

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตโคตินีนได้สูงในอาหารแข็งเปลือกกุ้ง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในนาข้าว อำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 7 อำเภอ คือ อ.เมือง อ.แม่แตง อ.แม่วัง อ.สันกำแพง อ.สันทราย อ.สันป่าตอง และ อ.หางดง ได้แบคทีเรียทั้งหมด 220 ไอโซเลต นำแบคทีเรียทั้งหมด 220 ไอโซเลตมาทดสอบการผลิตโคตินเอสในสภาพแข็งโดยใช้เปลือกกุ้งที่มีขนาดอนุภาคต่าง ๆ 3 ขนาด พบว่า มี 12 ไอโซเลต ที่มี chitinase activity สูงสุดตามลำดับได้แก่ MC176, MC74, MC118, MC108, MC110, MC111, MC115, MC117, MC113, MC181, MC171 และ MC88 พบว่าไอโซเลต MC176 ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 1.59 U/gIDS

2. ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียโอโซเลท MC176 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง chitin agar ที่มี 2% เปลือกกุ้ง เป็นแหล่งคาร์บอน และ nutrient agar พบว่ามีการเจริญได้ดีบนอาหาร chitin agar ที่อุณหภูมิ 19-60 °C และ pH เท่ากับ 7.0 พบว่ามีการเจริญได้ดีบนอาหาร chitin agar เมื่อคุณลักษณะ ภายใต้กล้อง พบว่า มีรูปร่าง คีดสี่เหลี่ยมมุม สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) บริเวณกลางเซลล์ และจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Bacillus thuringiensis*

3. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโคตินินของ *Bacillus thuringiensis* MC176

จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* MC176 เพื่อผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ประกอบด้วย เปลือกกุ้ง หนัก 2.5 กรัม ผสมกับฟางข้าว 2.5 กรัม และอาหารพื้นฐาน 10 ml ที่มีแหล่งคาร์บอน คือ ball-milled chitin 1.0% w/v และไม่มีแหล่งไนโตรเจน pH 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37°C ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 14 วัน พบว่า *Bacillus thuringiensis* MC176 มีการผลิตไคตินเนสได้สูงสุด เท่ากับ 1.09 U/gIDS มีค่า specific activity เท่ากับ 1.91 U/mg

4. การทำให้เกิดการกลายพันธุ์

นำ *Bacillus thuringiensis* MC176 มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการให้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า *B.thuringiensis* MC176 สามารถผลิตไลติเนสเพิ่มขึ้นจากเดิม 10 เท่า เมื่อตรวจค่า chitinase activity พบว่า เท่ากับ 1.80 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.54 U/mg protein (ค่า chitinase activity ก่อนการ กลายพันธุ์ เท่ากับ 0.18 U/gIDS และ specific activity เท่ากับ 0.12 U/mg protein)

5. คุณสมบัติของ Crude enzyme ที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* MC176 ที่ผ่านการกลายพันธุ์

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 7.0 และ อุณหภูมิ 37°C มีความคงตัว ที่อุณหภูมิ 4°C และ pH เท่ากับ 7.0 เอนไซม์มีคุณสมบัติเป็น exochitinase และ endochitinase โดยสามารถสลาย colloidal chitin และ ethylene glycol chitin ได้ แต่ย่อยสลาย colloidal chitin ได้ดีกว่า

6. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate 50-70% saturation ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 1.4 เท่า และเมื่อนำ เอนไซม์ ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate แล้วนำ มา dialyzed เพื่อเอาเกลือส่วนเกินออก จากนั้นนำมาผ่าน hydrophobic chromatography, ion-exchange chromatography, gel-filtration พบว่าทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 6.6 เท่า จาก นั้นนำมาทำ SDS-PAGE จากการทดลองพบแถบโปรตีน 2 แถบ เมื่อประมาณ น้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า เท่ากับ 40 kDa และ 47 kDa ตามลำดับ