บทที่ 5

อธิปรายผลการทดลอง

จากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินในนาข้าวและจากการใช้เหยื่อล่อโดยการนำเปลือกกุ้งไปฝังดิน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 220 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้บน chitin agar ที่มี 1% เปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนและมีคุณสมบัติเป็น thermotolerant เจริญได้ที่อุณหภูมิ 19-60°C จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ พบว่าแยกได้จากนาข้าวในบริเวณต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงใหม่ได้มากที่สุด อาจเป็นเพราะในนาข้าวมีเศษฟางข้าว ซากพืชตระกูลถั่ว และซากปุ๋นาทับถมกันในดิน ซากเหล่านี้มีไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ จึงเป็นสารช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถผลิตไคติเนสได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียไอโซเลท MC176 ซึ่งให้ค่าการทำงานสูงสุดในอาหารแข็ง เปลือกกุ้งก็เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวข้างต้น แต่จากการใช้เปลือกกุ้งเป็นเหยื่อล่อและนำไปฝังดินแบคทีเรียที่แยกได้ ไม่มีคุณสมบัติในการผลิตไคติเนสเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร chintin agar ที่มี 1% เปลือกกุ้ง เป็นสับสเตรท เชื้อไม่สามารถเจริญได้ อาจเนื่องมาจากการนำเปลือกกุ้งไปฝังดินมีการห่อด้วยผ้าขาวบาง ซึ่งเป็น polysaccharide แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายและนำไปใช้เป็นอาหารได้ ดังนั้นเชื้อที่แยกได้อาจมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย polysaccharide ได้มากกว่าการย่อยสลายไคติน การปรับปรุงการทดลองอาจทำได้โดยห่อเปลือกกุ้งด้วยวัสดุที่แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายได้แบคทีเรียที่แยกได้จึงเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายเปลือกกุ้งได้เพียงอย่างเดียว

นำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 220 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการหมักในสภาพแข็งที่มีสับสเตรทเป็นเปลือกกุ้งขนาดอนุภาคต่าง ๆ หนัก 5 กรัม ภายในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml เชื้อตั้งต้นเป็น bacterial suspension 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26±2°C) เป็นเวลา 15 วัน พบว่ามีแบคทีเรียทั้งหมด 12 ไอโซเลท คือ MC 74 MC75 MC88 MC108 MC110 MC111 MC113 MC117 MC118 MC171 MC176 และ MC181 สามารถผลิตไคติเนสเมื่อใช้เปลือกกุ้งขนาดอนุภาคป่นละเอียด ขนาดกลาง (0.5-1.0 mm) และขนาดใหญ่ (1.0-3.0 mm) เป็นสับสเตรท และมีการผลิตไคติเนสที่มีค่าการทำงานสูงสุดเมื่อเลี้ยงในสับสเตรทที่เป็นเปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด โดยจะให้ค่า chitinase activity อยู่ในช่วง 0.95-1.95 U/gIDS และ specific activity อยู่ในช่วง

0.3-1.0 U/mg protein เช่นเดียวกับการเจริญของ *Beauveria bassiana* (Suresh *et.al.*, 1999) สามารถอธิบายได้ว่าอนุภาคสับสเตรทมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย สับสเตรทที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่สัมผัสต่อการยึดเกาะของแบคทีเรียได้มากและได้ดีกว่าสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่และนอกจากนี้สับสเตรทที่มีขนาดเล็กจะมีรูพรุนน้อยกว่า การที่มีรูพรุนของสับสเตรทน้อยมีผลต่อค่า a_w (available water) ของอาหารซึ่งค่า a_w จะมีค่าสูงนั่นแสดงว่าสับสเตรทที่มีขนาดเล็กจะมีความชื้นสูงกว่าสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่ เชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรียซึ่งต้องการความชื้นสูงในการเจริญ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีหากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้นประมาณ 0.95-1.0 สับสเตรทที่มีขนาดอนุภาคเล็ก จึงมีความชื้นพอเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่

ต่อจากนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการผลิตไคติเนสของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง หนัก 5 กรัมเทียบกับอาหารเหลว Enzyme Production Medium (EMP) ปริมาตร 25 ml ภายในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml เชื้อตั้งต้นเป็น bacterial suspension 1 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26±2°C) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง แบคทีเรียกลุ่มนี้คือ ไอโซเลท MC 110 MC111 MC117 และ MC176 โดยมีค่า chitinase activity อยู่ในช่วง 0.60-1.47 U/gIDS และ ค่า specific activity อยู่ในช่วง 0.42-12.5 U/mg protein ไอโซเลท MC176 มีการผลิตไคติเนสได้สูงสุด โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 1.47 U/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 12.5 U/mg protein กลุ่มที่ 2 คือ แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Enzyme Production Medium (EPM) ที่มี 2% colloid chitin ที่ทำจากเปลือกกุ้งเป็นสับสเตรท แบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ ไอโซเลท MC88 MC117 MC176 และ MC181 โดยมีค่า chitinase activity อยู่ในช่วง 0.02-9.65 U/ml และ ค่า specific activity อยู่ในช่วง 0.5-12.5 U/mg protein ไอโซเลท MC117 ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 9.65 U/ml และค่า specific activity เท่ากับ 12.5 U/mg protein การที่แบ่งแบคทีเรียออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ตามความสามารถในการย่อยสลายอธิบายได้ว่าแบคทีเรียในกลุ่มแรกที่สามารถผลิตไคติเนสเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพแข็งเปลือกกุ้งบดได้ดีกว่าอาหารเหลว EPM เนื่องจากว่าในเปลือกกุ้งที่นำมาเป็นสับสเตรทประกอบด้วยโปรตีนและแร่ธาตุบางชนิด เช่น Zn^{2+}, Mg^{2+} ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้อาจจะเป็น trace element ที่มีความเหมาะสมและจำเป็นสำหรับการเจริญและชักนำการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มที่ 2 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว EPM ได้ดีกว่าอาหารแข็งเปลือกกุ้งบด อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีการผลิตไคติเนสที่สามารถย่อยสลายไคตินที่ทำจากเปลือกกุ้ง สกัดให้ end-product มากกว่าเปลือกกุ้งบด จึงทำให้วัดค่า chitinase activity ได้สูงกว่า ซึ่งในเปลือกกุ้งที่ยังไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดและเบส

(ในการเตรียม colloidal chitin) ยังเต็มไปด้วยโปรตีนและแร่ธาตุอยู่มากจึงทำให้การย่อยสลายไคตินในเปลือกกุ้งลำบากเพราะจำเป็นต้องมีเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น โปรตีเอส (protease) ซึ่งจะย่อยโปรตีนในเปลือกกุ้งให้ได้ไคตินออกมาก่อนแล้วเอนไซม์ไคติเนสจึงสามารถเริ่มทำงาน นอกจากนี้อัตราการให้อากาศ (ปริมาณออกซิเจน) ก็มีส่วนสำคัญ สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งนั้นจะใช้วิธีการคนด้วยมือ ประมาณ 15 นาที/1 วัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 155 รอบต่อนาที อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสได้สูงในอาหารเปลือกกุ้งบด มีความต้องการปริมาณออกซิเจนน้อยกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว หรือการที่มีออกซิเจนมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญหรือการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียบางไอโซเลท ตัวอย่างเช่น ไอโซเลท MC176 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีค่า chitinase activity สูงกว่าในอาหารเหลว โดยในอาหารแข็งเปลือกกุ้งบดจะมีค่า chitinase activity เท่ากับ 1.47 U/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 12.5 U/mg protein เท่ากับในขณะที่ในอาหารเหลวจะให้ค่า chitinase activity น้อยมาก เท่ากับ 0.04 U/ml และค่า specific activity เท่ากับ 1.25 U/mg protein นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุอื่น คือ เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่เมื่อเพาะเลี้ยงในสับสเตรทที่ต่างกัน ไคติเนสที่ผลิตได้จะเป็นคนละชนิดโดยเอนไซม์ไคติเนสจะมีลักษณะและคุณสมบัติที่ต่างกัน (Panda , 2001)

จากการทดลองในขั้นตอนที่ 1 และขั้นตอนที่ 2 จึงเลือกไอโซเลท MC176 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตไคติเนสในอาหารเหลว EPM เทียบกับอาหารแข็งเปลือกกุ้ง โดยในอาหารแข็งใช้เปลือกกุ้งขนาดป่นละเอียด หนัก 5 กรัม เป็นสับสเตรทผสมกับอาหารพื้นฐาน (Basal medium) pH 7.0 10 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ส่วนอาหารแข็งใช้ 2% colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง เป็นสับสเตรทอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM ปริมาตร 25 mlในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml เชื้อตั้งต้นเป็น bacterial suspension 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, และ 16 วัน พบว่า ในอาหารเหลวแบคทีเรียเริ่มมี chitinase activity ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับ *Aeromonas hydrophila* H-2330 (Hiraga *et.al.*, 1997), *Aerobacterium obeclavatum* (Gunarana *et.al.*, 1998), *Bacillus cereus B. alvei* and *B. sphaericus* (Wang *et.al.*, 2001) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ 4 วัน หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง

ในขณะที่อาหารแข็งเปลือกกุ้งบด แบคทีเรียเริ่มมี chitinase activity ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.32 U/ml และ ค่า specific activity เท่ากับ 0.52 U/mg protein ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ 14 วัน โดยมีค่า chitinase activity

เท่ากับ 0.35 U/gIDS และ ค่า specific activity เท่ากับ 0.54 U/mg protein หลังจากนั้นจะลดลงในที่สุด เช่นเดียวกับ *Acremonium obclavatum* (Gunaratna *et.al.*, 1998), *Bacillus cereus* (Wang *et.al.*, 2001) แต่แตกต่างจากการผลิตไคติเนสของ *Agrobacterium tumefaciens* PT45, *Xantomonas campestris* และ *Rhizobium hedysari* ผลิตไคติเนสได้ดีที่สุดเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 12 วัน สามารถอธิบายได้ว่า เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยจำกัดในการสร้าง biomass เมื่อ biomass ถูกสร้างน้อยลงทำให้มีการใช้อาหารน้อยลงและมีการผลิตเอนไซม์น้อยลงด้วย (Suresh and Chandrasekaran, 1998)

จากการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง chitin agar ที่มี 2% เปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอนและในอาหารแข็ง nutrient agar พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท MC176 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร chitin agar ลักษณะโคโลนีกลม ผิวเรียบ แบนติดอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีครีม สร้างเอนโด สปอร์ (endospore) สภาพแวดล้อมที่เจริญได้ดีที่สุด คือ อุณหภูมิระหว่าง 19-60°C pH 5-9 ลักษณะดังกล่าวสามารถแยก จำแนกได้เป็น *Bacillus thuringiensis*

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนสของ *B. thuringiensis* MC176 จากการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยการหมักในสภาพแข็ง พบว่า *B. thuringiensis* MC176 ผลิตไคติเนสได้สูงสุด ในอาหารพื้นฐานที่มี ball-milled chitin เป็นแหล่งคาร์บอนโดยผลลัพธ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินจะทำหน้าที่เป็นทั้ง inducer และ repressor หากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินความต้องการในการนำไปใช้ของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนชนิดนั้น ๆ จะทำหน้าที่เป็น repressor ยับยั้งการผลิตไคติเนส แต่หากแหล่งคาร์บอนมีความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำหน้าที่เป็น inducer กระตุ้นการผลิตไคติเนสจากจุลินทรีย์ จากการทดลองมีการผันแปรเปอร์เซ็นต์ (%) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจาก 0.3 0.5 0.7 และ 1.0 พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ 1.0% (w/v) มีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ *B. thuringiensis* MC176 มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส หากปริมาณแหล่งคาร์บอนที่สูงหรือต่ำกว่า 1.0% (w/v) พบว่า *B. thuringiensis* MC176 จะมีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้น้อยหรือไม่มีการผลิตเลยผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะให้ผลที่ต่างกับการศึกษาของ Takayanagi (1991) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของ *Bacillus licheniformis* X-70 คือ 0.3% colloidal chitin, Park *et.al.*, (1998) ใช้ 0.4%colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการผลิตไคติเนสของ *Enterobacter* sp. G-1 ในขณะที่ Yabuki *et. al.*(1998) ใช้ 1.0% chitin เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *Aeromonas hydrophila* สามารถอธิปรายได้ว่า การผลิตไคติเนสขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่มีชนิดและสายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีความต้องการแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการผลิตไคติเนสได้ต่างกัน นอกจากนี้ความสามารถในการผลิตไคติเนส

ยังขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสภาวะการเพาะเลี้ยงและความเหมาะสมของสภาวะการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดอีกด้วย (Takayanagi, 1991)

การทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส ในการทดลองครั้งนี้พบว่า *B. thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไคติเนสได้สูงสุดในอาหารพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน สามารถจะอธิบายได้ว่า ในเปลือกกุ้งบดที่นำมาเป็นสับสเตรทประกอบด้วยโปรตีนและแร่ธาตุบางชนิด เช่น Zn^{2+}, Mg^{2+} ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้อาจจะเป็น trace element มีความเหมาะสมและจำเป็นสำหรับการเจริญและชักนำการผลิตไคติเนส แหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปอาจจะมีปริมาณมากเกินความต้องการ ในการนำไปใช้ของแบคทีเรีย หรือ ไม่มีผลโดยตรงต่อการผลิตเอนไซม์ แหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไปจะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง (repressor) ปฏิกิริยาการผลิตเอนไซม์ทำให้ *B. thuringiensis* MC176 ไม่มีการผลิตไคติเนส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนสคือ อุณหภูมิ 37 °C ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 0.597 U/gIDS เมื่ออุณหภูมิสูงกว่านี้เชื้อจะเจริญน้อยลงทำให้ไคติเนสต่ำลง สำหรับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (26±2 °C) การเจริญของเชื้อจะน้อยลงและการผลิตเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ เช่นเดียวกับการเจริญของเชื้อ *Bacillus circulans* WL-12 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส คือ 30 °C แต่ที่อุณหภูมิสูงขึ้นในช่วง 45-60 °C จะไม่มีผลต่อการเจริญแต่มีผลต่อการผลิตไคติเนส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°C *Bacillus circulans* WL-12 จะไม่มีการเจริญ (Watanabe *et.al.*, 1990)

การศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารแข็งเปลือกกุ้งที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส จากการศึกษา พบว่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส เท่ากับ 7.0 ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 0.49 U/gIDS รองลงมาคือ pH เท่ากับ 8.0 ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 0.44 U/gIDS จะเห็นได้ว่า *B. thuringiensis* MC176 จะผลิตไคติเนสได้ดีที่ค่า pH เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย สำหรับค่า pH ที่มากกว่า และ น้อยกว่า 5.0 การเจริญของเชื้อจะน้อยมากทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง การทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการเจริญได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย เช่นเดียวกับการเจริญของ *Bacillus subtilis* (Brurbery *et.al.*, 1996) *Serratia marcescen* (Momreal, 1969), *Enterobacter* sp. (Park J.K. 1997), *Vibrio* sp. (Ohtakara A, 1998) และ *Streptomyces griseus* (Berry L.R, 1958) ที่มีช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-7.0 หา pH สูงหรือต่ำกว่านี้การเจริญของการผลิตไคติเนสของแบคทีเรียในกลุ่มเหล่านี้จะลดลง

เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมได้นำมาทำการศึกษาหาชนิดของสับสเตรทที่ความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับไคติเนส จากการทดลองใช้ 0.5 % colloidal chitin และ 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง เป็นสับสเตรทพบว่า crude enzyme ที่สกัดจากอาหารแข็งเปลือกกุ้งสามารถทำปฏิกิริยากับ 0.5% colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง ได้ดีกว่า 0.5% colloidal chitin โดยมีค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 3.86 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.30 U/mg protein จากการศึกษาของ Wang *et.al.*,(1997) พบว่า ไคตินสำเร็จที่ผลิตจากกระดองปู มีส่วนประกอบหลักเป็น calcium carbonate ซึ่งยากต่อการย่อยสลาย การย่อยสลายจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของไคติเนสและเอนไซม์ในกลุ่มอื่น ๆ เช่น lysozyme (bifunctional chitinase/lysozyme) โดยได้ศึกษาการทำงานร่วมกันของ chitinase/lysozyme ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* K-187 พบว่าสามารถย่อยสลายไคตินจากกระดองปู ได้ แต่จากการทดลอง พบว่าไคติเนสที่ผลิตจาก*B. thuringiensis* MC176 ไม่มีคุณสมบัติเป็น bifunctional ตรวจสอบโดยการหา specific activity

จากการนำ *B. thuringiensis* MC176 มาเพาะเลี้ยงในภาชนะที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกันระหว่างขวดสีชาขนาด 3,000 ml ขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 1,000 500, 250, 125 และ 100 ml จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถุงพลาสติกขนาด 8 x 12 นิ้ว และขนาด 18 x 12 นิ้ว ที่ไม่มีรูพรุน พบว่าขวดชมพู่ขนาด 125 ml ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด คือ chitinase activity เท่ากับ 3.20 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 1.89 U/mg protein ค่าการทำงานสูงขึ้นเป็นผลมาจากสภาวะที่เหมาะสมร่วมกันระหว่างอนุภาคสับสเตรทกับภาชนะและลักษณะการต้องการอากาศของ *B. thuringiensis* MC176 อาจต้องการออกซิเจนน้อยในการเจริญ ซึ่งขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml มีพื้นที่ผิวของการสัมผัสอากาศน้อยและอากาศหมุนเวียนไม่ค่อยดี ลักษณะเช่นนี้อาจเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์และการเจริญของ *B. thuringiensis* MC176 ก็ได้

หลังจากเพาะเชื้อโดยมีสับสเตรทอื่นร่วมกับเปลือกกุ้ง ได้แก่ เปลือกถั่วลิสง เปลือกถั่วเหลือง ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา และ ฟางข้าว พบว่าฟางข้าวทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานสูงสุด โดย chitinase activity เท่ากับ 0.75 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.32 U/mg protein รองลงมา คือ เปลือกถั่วเหลืองทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ที่มีค่าการทำงานสูงสุด โดย chitinase activity เท่ากับ 0.50 U/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 0.30 U/mg protein อาจเนื่องจากว่าในฟางข้าวมีปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่มาก

นอกจากนี้การเพิ่มฟางข้าวเข้าไปอาจเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับสับสเตรทซึ่งช่วยในการเพิ่มช่องอากาศและทำให้ค่า a_w พอเหมาะในการเจริญของแบคทีเรียได้

การหาไคติเนสในอาหารแข็งที่มีฟางข้าวเป็นส่วนประกอบ โดยมีสับสเตรท ได้แก่ ฟางข้าว, เปลือกกุ้งบด และ ฟางข้าวผสมเปลือกกุ้ง พบว่าฟางข้าวทำให้เชื้อสามารถผลิตไคติเนสได้สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.03 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 1.38 U/mg protein รองลงมาคือ เปลือกกุ้งบดผสมกับฟางข้าว โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.95 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 2.57 U/mg protein เนื่องมาจาก *B. thuringiensis* MC176 อาจต้องการเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในฟางข้าว สำหรับการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ฟางข้าวผสมกับเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง สามารถชักนำให้ *B. thuringiensis* MC176 มีการผลิตไคติเนสได้สูงกว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในเปลือกกุ้งผสมกับฟางข้าว หรือเพาะเลี้ยงในเปลือกกุ้งเพียงอย่างเดียว หรือ อาจเนื่องมาจากว่าไคติเนสที่ผลิตจาก *B.thuringiensis* MC176 เป็น constitutive enzyme ในสภาวะที่มีหรือไม่มีเปลือกกุ้ง *B. thuringiensis* MC176 ก็สามารถผลิตไคติเนสได้ การวิจัยในครั้งนี้อาจจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว มาใช้เป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นี้ เพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนสแทนการใช้สับสเตรทที่เป็นเปลือกกุ้งหรือเปลือกปู และฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย มีวิธีการเตรียมที่ไม่ซับซ้อน สะดวกในการขนส่งมากกว่าสับสเตรทที่เป็นเปลือกกุ้งเนื่องจากบางครั้งเปลือกกุ้งหาได้ยาก และมีวิธีการเตรียมหลายขั้นตอน ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย

การทดลองหาชนิดของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* MC176 ปกติเอนไซม์ไคติเนสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ exo-chitinase และ endo-chitinase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดย exo-chitinae จะทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงกับสับสเตรทที่เป็น colloidal chitin และ endo-chitinase จะทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทที่เป็น ethylene glycol chitin นำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อจาก *B. thuringiensis* MC176 มาทดสอบหาชนิดของไคติเนส พบว่าในน้ำกรองสามารถตรวจพบ exochitinase ได้มากกว่า endochitinase ประมาณ 2 เท่า โดยตรวจสอบกิจกรรมของ exochitinase พบว่าเท่ากับ 1.47 U/gIDS และ ค่า specific activity เท่ากับ 0.53 U/mg protein และค่ากิจกรรมของ endochitinase เท่ากับ 0.54 U/gIDS และ ค่า specific activity เท่ากับ 0.53 U/mg protein จากการทดลองจะเห็นได้ว่า *B.thuringiensis* MC176 มีความสามารถในการผลิต exochitinase ได้มากกว่า endochitinase ต่อจากนั้นนำ *B. thuringiensis* MC176 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อชักนำให้ *B. thuringiensis* MC176 มีการผลิต

ไคติเนสเพิ่มมากขึ้น จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของ crude enzyme ที่ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* MC176 ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์บางประการ จากการวิจัยพบว่า เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH เท่ากับ 7.0 โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.34 U/gIDS และมีความคงตัวที่ค่า pH เท่ากับ 7.0 โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.38 U/gIDS เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4°C crude enzyme ทำงานได้ดีที่สุด แต่ความคงตัวของ crude enzyme จะมีความคงตัวต่ำเมื่อเทียบกับเมื่อ crude enzyme ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 4°C การทำงานของเอนไซม์จะมีค่าลดลง สามารถตรวจสอบได้โดยวัดค่ากิจกรรมของไคติเนสโดยค่า chitinase activity จะลดลงจากเดิมถึง 1.0 เท่า (ค่า chitinase activity เท่ากับ 0.147 U/gIDS) และค่า pH ก็มีผลต่อการทำงานของไคติเนสเช่นเดียวกัน โดยค่า pH ที่น้อยหรือสูงเกินไปอาจมีผลต่อการเกิด deamination ของกรดอะมิโนที่สำคัญในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป และกิจกรรมของโปรตีนสูญเสียไป (Daniel, 1996)

น้ำกรองที่ได้จากการเลี้ยง *B. thuringiensis* MC176 เมื่อนำมาทดสอบการตกตะกอนตามลำดับขั้นจะเห็นได้ว่าที่ทุกความเข้มข้นของการตกตะกอนด้วยเกลือจะสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน จากการทดลองทำการตกตะกอนเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0-90% ด้วย ammonium sulfate พบว่าที่ความเข้มข้น 50-70% เอนไซม์ไคติเนสจะตกตะกอนลงมามากที่สุด โดยมีค่า chitinase activity เท่ากับ 0.29 U/gIDS และค่า specific activity เท่ากับ 4.34 U/mg protein เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hiraga *et.al.*,(1997) ทำการตกตะกอนไคติเนสที่ผลิตจาก *Aeromonas hydrophila* H-2330 โดยใช้ 70 % saturation ammonium sulfate ในการตกตะกอน Yang *et.al.*, (2000) ใช้ 50-70% saturation ammonium sulfate ในการตกตะกอนไคติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* แต่ chitinase activity ที่ได้จะมีค่าน้อยกว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อก่อนนำมาตกตะกอนสามารถอธิบายได้ว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงอาจเป็นผลจากการเสียสภาพในระหว่างการทำการทดลองและบางส่วนไม่ตกตะกอนออกมาอย่างสมบูรณ์ การตกตะกอนเอนไซม์ในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง จะลดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้มาก แต่มีข้อเสีย คือ อาจมีโปรตีนอื่นที่ไม่อยู่ในช่วงการตกตะกอนของเอนไซม์ตกตะกอนออกมาพร้อมกัน (Hiraga *et.al.*, 1997)

เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้น 50-70% และการทำไดอะไลส์จะนำมาผ่าน hydrophobic chromatography ชนิดของเจลที่ใช้คือ Butyl-Toyopearl 650 M หลังจากการชะแบบเป็นลำดับขั้นด้วย 0.5 M ถึง 0.0 M ammonium sulfate นำแต่ละ fraction ไปวัดปริมาณโปรตีนที่ A280 และหา chitinase activity จากกราฟจะเห็นได้ว่าพีคของเอนไซม์มี 3 พีค โดยแยกกันอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yamaoka *et.al.*,(1999) แยกไคติเนสที่ผลิตจาก *Xanthomonas* sp. Strain AK โดยการใช้ Phenyl-Toyopearl 650 M ชะเป็นลำดับขั้นด้วย 0.5-0 M ammonium sulfate พบว่า สามารถแยกไคติเนสออกจากโปรตีนที่ปนเปื้อนในน้ำเลี้ยงได้ ผลที่ได้เนื่องจากในขั้นตอนการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate แสดงให้เห็นว่ามีไคติเนสอยู่สามส่วนซึ่งอาจเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไคตินได้เหมือนกันแต่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นการแยกโปรตีนโดย hydrophobic chromatography สามารถแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ โดยอาศัยคุณสมบัติการมีขั้วและการไม่มีขั้ว โปรตีนที่มีขั้วหรือมีสภาพขั้วที่แรงกว่าจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อน ในขณะที่โปรตีนที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยจะจับอยู่ที่เจลและถูกชะออกมาด้วย ammonium sulfate ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

เอนไซม์ที่ผ่าน ion exchange chromatography โดยมีตัวแลกเปลี่ยนประจุคือ DEAE-cellulofine หลังจากชะแบบเป็นลำดับขั้นด้วย 0.25 M ถึง 1.5 M NaCl นำแต่ละ fraction มาวัดปริมาณโปรตีนที่ A280 และตรวจวัด chitinase activity จากกราฟจะเห็นว่าพีคของโปรตีนมี 3 พีค และพีคที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีอยู่ 1 พีค เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ohishi *et.al.*, (1996) แยกไคติเนสที่ผลิตจาก *Vibrio alginolyticus* H-8 โดยการใช้ DEAE-Toyopearl 650 M ชะแบบลำดับขั้น ด้วย 0-0.25 M NaCl สามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจากน้ำเลี้ยงได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการแยกเอนไซม์โดย ion exchange chromatography จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น โดยจากการทดลองทำการชะเอนไซม์ด้วย NaCl แบบตามลำดับขั้น (stepwise) โดยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 0.25 M NaCl ที่ใช้ในการทดลองอาจมีความแรงพอที่ทำให้โปรตีนทั้ง 3 ชนิดหลุดออกมาพร้อมกัน การที่จะทำให้โปรตีนแยกจากกันได้ดีขึ้นอาจทำการชะเอนไซม์แบบ continuous gradient โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือไปจนถึง 2.0 M NaCl จากความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นทำให้โปรตีนที่จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุด้วยแรงที่อ่อนกว่าหลุดออกมาก่อนได้ การชะเอนไซม์ด้วย continuous gradient จะดีกว่าการชะเอนไซม์แบบ stepwise ในกรณีที่ไม่ทราบความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการชะเอนไซม์ จากการทำ ion exchange chromatography สามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกไปได้ในปริมาณหนึ่ง แต่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์บางส่วน อาจเนื่องมาจากการเจือจางของเอนไซม์มีมากขณะที่ผ่านคอลัมน์ทำให้เสียสภาพได้ง่ายขึ้น และมีบางส่วนที่ถูกชะออกไปโดยบัฟเฟอร์ในขณะที่ทำการทดลอง

เอนไซม์ที่นำมาผ่าน gel filtration โดยมี Toyopearl-HF-65W เป็นตัวกลางเมื่อทำการรวม fraction ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์รวม (Total activity) เท่ากับ 30 Unit และปริมาณโปรตีนรวม (Total protein) เท่ากับ 10 mg ค่า specific activity เท่ากับ 1.0 U/mg โดยมี % recover เท่ากับ 3 จาก รูป 34 จะเห็นว่าพีคของกิจกรรมของเอนไซม์แยกกับโปรตีนที่ปนเปื้อนอย่างชัดเจน การทำ gel-filtration สามารถที่จะแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนออกไปได้มาก แต่เอนไซม์จะมีค่า specific activity ที่ลดลงเนื่องจากเอนไซม์ถูกเจือจางขณะที่ผ่านคอลัมน์ และแช่อยู่ในคอลัมน์เป็นระยะเวลานาน บางครั้งไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เนื่องจากเอนไซม์มีสภาพเจือจางมาก ๆ และส่วนหนึ่งถูกจับโดยผิวของภาชนะ (Janson and Ryden, 1989)

การศึกษาการผลิตไคติเนสโดยการหมักในสภาพแข็งเปลือกกุ้งและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน หลังจากได้เอนไซม์ที่ปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทและทำให้บริสุทธิ์ควรจะมีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์จริงในทางปฏิบัติ โดยจากคุณสมบัติของเอนไซม์น่าจะนำไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทะเล หรืออาจจะนำไปผลิตเป็นไคโตซานซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาสูง และที่สำคัญอาจจะนำไปใช้ควบคุมราโรคพืชบางชนิด ซึ่งเป็นการควบคุมโดยชีววิธี เป็นการลดปริมาณสารเคมีและยาฆ่าแมลงที่ปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม เป็นการลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่ดีอีกวิธีหนึ่ง