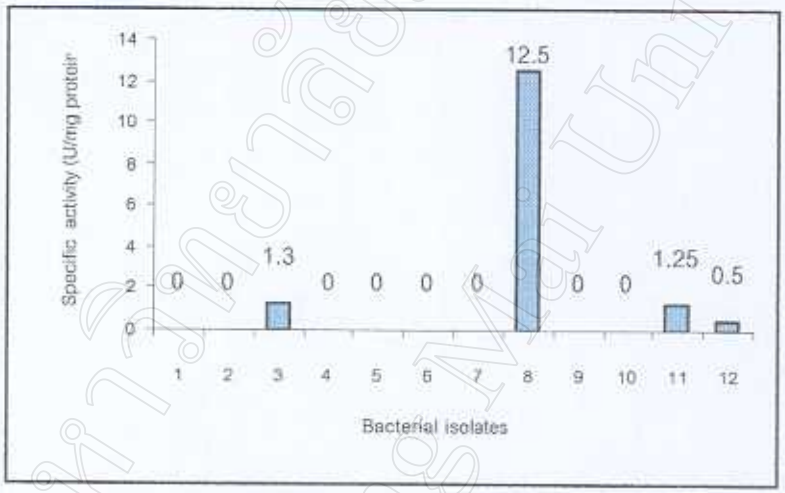
ตาราง 12 ผลเปรียบเทียบการผลิตไคติเนสในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีเปลือกกุ้งเป็นส่วนประกอบ

ไอโซเลท	อาหารเหลว enzyme production medium		อาหารแข็งเปลือกกุ้ง	
	Chitinase activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)	Chitinase activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)
74	0	0	0	0
75	0	0	0	0
88	4.12	1.30	0	0
108	0	0	0	0
110	0	0	1.37	12.0
11	0	0	1.18	10.2
113	0	0	0.65	9.5
117	9.65	12.5	0.60	8.0
118	0	0	0	0
171	0	0	0	0.42
176	0.04	1.25	1.47	12.5
181	0.02	0.5	0	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



(a)



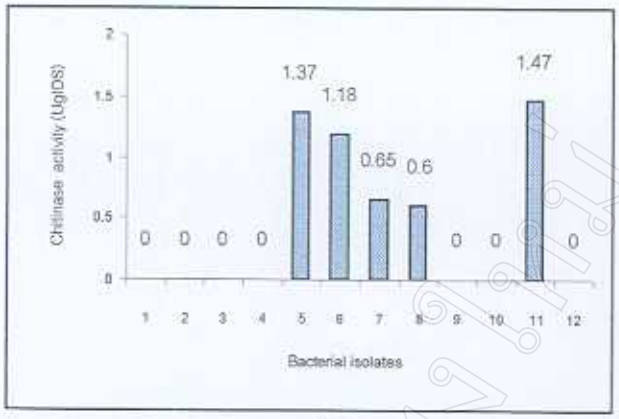
(b)

รูป 8 ผลการผลิตไคติเนสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว EPM

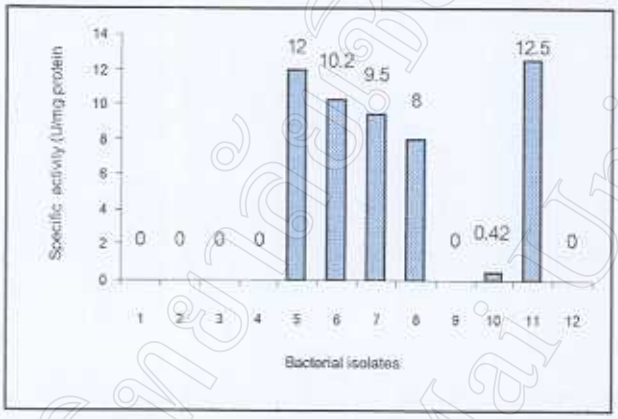
(a) chitinase activity (b) specific activity

1 = MC74, 2 = MC75, 3 = MC88, 4 = MC109, 5 = MC110, 6 = MC111, 7 = MC113

8 = MC117, 9 = MC 118, 10 = MC 171, 11 = MC176, 12 = MC181



(a)



(b)

รูป 9 ผลการผลิตไคติเนสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

(a) chitinase activity (b) specific activity

1 = MC74, 2 = MC75, 3 = MC88, 4 = MC109, 5 = MC110, 6 = MC111, 7 = MC113

8 = MC117, 9 = MC 118, 10 = MC 171, 11 = MC176, 12 = MC181

4 . การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท MC176

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท MC176 บนอาหาร nutrient agar เทียบกับบนอาหาร chitin agar ที่มีเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตาราง 13 และ รูป 10)

ตาราง 13 ผลการเปรียบเทียบลักษณะของสัณฐานวิทยาและลักษณะภายใต้กล้องของแบคทีเรีย ไอโซเลท MC176 บนอาหารแข็ง nutrient agar และ chitin agar

Morphology	Nutrient agar	Chitin agar
Shape	Granular	rhizoid
Size	0.5-1.0 mm	0.5-1.0 mm
Color	cream	cream
Surface elevation	flat	flat
Surface of colony	smooth	smooth
Edge	entire	entire
Optical character	opaque	opaque
Gram	positive	positive
Endospore Forming	positive	positive

รูป 10 การเจริญของ *Bacillus thuringiensis* MC176 บน nutrient agar และ chitin agar

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการพบว่าอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus thuringiensis* โดยให้ผลการทดสอบดังนี้ (ตาราง 14)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตาราง 14 ผลการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท MC 176 เทียบกับ *Bacillus thuringiensis*

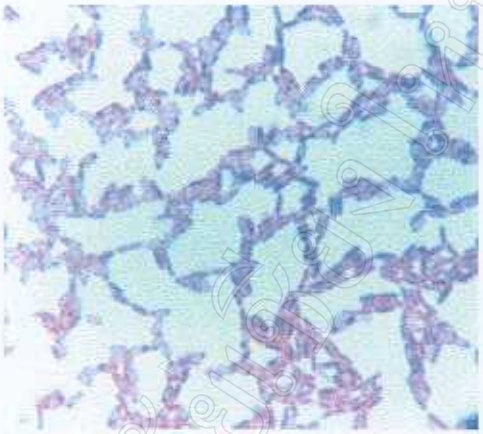
Characteristic	MC176	*B. thuringiensis*
Catalase	+	+
Voges-Proskaver test	+	d
PH in V-P broth	-	+
PH < 6 and >7	-	-
Acid form		
D-glucose	+	+
L-arabinose	-	-
D-xylose	-	-
D-mannitol	+	-
Hydrolysis of casein	+	+
Gelatin	-	+
Starch	+	+
Utilization of citrate	+	+
Nitrate reduce to nitrite	+	+
Formation of indole	+	-
Growth in NaCl		
2%, 5% and 7%	+	+
10%	+	ND
Growth at		
30°C	+	+
40°C	+	+
50°C	+	-
55°C	+	-
Growth at pH 5.7 and 6.8	+	+

หมายเหตุ + = positive, - = negative และ ND = No data available D = negative or positive

ที่มา : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. (1994)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

จากการตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท MC176 สามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มของ Endospore forming Gram-Positive Rods and Cocci และบ่งบอกชนิดได้ว่าเป็น *Bacillus thuringiensis*



รูป 11 ลักษณะภายใต้กล้องของ *Bacillus thuringiensis* MC176 หลังการย้อมสีกรัม

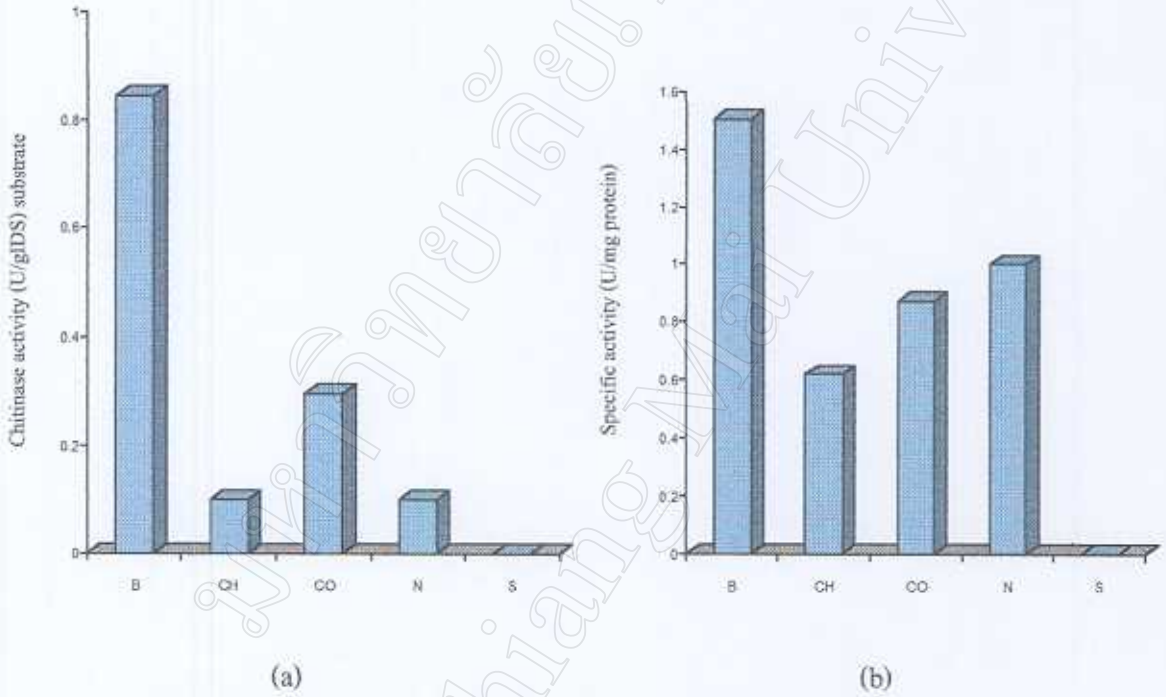
4. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

4.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแข็ง ใช้เปลือกกุ้งเป็นสับสเตรท มีปริมาณเท่ากับ 5 กรัม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ปริมาตรอาหารพื้นฐาน 10 ml ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 5 ชนิด คือ 0.5% (w/v) ball-milled chitin, chitosan, colloidal chitin, N-acetylglucosamine และ swollen chitin พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงที่สุด ในอาหารพื้นฐานที่มี ball-milled chitin เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.84 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 1.50 U/mg protein (ตาราง 15 และ รูป 12)

ตาราง 15 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

แหล่งคาร์บอน (0.5% w/v)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
Ball-milled chitin	0.846	1.50
Chitosan	0.100	0.62
Colloidal chitin	0.296	0.87
N-acetylglucosamine	0.100	1.0
Swollen chitin	0.000	0.0



(a) (b)

รูป 12 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

(a) chitinase activity (b) specific activity

*B = Ball-milled chitin, CH = Chitosan, CO = Colloidal chitin

N = N-acetylglucosamine, S = Swollen chitin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

4.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแช็ง ใช้เปลือกกุ้งป่นปริมาตร 5 กรัม เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารพื้นฐาน 10 ml ที่มี ball-milled chitin, chitosan, colloidal chitin, N-acetylglucosamine และ swollen chitin เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณต่าง ๆ กัน ดังนี้ คือ 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1.0% (w/v) พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงที่สุด เมื่อมีปริมาณ ball-milled chitin ในอาหารพื้นฐานเท่ากับ 1.0% (w/v) โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 1.09 U/gIDS และ specific activity เท่า กับ 1. 91 U/mg protein (ตาราง 16, 17 และ รูป13)

ตาราง 16 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

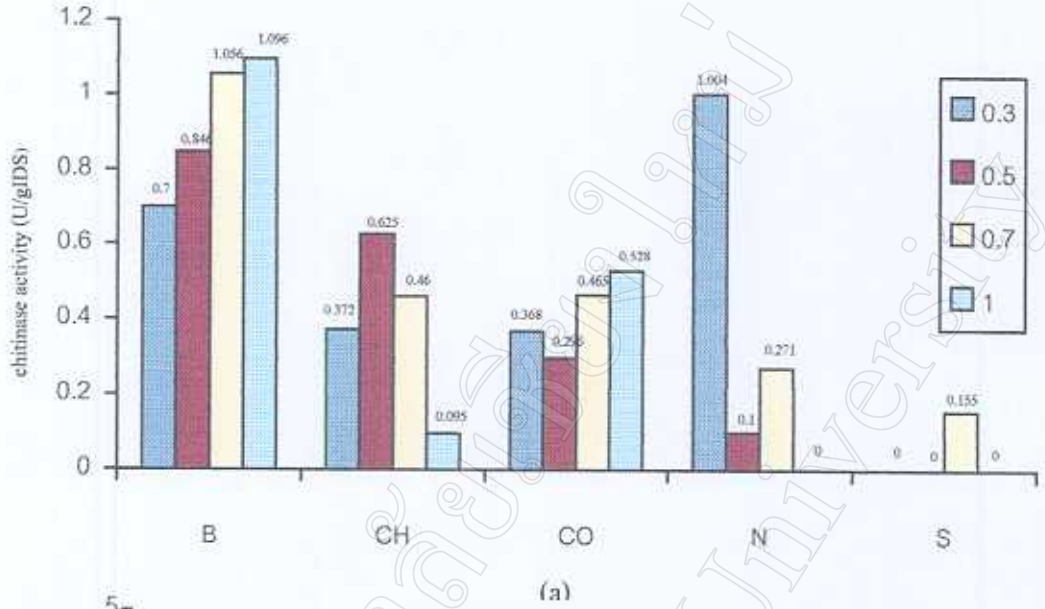
Chitinase activity (U/g IDS)

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (% w/v)			
	0.3	0.5	0.7	1.0
Ball-milled chitin	0.700	0.846	1.056	1.096
Chitosan	0.372	0.625	0.46	0.095
Colloidal chitin	0.368	0.296	0.465	0.528
N-acetylglucosamine	1.004	0.100	0.271	0.00
Swollen chitin	0.00	0.00	0.155	0.00

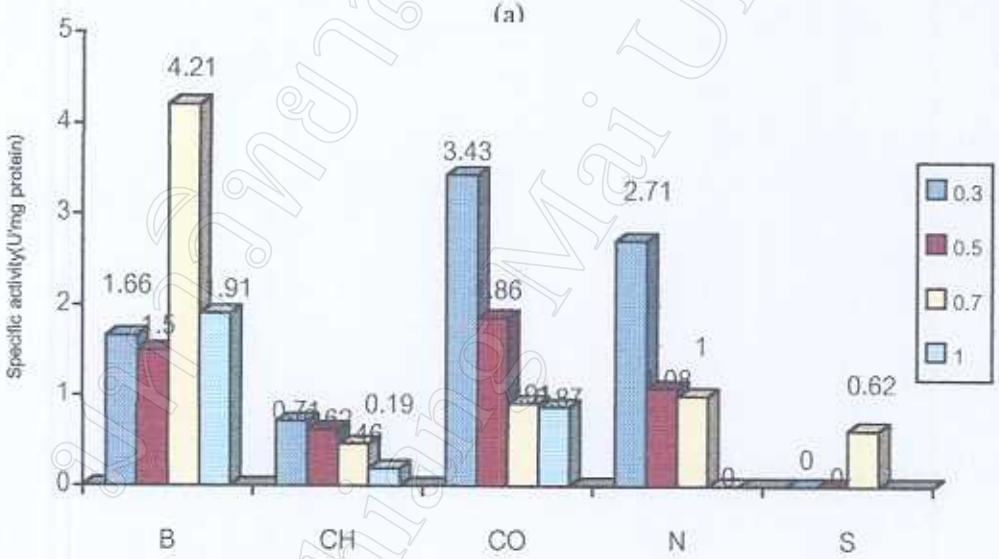
ตาราง 17 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

Specific activity (U/mg protein)

ชนิดของแหล่งคาร์บอน	ปริมาณของแหล่งคาร์บอน (% w/v)			
	0.3	0.5	0.7	1.0
Ball-milled chitin	1.66	1.50	4.21	1.91
Chitosan	0.71	0.62	0.46	0.18
Colloidal chitin	3.43	1.86	0.91	0.87
N-acetylglucosamine	2.71	1.08	1.00	0.0
Swollen chitin	0.0	0.0	0.62	0.0



(a)



(b)

รูป 13 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) chitinase activity (b) specific activity

*B = ball-milled chitin, CH = Chitosan, CO = Colloidal chitin

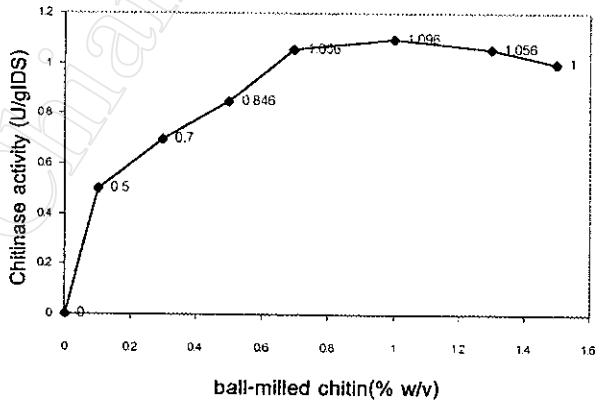
N = N-acetylglucosamine, S = Swollen chitin

5.3 ผลของปริมาณ ball-milled chitin ต่อการสร้าง chitinase

การสร้างไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มีปริมาณ ball-milled chitin ต่างกัน พบว่า chitinase activity จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ ball-milled chitin และมีระดับสูงที่สุดเท่ากับ 1.09 U/gIDS ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่มี ball-milled chitin 1.0% เมื่อความเข้มข้นของ ball-milled chitin เพิ่มขึ้นมากกว่า 1.0% chitinase activity จะค่อย ๆ ลดลง ดังนั้นปริมาณ ball-milled chitin ที่เหมาะสมจึงเท่ากับ 1.0% เพราะเป็นปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้มี chitinase activity สูงที่สุด (ตาราง18 และ รูป 14)

ตาราง 18 ผลของปริมาณ ball-milled chitin ต่อการสร้าง chitinase โดย *Bacillus thuringiensis* MC176

ball-milled chitin (% w/v)	Chitinase activity (U/gIDS)
0	0
0.1	0.500
0.3	0.700
0.5	0.846
0.7	1.056
1.0	1.096
1.3	1.056
1.5	1.000



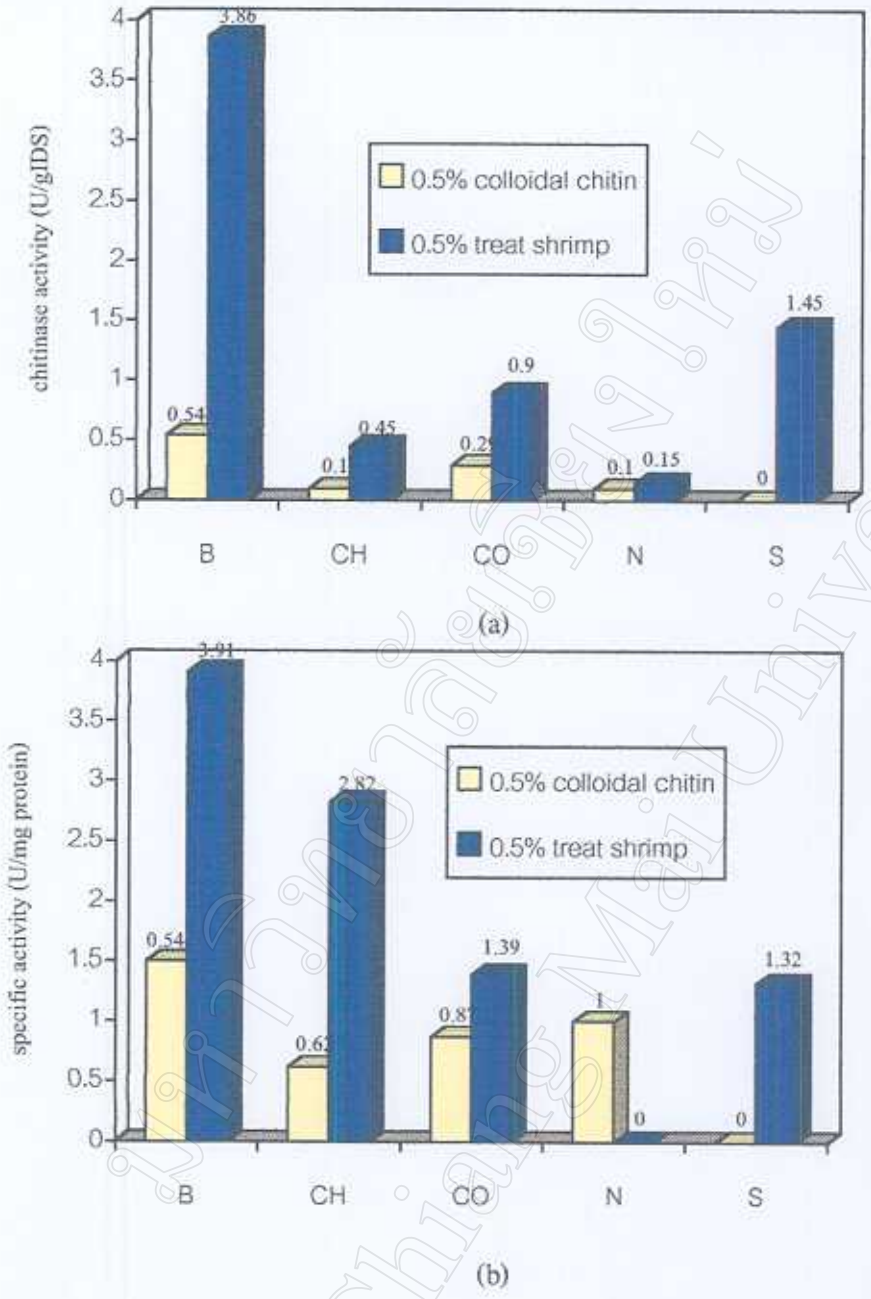
รูป 14 ผลของปริมาณ ball-milled chitin ต่อการผลิต chitinase ของ *Bacillus thuringiensis* MC176

5.4 ชนิดของสับสเตรทที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแข็งเปลือกกุ้งป่นปริมาตร 5 กรัม ผสมกับแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ คือ 0.5% (w/v) ball-milled chitin, chitosan, colloidal chitin, N-acetylglucosamine และ swollen chitin บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 วัน ต่อจากนั้นนำไปวัด chitinase activity โดยใช้สับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับไคติเนส ต่างกัน 2 ชนิด คือ 0.5% colloidal chitin และ 0.5% treated shrimp พบว่า crude enzyme ที่สกัดจากอาหารแข็งเปลือกกุ้งสามารถทำปฏิกิริยากับ 0.5% treated shrimp ได้ดีกว่า 0.5% colloidal chitin โดยมีค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 3.86 U/gIDS และมีค่า specific activity เท่ากับ 30.9 U/mg protein (ตาราง 19 และ รูป 15)

ตาราง 19 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176

ชนิดของแหล่งคาร์บอน 0.5% (w/v)	ชนิดของสับสเตรทที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ crude enzyme			
	ค่า chitinase activity (U/gIDS)		ค่า specific activity (U/mg protein)	
	0.5% colloidal chitin	0.5% treated shrimp	0.5% colloidal chitin	0.5% treated shrimp
Ball-milled chitin	0.54	3.86	1.50	3.91
Chitosan	0.10	0.45	0.62	2.82
Colloidal chitin	0.29	0.90	0.87	1.39
N-acetylglucosamine	0.10	0.15	1.00	0.00
Swollen chitin	0.00	1.45	0.00	1.32



รูป 15 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) chitinase activity (b) specific activity

B = ball-milled chitin, CH = Chitosan, CO = Colloidal chitin

N = N-acetylglucosamine, S = Swollen chitin

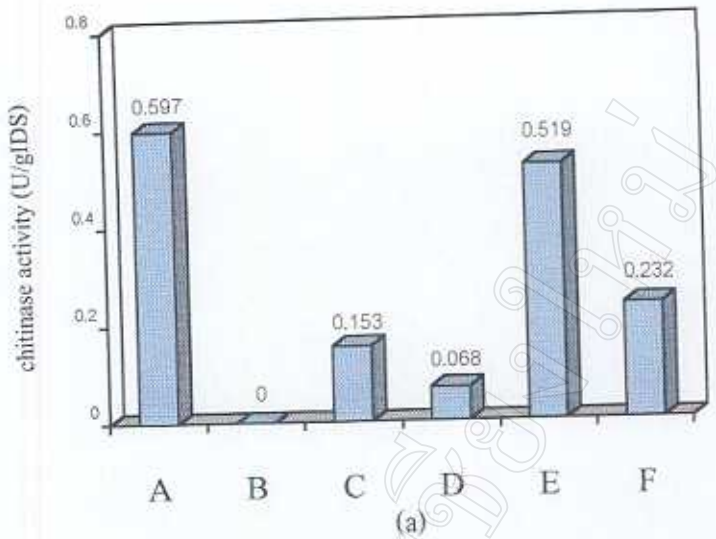
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

5.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

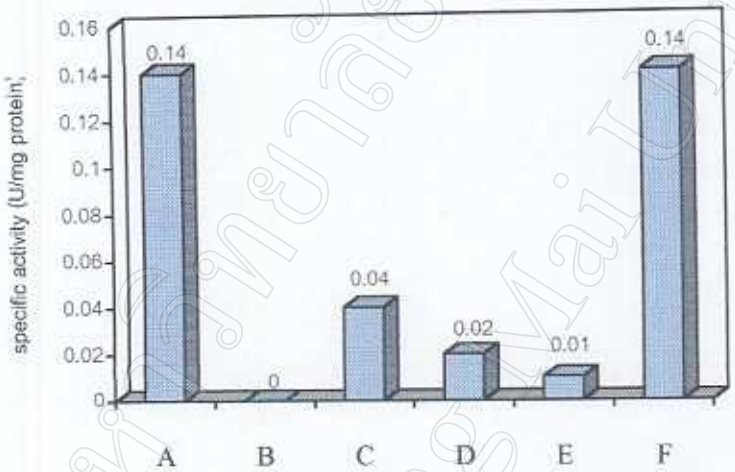
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแข็งเปลือกกุ้งป่นปริมาตร 5 กรัม ที่มีปริมาณอาหารพื้นฐาน 10 ml และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 14 วัน ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด คือ 0.5% (w/v) peptone, urea, soy bean, $NaNo_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงสุด ในอาหารพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.59 U/gIDS และมีค่า specific activity เท่ากับ 0.14 U/mg protein (ตาราง 20 และ รูป 16)

ตาราง 20 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

แหล่งไนโตรเจน (0.5% w/v)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg)
Control	0.597	0.14
Peptone	0.00	0.0
Urea	0.153	0.04
Soy bean	0.068	0.02
$NaNo_3$	0.519	0.01
$(NH_4)_2SO_4$	0.232	0.14



(a)



(b)

รูป 16 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) chitinase activity (b) specific activity

A = control, B = peptone, C = urea,

D = soy bean, E = sodium nitrate F, = ammonium sulfate

5.6 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแข็งเปลือกกุ้งป่นปริมาตร 5 กรัมเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 ในอาหารพื้นฐาน 10 mlที่มี peptone, urea, soy bean, $NaNo_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1.0% (w/v) พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงสุดเมื่อมีไนโตรเจนในอาหารพื้นฐาน โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.59 U/gIDS และมีspecific activity เท่ากับ 0.14 U/mg protein (ตาราง 21 และ รูป 17)

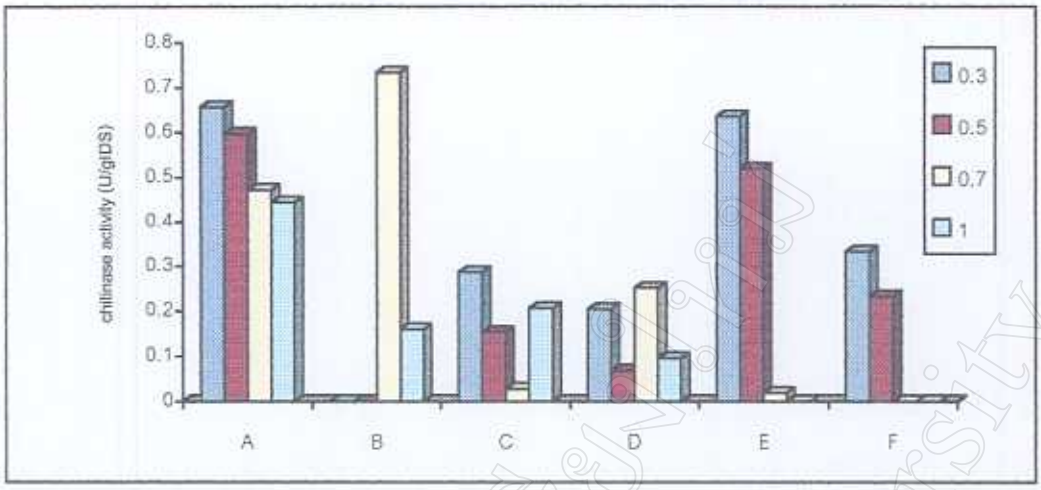
ตาราง 21 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

ค่า chitinase activity (U/g IDS)

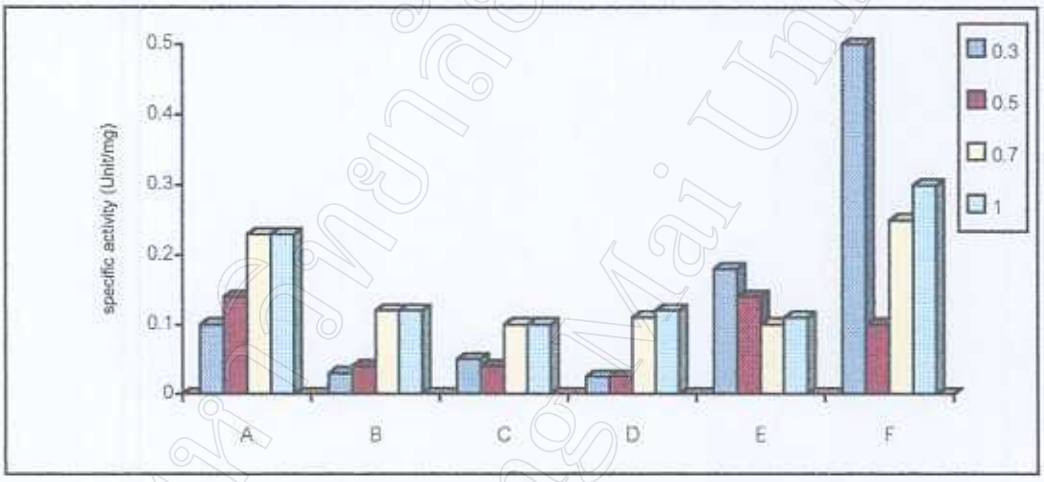
ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (% w/v)			
	0.3	0.5	0.7	1.0
Control	0.657	0.597	0.473	0.444
Peptone	0.00	0.00	0.734	0.159
Urea	0.287	0.153	0.028	0.207
Soy bean	0.204	0.068	0.251	0.096
$NaNo_3$	0.637	0.519	0.019	0.0
$(NH_4)_2SO_4$	0.333	0.232	0.00	0.0

ค่า specific activity (U/mg protein)

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (% w/v)			
	0.3	0.5	0.7	1.0
Control	0.10	0.14	0.23	0.23
Peptone	0.03	0.04	0.12	0.12
Urea	0.05	0.04	0.10	0.10
Soy bean	0.025	0.025	0.11	0.12
$NaNo_3$	0.18	0.14	0.10	0.11
$(NH_4)_2SO_4$	0.25	0.01	0.25	0.30



(a)



(b)

รูป 17 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) chitinase activity (b) specific activity

*A = control, B = peptone, C = urea

D = soy bean, E = sodium nitrate F, = ammonium sulphate

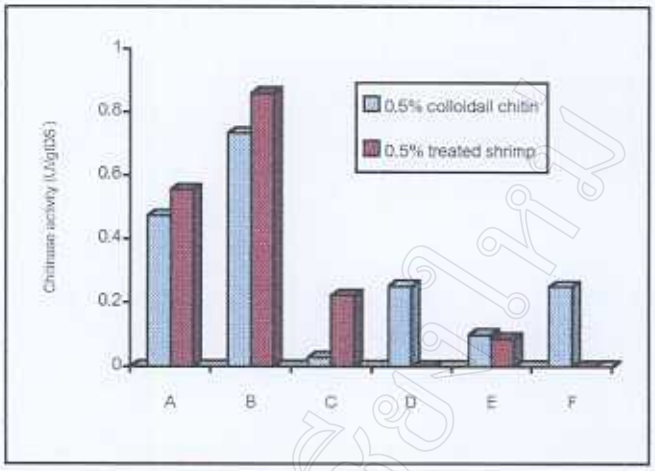
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

5.7 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176

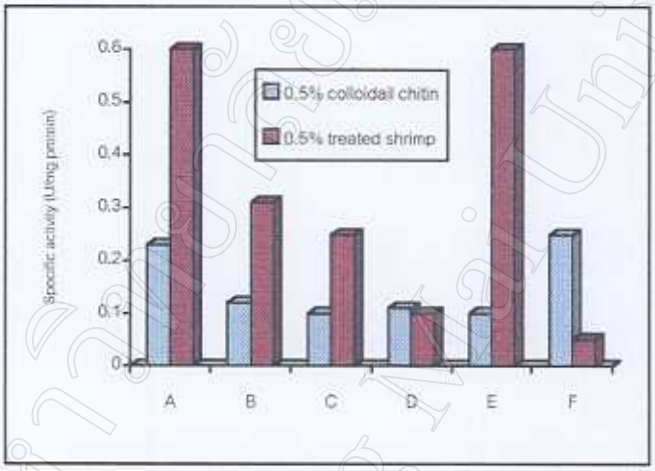
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารพื้นฐาน 10 ml ที่มีเปลือกกุ้งป่นผสมกับ 1.0% (w/v) ball-milled chitin และ แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ 0.5% (w/v) ที่มี peptone, urea, soy bean, $NaNo_3$ และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน ต่อจากนั้นนำไปวัดค่า chitinase activity โดยใช้สับสเตรทที่ทำปฏิกิริยากับไคติเนสต่างกัน 2 ชนิด คือ 0.5% colloidal chitin และ 0.5% treated shrimp พบว่า crude enzyme ที่สกัดจากอาหารแข็งเปลือกกุ้ง สามารถทำปฏิกิริยากับ 0.5% treated shrimp ได้ดีกว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับ 0.5% colloidal chitin โดยมีค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 0.86 U/gIDS และมีค่า specific activity เท่ากับ 0.12 U/mg protein (ตาราง 22 และ รูป 18)

ตาราง 22 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (0.5% w/v)	ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (% w/v)			
	ค่า chitinase activity (U/gIDS)		ค่า specific activity (U/mg protein)	
	0.5% colloidal chitin	0.5% treated shrimp	0.5% colloidal chitin	0.5% treated shrimp
Control	0.47	0.55	0.23	0.60
Peptone	0.73	0.86	0.12	0.31
Urea	0.02	0.22	0.10	0.25
Soy bean	0.25	0.00	0.11	0.10
$NaNo_3$	0.10	0.08	0.10	0.60
$(NH_4)_2SO_4$	0.25	0.00	0.25	0.05



(a)



(b)

รูป 18 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) chitinase activity (b) specific activity

*A = control, B = peptone, C = urea,

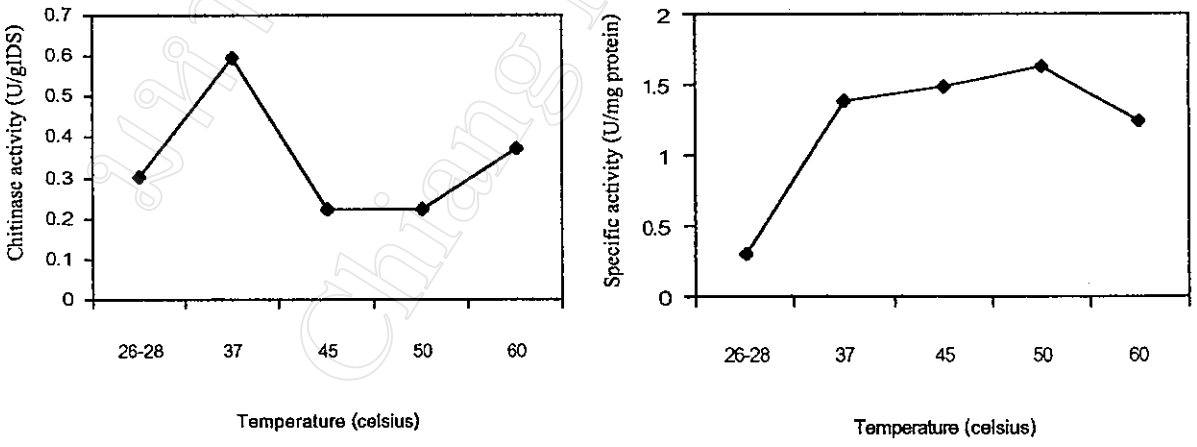
D = soy bean, E = sodium nitrate F, = ammonium sulfate

5.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176โดยการหมักในสภาพแข็งเปลือกกุ้งป่นปริมาตร 5 กรัม เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ อุณหภูมิห้อง (26-28°C) , 37 °C, 45 °C, 50 °C และ 60 °C พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.35 U/gIDS และ มีค่า specific activity เท่ากับ 0.32 U/mg protein (ตาราง 23 และ รูป 19)

ตาราง 23 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

อุณหภูมิ (°C)	chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
อุณหภูมิห้อง (26-28°C)	0.301	0.30
37	0.597	1.39
45	0.221	1.49
50	0.224	1.63
60	0.370	1.25



รูป 19 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

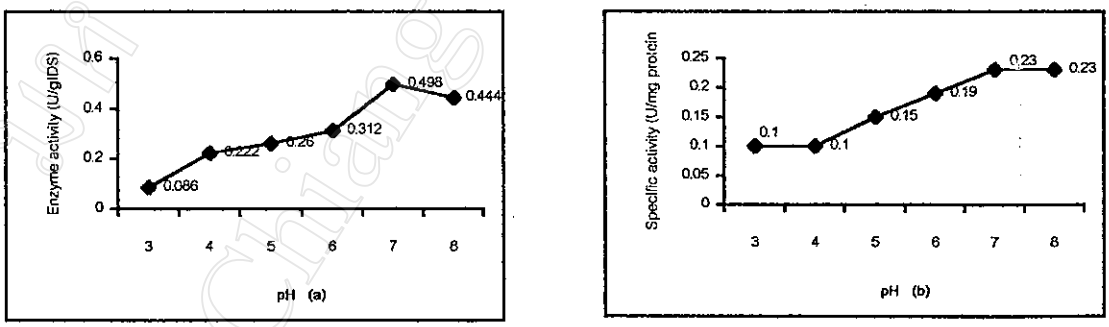
(a) chitinase activity (b) specific activity

5.9 pH เริ่มต้นของอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในสภาพแข็งที่มีเปลือกกุ้งป่น ปริมาตร 5 กรัม เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารพื้นฐาน ปริมาตร 10 ml ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน คือ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงที่สุดในอาหารพื้นฐานที่มี pH เท่ากับ 7 โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.49 U/gIDS และมีค่า specific activity เท่ากับ 0.23 U/mg protein (ตาราง 24 และ รูป 20)

ตาราง 24 pHเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

อุณหภูมิ (°C)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/ mg protein)
3	0.086	0.10
4	0.222	0.10
5	0.260	0.15
6	0.312	0.19
7	0.498	0.23
8	0.444	0.23



(a) (b)

รูป 20 pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176

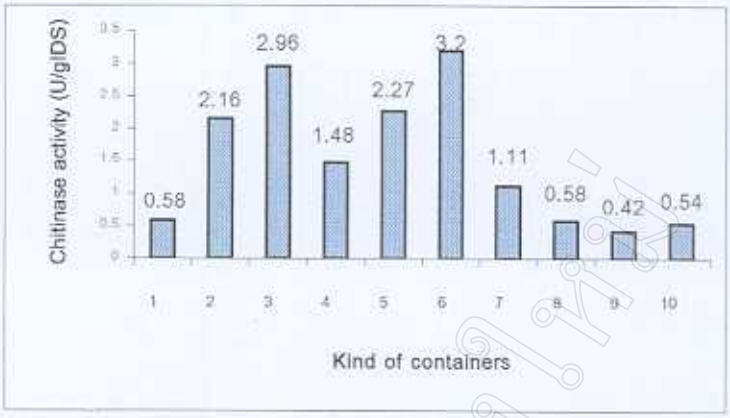
(a) chitinase activity (b) specific activity

5.10. ชนิดและขนาดของภาชนะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

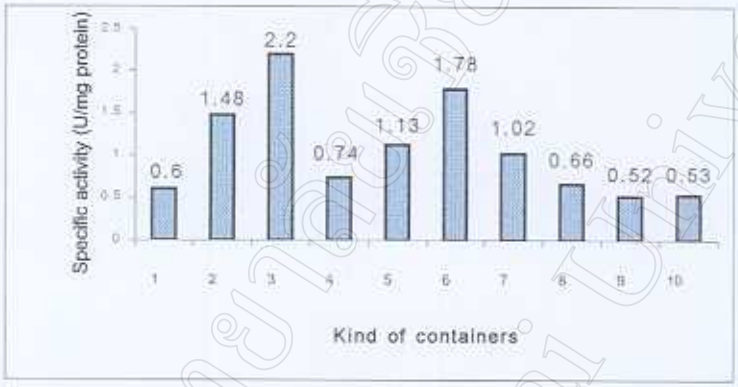
จากการเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารพื้นฐาน pH 7.0 ปริมาตร 10 ml ร่วมกับเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียดในขวดสีชาขนาด 3,000 ml ขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 ml 1,000 ml 500 ml 250 ml 125 ml และ 100 ml ถุงพลาสติกขนาด 8 x 12 นิ้ว ขนาด 18 x 12 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุน และ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด คือ chitinase activity เท่ากับ 3.20 U/gIDS และ คือ ขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 2.96 U/g IDS และ specific activity 2.20 U/mg protein (ตาราง 25 และรูป 21)

ตาราง 25 Chitinase activity และ specific activity ของ *Bacillus thuringiensis* MC 176 เมื่อเลี้ยงในภาชนะต่าง ๆ ในการหมักสภาพแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 14 วัน

ภาชนะ	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
ขวดสีชา 3,000 ml	0.58	0.60
ขวดรูปชมพู่ 2,000 ml	2.16	1.48
ขวดรูปชมพู่ 1,000 ml	2.96	2.20
ขวดรูปชมพู่ 500 ml	1.48	0.74
ขวดรูปชมพู่ 250 ml	2.27	1.13
ขวดรูปชมพู่ 125 ml	3.20	1.78
ขวดรูปชมพู่ 100 ml	1.11	1.02
ถุงพลาสติก 8 X 12 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุน	0.58	0.66
ถุงพลาสติก 18 X 12 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุน	0.42	0.52
จานอาหารเลี้ยงเชื้อ	0.84	0.53



(a)



(b)

รูป 21 ผลของชนิดและขนาดของภาชนะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176 (a) Chitinase activity (b) Specific activity

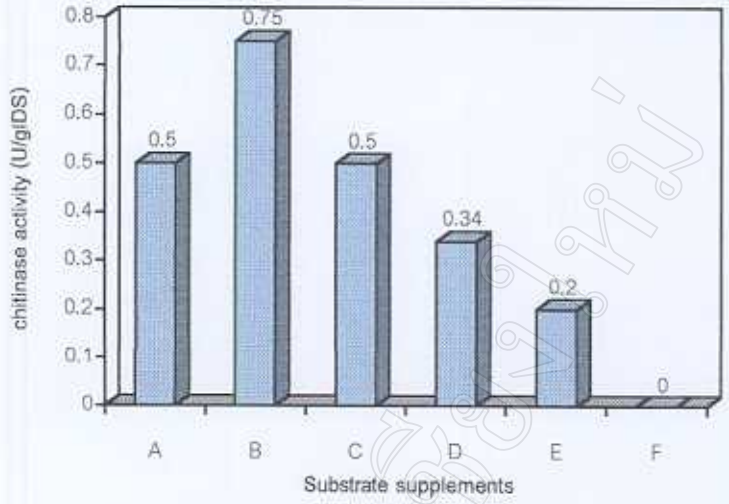
1. ขวดสีชา 3,000 ml
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 2,000 ml
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 1,000 ml
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml
5. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml
6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 ml
7. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100 ml
8. ถุงพลาสติก 8× 12 นิ้ว ไม่มีรูพรุน
9. ถุงพลาสติก 18× 12 นิ้ว ไม่มีรูพรุน
10. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.11 สับสเตรทเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176

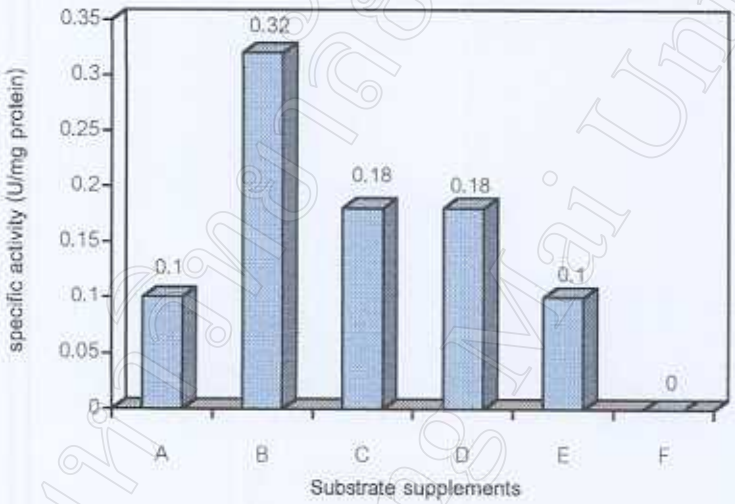
จากการเพาะ *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยมีสับสเตรทเป็นเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด ปริมาตร 2.5 กรัม ร่วมกับสับสเตรทอื่น ๆ ปริมาณ 2.5 กรัม ได้แก่ กากมะพร้าว กากถั่วเหลือง ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา และ ฟางข้าว ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ร่วมกับอาหารพื้นฐาน pH 7.0 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสับสเตรทที่เป็นเปลือกกุ้ง และ ฟางข้าว *Bacillus thuringiensis* MC176 จะผลิตเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานสูงสุด คือ chitinase activity เท่ากับ 0.53 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.32 U/mg protein รองลงมา คือ กากถั่วเหลือง ไม่พบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC 176 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ กากมะพร้าว ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา และ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา (ตาราง 26 และ รูป 22) สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ไม่พบค่าการทำงานจากเอนไซม์ไคติเนสของเปลือกกุ้งและ สับสเตรทอื่น ๆ

ตาราง 26 Chitinase activity และ specific activity ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 เมื่อเติมสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ในการหมักสภาพแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน

Substrate supplement	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
เปลือกกุ้ง (ชุดควบคุม)	0.50	0.10
ฟางข้าว	0.75	0.32
กากถั่วเหลือง	0.50	0.18
กากถั่วลิสง	0.34	0.18
กากมะพร้าว	0.20	0.10
ขี้เลื่อย	0.00	0.00



(a)



(b)

รูป 22 ชนิดของสับสเตรทเสริมที่มีผลต่อการผลิต chitinaseของ *Bacillus thuringiensis* MC176

(a) Chitinase activity (b) Specific activity

A = เปลือกกุ้ง (ชุดควบคุม), B = ฟางข้าว, C = กากถั่วเหลือง

D = กากถั่วลิสง, E = กากมะพร้าว, F = ขี้เลื่อย

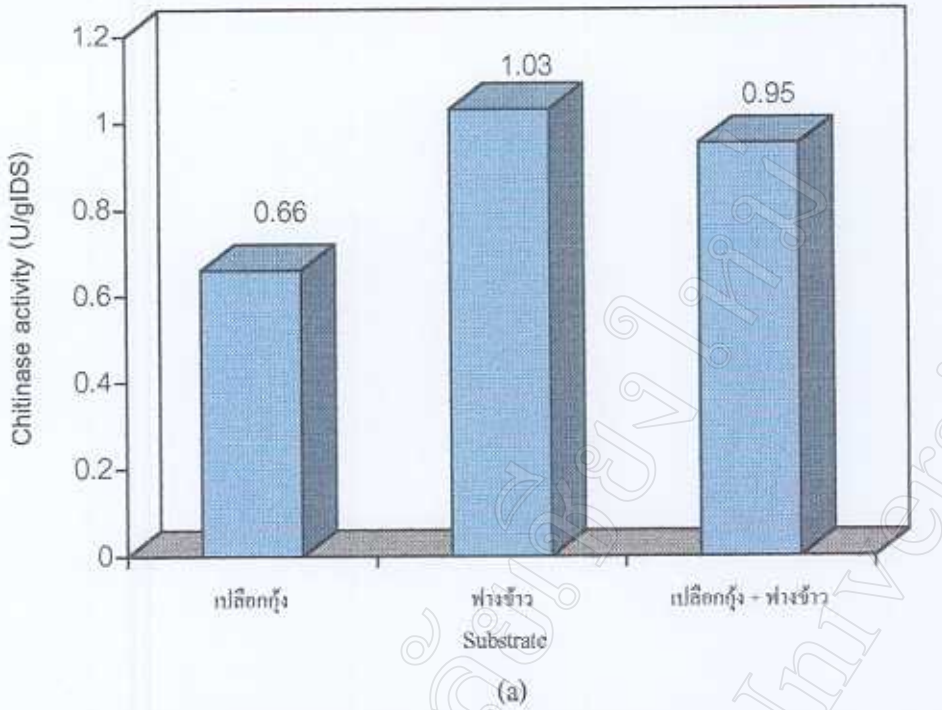
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

5.12 การหาไคติเนสของอาหารแข็งฟางข้าว

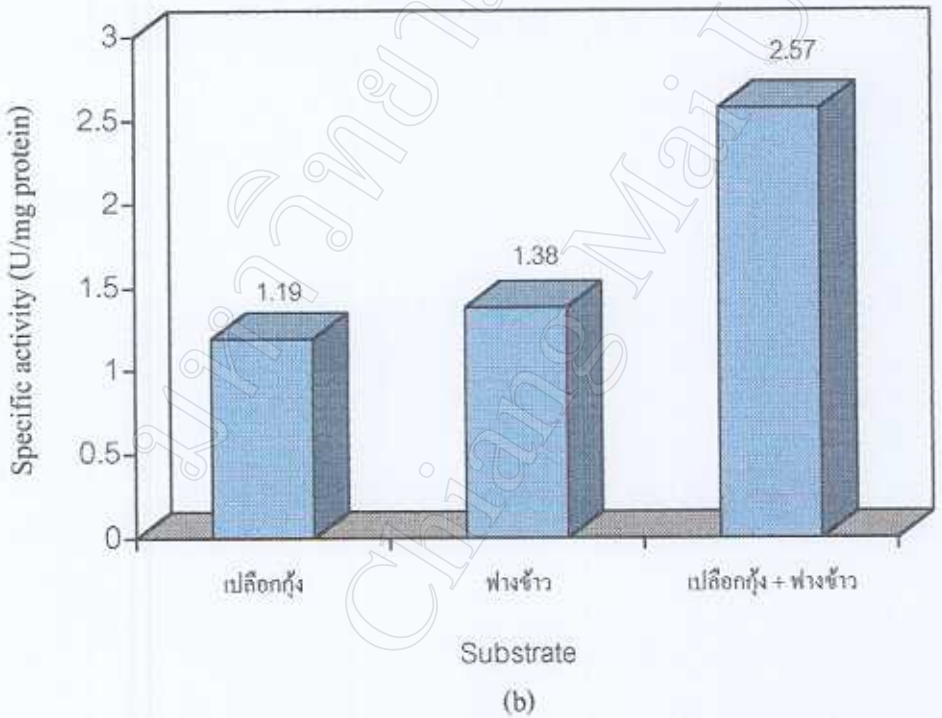
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยมีสับสเตรทเป็นเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด ปริมาตร 5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ใช้ฟางข้าวเป็นสับสเตรทปริมาตร 5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml และเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยใช้ฟางข้าวปริมาตร 2.5 กรัม ผสมกับเปลือกกุ้ง ปริมาตร 2.5 กรัม ร่วมกับอาหารพื้นฐาน pH 7.0 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสับสเตรทที่เป็นฟางข้าว *Bacillus thuringiensis* MC176 จะผลิตเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานสูงสุด คือ 1.03 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 1.19 U/mg protein รองลงมา คือ เปลือกกุ้งผสมกับฟางข้าว และ เปลือกกุ้ง ตามลำดับ (ตาราง 27 และ รูป 23) สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อลงไป ไม่พบค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสของเปลือกกุ้งและฟางข้าว

ตาราง 27 Chitinase activity และ specific activity ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยใช้เปลือกกุ้งและฟางข้าวเป็นสับสเตรทในการหมักสภาพแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14 วัน

สับสเตรท	Chitinase activity (U/g IDS)	Specific activity (U/mg protein)
เปลือกกุ้ง	0.666	1.19
ฟางข้าว	1.039	1.38
เปลือกกุ้งผสมฟางข้าว	0.952	2.57



(a)



(b)

รูป 23 การผลิตไคติเนสของ *Bacillus thuringiensis* MC176 เมื่อเพาะเลี้ยงโดย เปลือกกุ้ง ฟางข้าว และเปลือกกุ้งผสมฟางข้าว

(a) chitinase activity (b) specific activity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

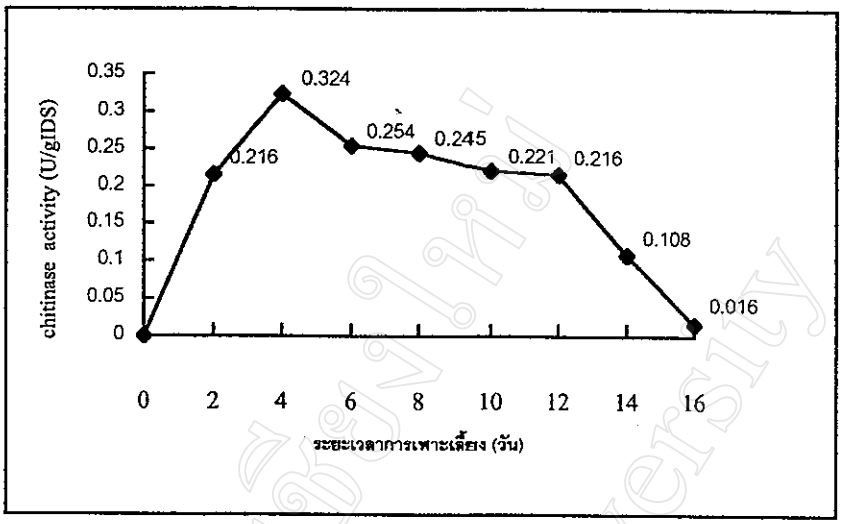
5.13 ผลการศึกษาระยะเวลาในการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ต่อการผลิตไคติเนสในอาหารเหลว EPM และอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

5.13 (1) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารเหลว EPM

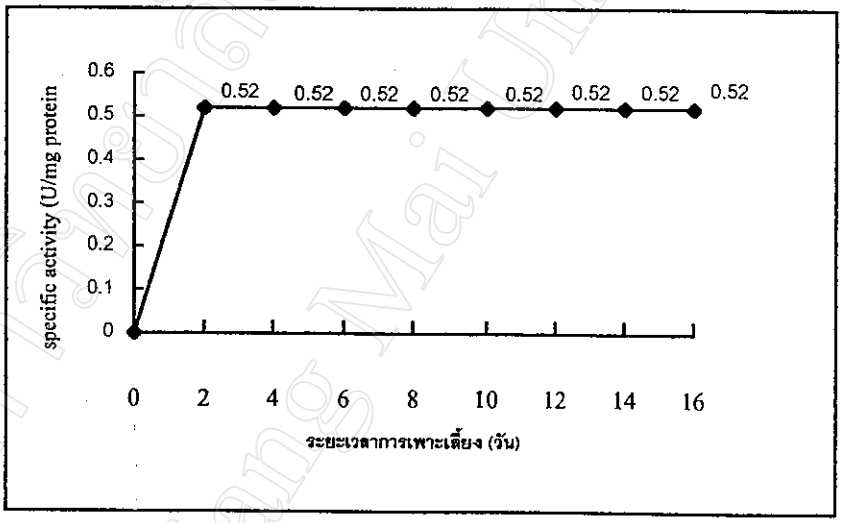
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในอาหารเหลว EPM บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C มีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 , 14 และ 16 วัน พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC 176 มีค่าการทำงานของไคติเนสสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.32 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.52 U/mg protein (ตาราง 28 และ รูป 24)

ตาราง 28 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC 176 ในอาหารเหลว EPM ต่อการผลิตไคติเนส

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
0	0.000	0.00
2	0.216	0.52
4	0.324	0.52
6	0.254	0.52
8	0.245	0.52
10	0.221	0.52
12	0.216	0.52
14	0.108	0.52
16	0.016	0.52



(a)



(b)

รูป 24 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารเหลว EPM ต่อการผลิตไคติเนส

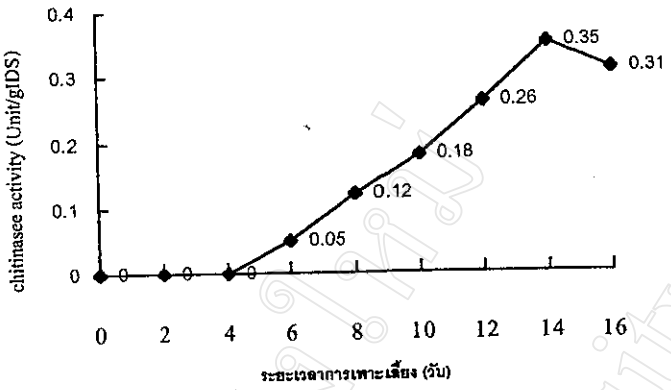
(a) chitinase activity (b) specific activity

5.14 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งต่อการผลิตไคติเนส

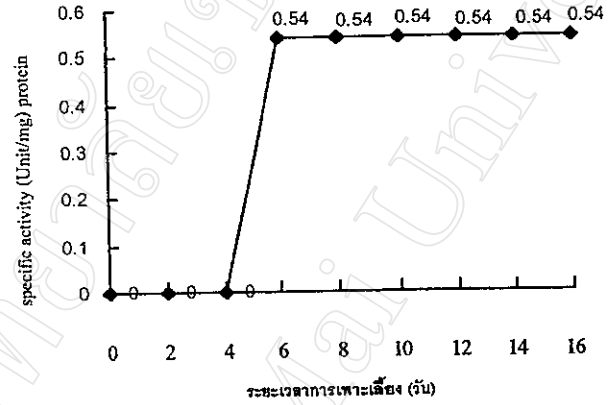
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการหมักในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบ่มที่อุณหภูมิ 37°C มีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันคือ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 วัน พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC 176 มีค่าการทำงานของไคติเนสสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.35 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.54 U/mg protein (ตาราง 29 และ รูป 25)

ตาราง 29 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็งเปลือกกุ้งต่อการผลิตไคติเนส

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
0	0.00	0.00
2	0.00	0.00
4	0.00	0.00
6	0.05	0.54
8	0.12	0.54
10	0.18	0.54
12	0.26	0.54
14	0.35	0.54
16	0.31	0.54



(a)



(b)

รูป 25 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 ในอาหารแข็ง เปลือกกุ้ง ต่อการผลิตไคติเนส

(a) chitinase activity (b) specific activity

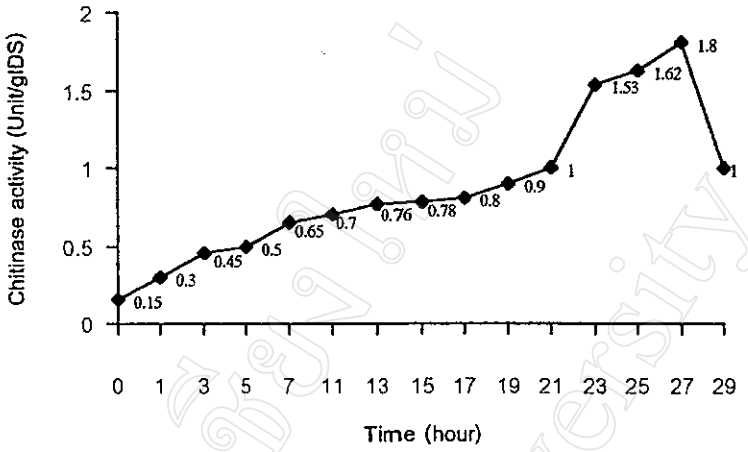
6. การทำให้เกิดการกลายพันธุ์

จากการทดลอง ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยวิธีการให้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาการให้รังสีนานขึ้น การผลิต chitinase activity ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 จะเพิ่มขึ้น (ตาราง 30 และ รูป 26)

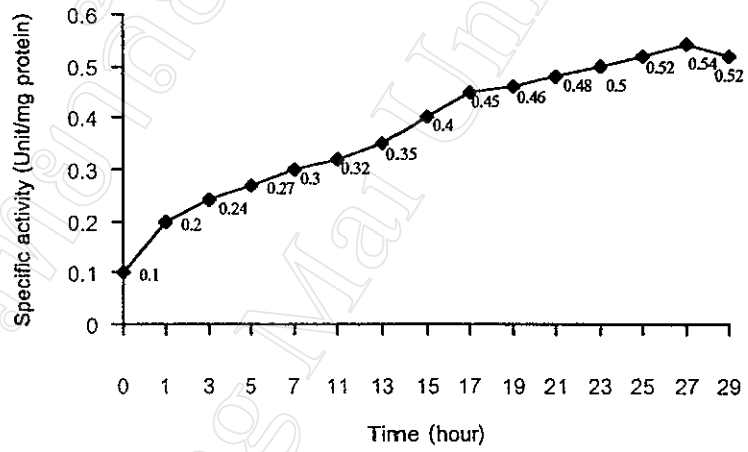
ตาราง 30 ค่า chitinase activity ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 หลังจากให้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

Time (hour)	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
0	0.15	0.10
1	0.30	0.20
3	0.45	0.24
5	0.50	0.27
7	0.65	0.30
11	0.70	0.32
13	0.76	0.35
15	0.78	0.40
17	0.80	0.45
19	0.90	0.46
21	1.00	0.48
23	1.53	0.50
25	1.62	0.52
27	1.80	0.54
29	1.00	0.52

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



(a)



(b)

รูป 26 ผลการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis* MC176 หลังจากให้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

(a) chitinase activity (b) specific activity

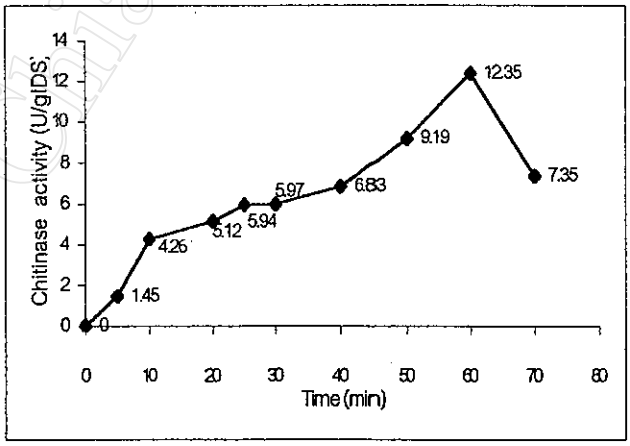
7. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ crude enzyme ที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์

7.1 ผลของเวลาที่บ่มเอนไซม์กับสับสเตรท

จากการตรวจวัด chitinase activity ของไคติเนสที่ผลิตขึ้นจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ผ่านการทำให้เกิดการการกลายพันธุ์ในระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน คือ 0, 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50 , 60 , 70, 80, 90 และ 100 นาที พบว่าที่ระยะเวลา 60 นาที เอนไซม์จะมีค่าการทำงานสูงสุดโดยมี chitinase activity เท่ากับ 12.35 U/gIDS (ตาราง 31 และ รูป 27)

ตาราง 31 เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์ไคติเนส

เวลา (นาที)	Chitinase activity (U/gIDS)
0	0.30
5	1.45
10	4.26
20	5.12
25	5.97
30	5.97
40	6.83
50	9.19
60	12.35



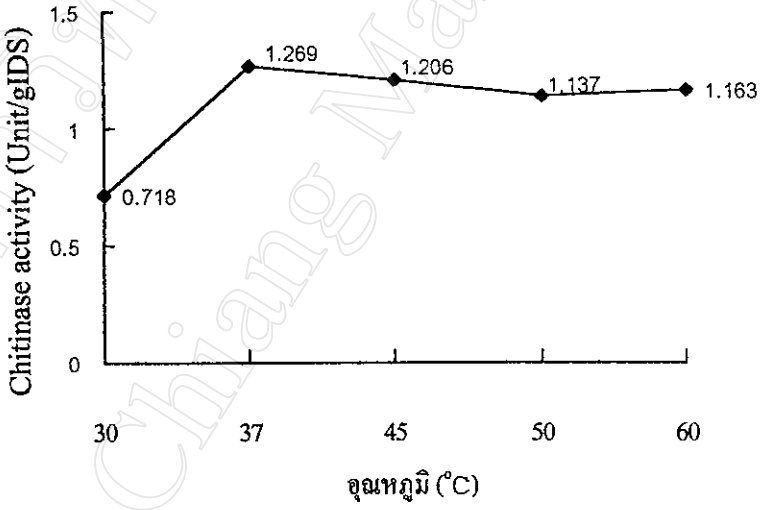
รูป 27 ผลของเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคติเนส

7.2 ผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

จากการตรวจวัด chitinase activity ของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ระยะเวลาการบ่ม 60 นาที ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 30°C, 37°C, 45°C, 50°C และ 60°C พบว่าที่อุณหภูมิ 37 °C เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดโดยมี chitinase activity เท่ากับ 1.26 U/gIDS (ตาราง 32 และ รูป 28)

ตาราง 32 อุณหภูมิที่ใช้บ่มไคติเนส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	Chitinase activity (U/gIDS)
30	0.718
37	1.269
45	1.206
50	1.137
60	1.163



รูป 28 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของไคติเนส

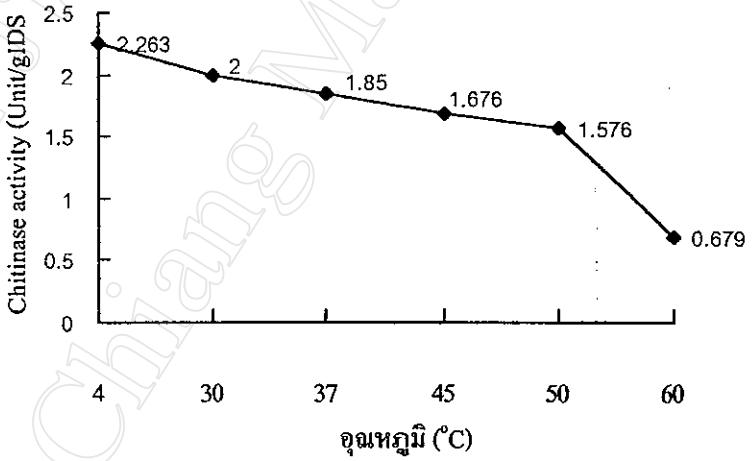
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

7.3 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

จากการตรวจวัด chitinase activity ของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ระยะเวลาการบ่ม 60 นาที ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 30°C, 37°C, 45°C, 50°C และ 60°C พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดโดยมี chitinase activity เท่ากับ 2.26 U/gIDS (ตาราง 33 และ รูป 29)

ตาราง 33 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

อุณหภูมิ (°C)	Chitinase activity (U/gIDS)
4	2.263
30	2.000
37	1.850
45	1.676
50	1.576
60	0.679



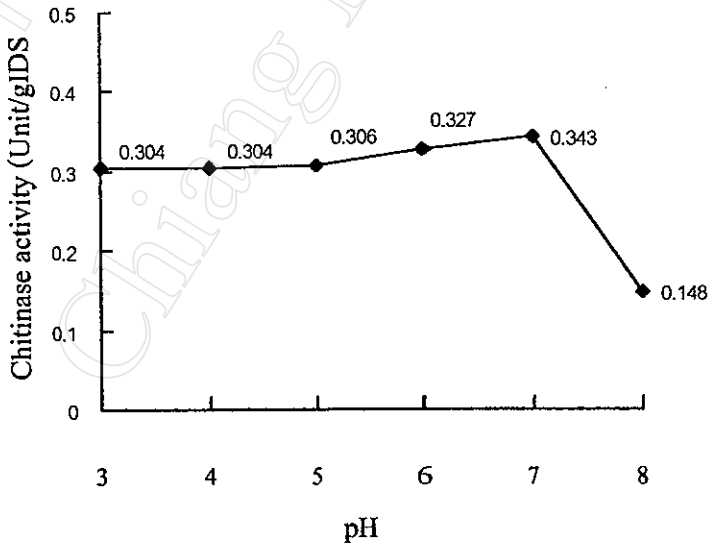
รูป 29 ผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

7.4 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการตรวจวัด chitinase activity ของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* . MC176 ที่ระยะเวลาการบ่ม 60 นาที อุณหภูมิ 37 °C pH ต่าง ๆ กันคือ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่าที่ pH เท่ากับ 7 เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดโดยมี chitinase activity เท่ากับ 0.34 U/gIDS (ตาราง 34 และ รูป 30)

ตาราง 34 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

pH	Chitinase activity (U/gIDS)
3	0.304
4	0.304
5	0.306
6	0.327
7	0.343
8	0.148



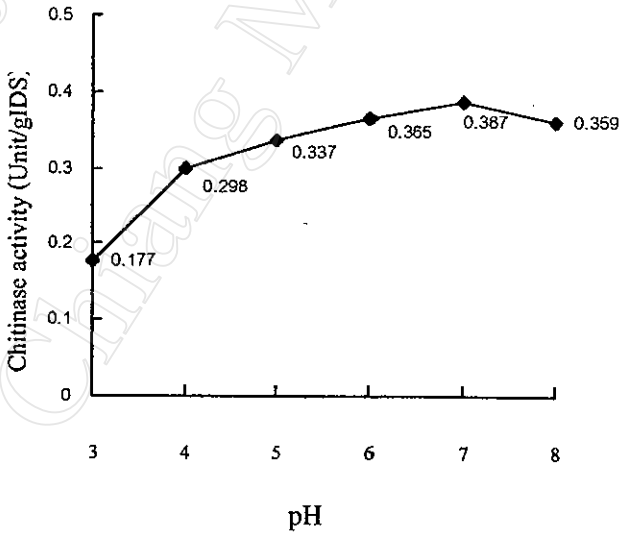
รูป 30 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

7.5 ผลความเสถียรของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการตรวจวัด chitinase activity ของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ระยะเวลาการบ่ม 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 ℃ pH ต่างกันคือ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 พบว่าที่ pH เท่ากับ 7 เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดโดยมี chitinase activity เท่ากับ 0.34 U/gIDS (ตาราง 35 และ รูป 31)

ตาราง 35 ผลความเสถียรของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

pH	Chitinase activity (U/gIDS)
3	0.177
4	0.298
5	0.337
6	0.365
7	0.387
8	0.359



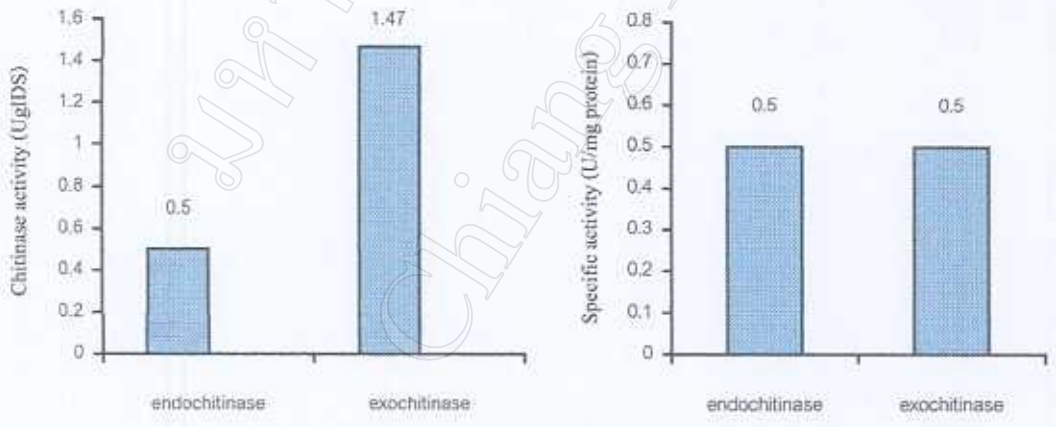
รูป 31 ผลความเสถียรของการทำงานต่อเอนไซม์

7.6 ชนิดของไคติเนสที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการตรวจวัด chitinase activity ที่ผลิตขึ้นจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 โดยการใช้ชนิดของสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยา กับ crude enzyme แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ 0.03% ethylene glycol chitin สำหรับตรวจวัด endochitinase และ 0.5% colloidal chitin สำหรับตรวจวัด exochitinase พบว่า ไคติเนส ที่ผลิตขึ้นจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 มีทั้ง endochitinase และ exochitinase แต่มีการผลิต exochitinase ได้มากกว่า endochitinase ตรวจวัดจาก chitinase activity โดย chitinase activity ของ exochitinase เท่ากับ 1.47 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.50 U/mg protein และ chitinase activity ของ endochitinase เท่ากับ 0.50 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.50 U/mg protein (ตาราง 36 และ รูป 32)

ตาราง 36 ชนิดของไคติเนสที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* MC176

Kind of chitinase	Chitinase activity (U/gIDS)	Specific activity (U/mg protein)
Endochitinase	0.50	0.50
Exochitinase	1.47	0.50



(a) (b)

รูป 32 ชนิดของไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC 176

(a) chitinase activity (b) specific activity

8. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

8.1 การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate

จากการทดลองขั้นต้นเพื่อหาปริมาณ ammonium sulfate ที่เหมาะสมสำหรับทำให้ไคติเนสใน crude extract บริสุทธิ์บางส่วนพบว่าการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่ 50-70% saturation ที่เหมาะสมที่สุด เพราะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่ 0-30% 30-50% และ 70-90% ซึ่งดูจากการมีค่า specific activity เพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นจาก 3.2 U/ml เป็น 5.48 U/ml แสดงว่าบริสุทธิ์ขึ้น 1.71 เท่า (ตาราง 37)

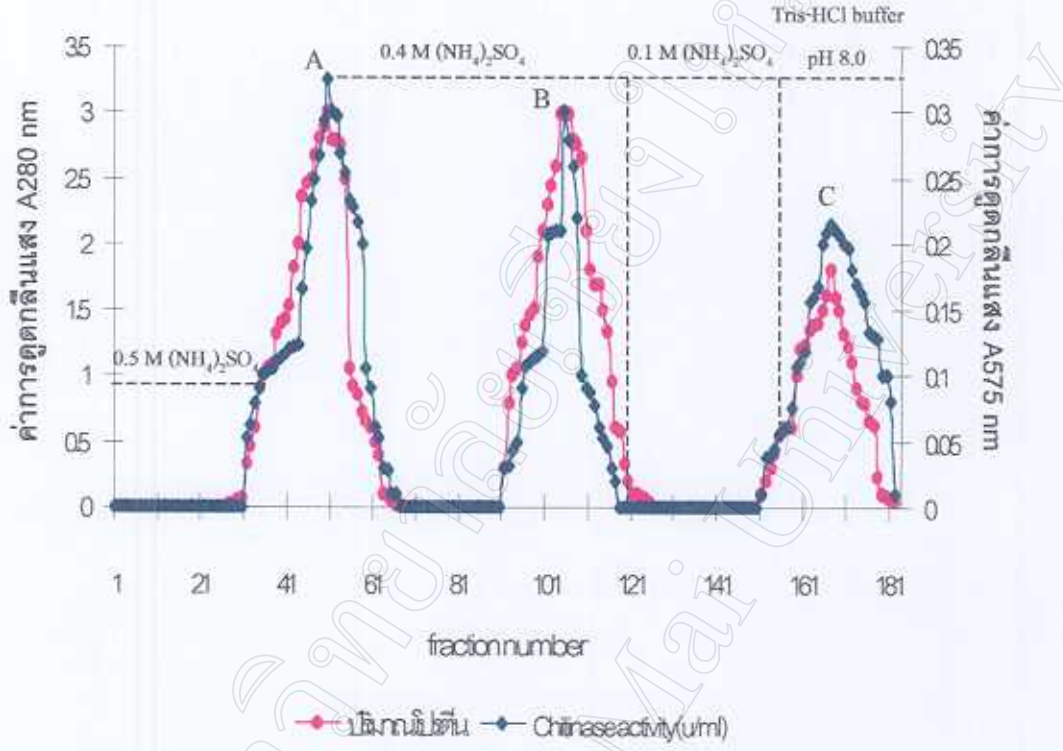
ตาราง 37 การทำ chitinase ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนโดยการตกตะกอน ammonium sulfate

$(NH_4)_2SO_4$ (% saturation)	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
0	0.100	0.320	3.20	100	100
0-30	0.015	0.069	4.60	21.56	1.43
30-50	0.036	0.084	2.22	25.00	0.69
50-70	0.058	0.317	5.48	99.37	1.71
70-90	0.069	0.290	4.34	93.95	1.35

8.2 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย hydrophobic chromatography

ภายหลังจากการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 50-70% saturation และ dialyzed เพื่อเอาเกลือออกโดยการใช้ 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 และควบคุมอัตราการไหลให้อยู่ในช่วง 0.5-1.0 ml/min หลังจากการชะแบบลำดับขั้น (stepwise) ด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้น 0.4-0 M ในสารละลาย 10 mM Tris-HCl buffer pH8.0 ทำการเก็บ fraction และทำการหาค่า chitinase activity และวัดปริมาณโปรตีน พบว่าสามารถแยกโปรตีนตัวอย่างได้จากสารละลายโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเลี้ยง เมื่อชะด้วย 0.4 M $(NH_4)_2SO_4$ จะปรากฏพีคของโปรตีน 2 พีค ที่มีค่า chitinase activity (รูป 33, พีค A และ B) และเมื่อชะด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.0 จะปรากฏพีคของโปรตีน 1 พีคที่มีค่า chitinase activity (รูป 33, พีค C) เมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีนรวม พบว่าเท่ากับ 198 Unit และ 76.5 mg ตามลำดับ มีค่า specific activity เท่ากับ 2.58 U/mg protein จากกราฟจะเห็นได้ว่าพีค ที่แสดงค่ากิจกรรมของ

เอนไซม์จะมี 3 พีค ยังแยกกันได้อย่างชัดเจนและจากพีคของโปรตีนแยกกันอย่างชัดเจน จึงนำเอา fraction ที่มีค่ากิจกรรมของไคติเนสมารวมกันเพื่อใช้เป็น sample ในการทำ ion-exchange chromatography ต่อไป



รูป 33 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Butyl-Toyopearl 650M (hydrophobic chromatography)

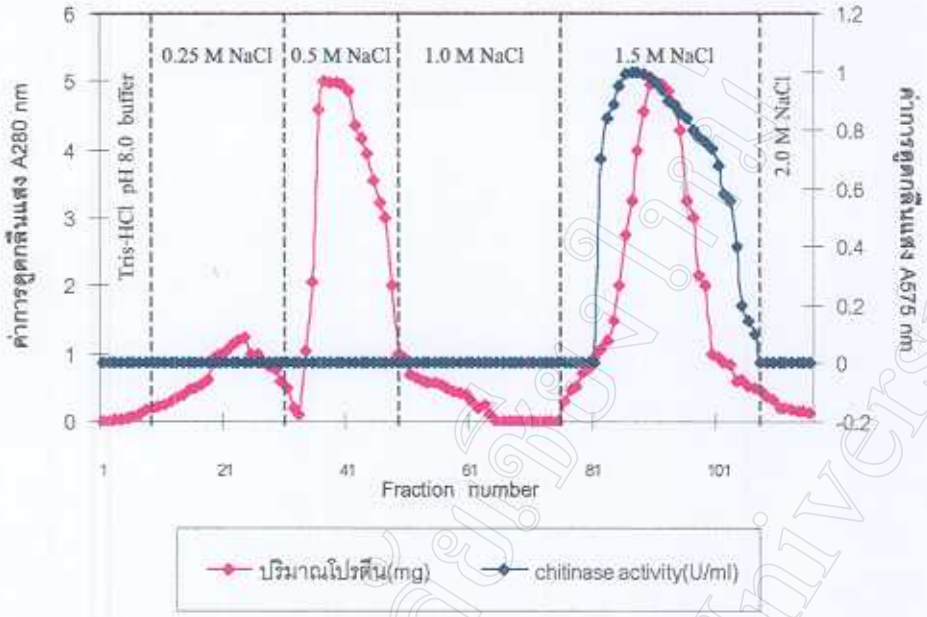
8.3 การแยกและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย Ion-exchange chromatography

ภายหลังจากการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 50-70% saturation และ dialyzed เพื่อเอาเกลือออกโดยการใช้ 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 นำสารละลายที่ได้มาผ่าน ion exchanger column ที่มีตัวแลกเปลี่ยนประจุ คือ DEAE-cellulofine โดยทำการทดสอบหาค่าpHของ Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยค่า chitinase activity เริ่มต้นเท่ากับ 8.0 Unit/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 5.0 Unit/mg พบว่าค่าpHเท่ากับ8.0 เอนไซม์สามารถจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุได้ดีที่สุดโดยให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 3.2 U/gIDS และโปรตีนที่เหลือในส่วนใส เท่ากับ 0.30 mg/ml specific activity เท่ากับ 6.4 U/mg (ตาราง 38)

ตาราง 38 ผลการทดสอบค่า pH ของ Tris-HCl บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์จับกับตัวแลก เปลี่ยนประจุ

pH	Chitinase activity (U/gIDS)	ปริมาณโปรตีน (mg)	Specific activity (U/mg protein)
5.0	3.08	0.73	4.2
6.0	3.27	0.85	3.8
7.0	3.46	0.89	3.5
8.0	3.20	0.50	6.4
9.0	1.48	0.48	3.0

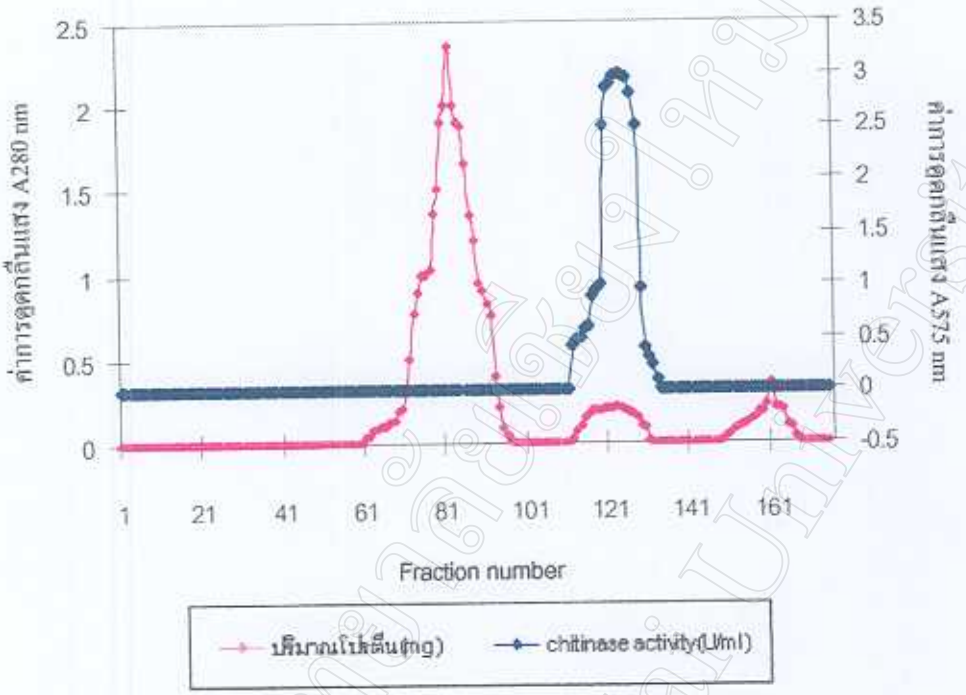
สารละลายโปรตีนที่ผ่าน ion exchange chromatography column หลังจากการชะเป็นลำดับขั้น (stepwise) ด้วย 0.25 M –1.5 M NaCl ในสารละลาย 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 ในแต่ละ fraction ทำการหา chitinase activity และวัดปริมาณโปรตีน พบว่าสามารถแยกโปรตีนตัวอย่างได้จากสารละลายโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเลี้ยง โดยเก็บ fraction ลำดับที่ 1-120 มาวัดค่า chitinase activity และโปรตีนรวม พบว่า fraction ที่ 80-110 ให้ค่า chitinase activity โดยมีค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 2.30 U/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 4.79 U/mg โดย chromatogram (รูป 34) จากกราฟจะเห็นได้ว่าพีคที่แสดง chitinase activity มีเพียงพีคเดียวแยกกันอย่างชัดเจนและจากพีคของโปรตีนก็แยกกันชัดเจนเช่นเดียวกัน



รูป 34 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย DEAE-cellulofine (ion exchange chromatography)

8.4. ผลการแยกเอนไซม์โดย Gel filtration

นำตัวอย่างเอนไซม์ในขั้นตอนการทำ ion exchange chromatography นำมาทำการแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่นโดย Gel-filtration ชนิด Toyopearl HF-40W พบว่าสามารถแยกโปรตีนตัวอย่างได้จากสารละลายโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเลี้ยง เมื่อนำ fraction ลำดับที่ 85-130 มาวัดค่า chitinase activity และโปรตีนรวมจาก fraction ที่คัดเลือก พบว่าเท่ากับ 30 Unit และ 3.0 mg ตามลำดับ มีค่า specific activity เท่ากับ 10 U/mg โดยจาก chromatogram (รูป 35) พีคที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ มี 1 พีค ซึ่งแยกกันได้อย่างชัดเจนและพีคของโปรตีน มี 3 พีค แยกได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน



Gel-filtration of chromatogram

รูป 35 โครมาโตแกรมของการแยกไคติเนสโดยคอลัมน์ Toyopearl HF-40W

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 39 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตรรวม (ml)	Chitinase activity (U/ml)	Total chitinase activity (Unit)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีนรวม (mg)	Specific activity (U/mg)	ความบริสุทธิ์ (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	500	2.00	1,000	1.32	600	1.51	1	100
50-70% saturation Ammonium sulfate	100	2.15	215	1.00	100	2.15	1.4	21.5
Butyl-Toyopearl 650W	150	1.32	198	0.51	76.5	2.58	1.7	19.8
50-70% saturation Ammonium sulfate	50	1.00	50	0.18	8.96	5.58	3.70	5.0
Toyopearl HF-40W	10	3.00	30	0.30	3.0	10.00	6.60	3.0

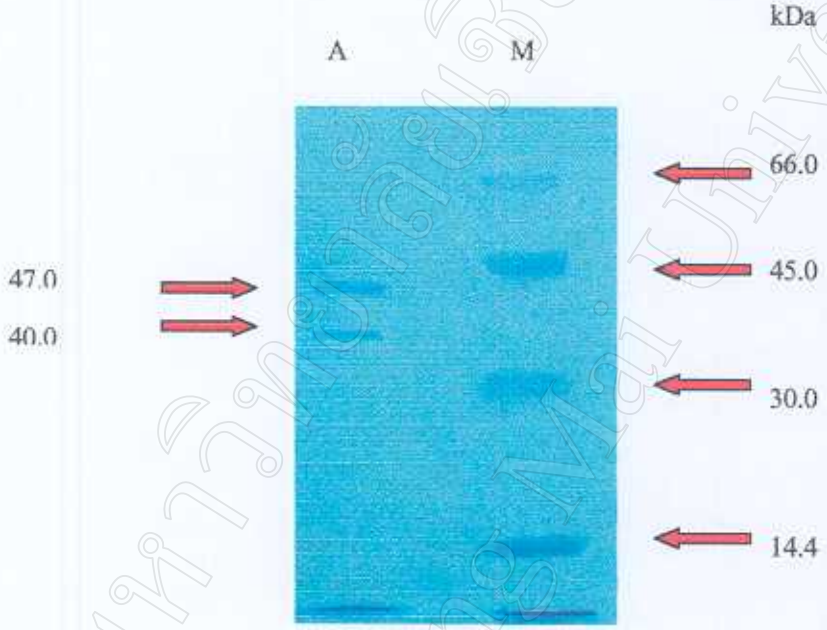
หมายเหตุ:

ความบริสุทธิ์ (fold) = specific activity 2/ specific activity1

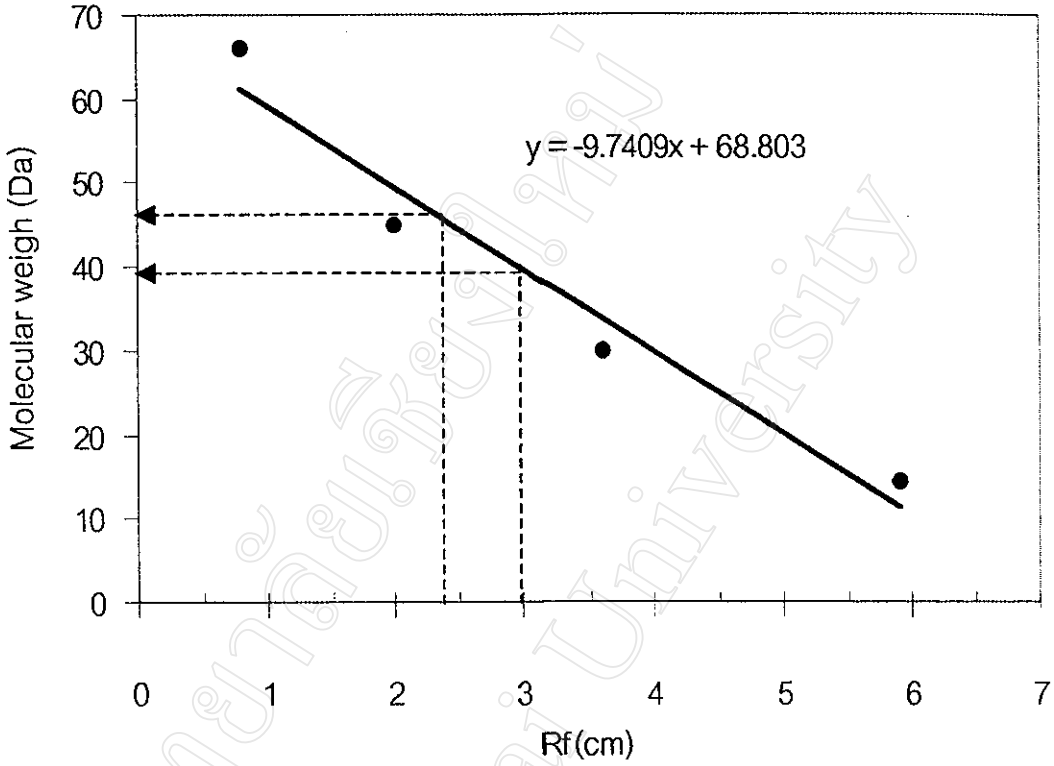
Yield = Total activity 2/ Total activity 1 ×100

8.5 ผลการทำ SDS-PAGE

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่าน Gel filtration มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และประมาณมวลโมเลกุล โดยการใช้ SDS-PAGE พบว่าจากการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, Butyl-Toyopearl 650M chromatography, Ion-exchange chromatography และ Gel-filtration ต่อจากนั้นนำ crude enzyme ที่ได้ทำให้เข้มข้นมากยิ่งขึ้นโดยวิธี ultrafiltration และนำมาประมาณมวลโมเลกุลอย่างคร่าว ๆ โดย SDS-PAGE สามารถที่จะแยกเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จาก *Bacillus thuringiensis* MC176 จากโปรตีนชนิดอื่นที่เชื้อผลิตขึ้นได้ โดยจากการทำ SDS-PAGE จะเห็นแถบโปรตีน 2 แถบสี (รูป 36)



รูป 36 ผลการทำ SDS-PAGE



รูป 37 กราฟมาตรฐานโปรตีน

เมื่อพิจารณา ค่า Rf ของโปรตีนทั้ง 2 แบน ซึ่งมี ค่า Rf 2.4 เซนติเมตร (A) และ 3.0 เซนติเมตร (B) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูป 36) สามารถประมาณค่ามวลโมเลกุลของโปรตีน ทั้ง 2 แถบ ได้ ดังนี้

(A) = 40 kDa

(B) = 47 kDa

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University