รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *Paecilomyces* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินสูงและมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่ำ

Isolation of *Paecilomyces* sp. Chitianase - overproducing Mutants with Low Protease Production

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีงบประมาณ 2541

RCH
QP
601.6
ท332ร

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 34686

วัน, เดือน, ปี 19 พ.ย. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของ *Paecilomyces* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินสูงและมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่ำ

Isolation of *Paecilomyces* sp. Chitianase - overproducing Mutants with Low Protease Production

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์ของ *Paecilomyces* sp. โดยใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เพื่อให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่สูงและผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์สายพันธุ์ MP-91 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ 17.80 หน่วยต่อมล. เอนไซม์ไคโตไบเอส 47.66 หน่วยต่อมล. และเอนไซม์โปรติเอส 32.40 หน่วยต่อมล. เมื่อทำการเลี้ยงในฟลาก์แบบเขย่า โดยพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสสูงขึ้น 8 และ 2 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ลดลง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

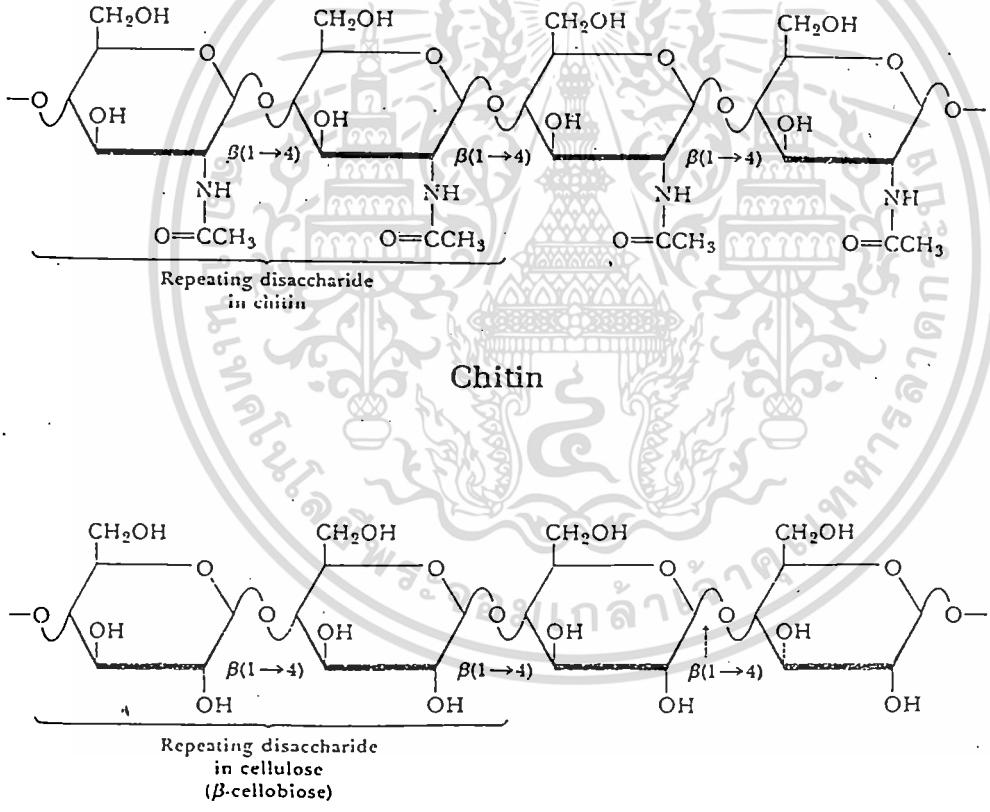
Abstract

The strain improvement of *Paceilomyces* sp. was mutagenized by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in order to obtain chitinase-overproducing mutants with low protease. A mutant MP-91 was selected and cultivated in liquid medium for enzyme production in shake flasks. The mutant produced 17.80 U/ml chitinase , 47.66 U/ml chitobiase and 32.40 U/ml protease. It was found that chitinase and chitobiase activities were increased by 8-and 2-fold,respectively,while protease acticity was 3-fold less than the wild type.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคติน

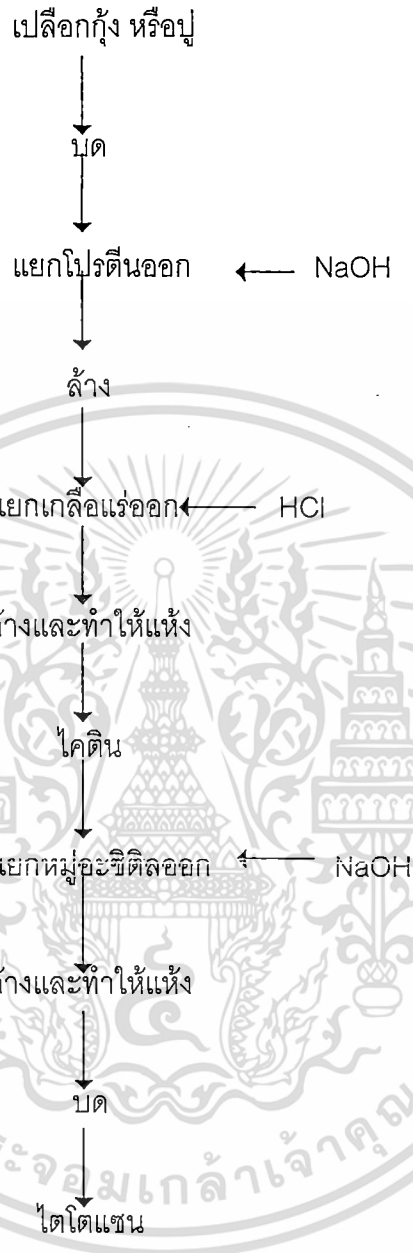
ไคตินเป็นสารโพลิเมอร์ของ β-1,4-N-acetylglucosamine เป็นสารที่พบมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ (Austin และคณะ , 1981 ; Knorr,1984) ประกอบด้วยไฮโดรเจน 6.5 % คาร์บอน 47.3 % ไนโตรเจน 6.9 % และออกซิเจน 39.4 % โดยประมาณ สูตรโมเลกุลคือ $(C_6H_{13}NO_5)_n$ (อุดมชัย , 2535) เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของไคตินในรูปที่ 1 พบว่ามีสูตรโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส ต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองมีหมู่ -NH-CO-CH_3 แทนที่จะเป็น -OH ไคตินเป็นสารโมเลกุลยาวที่ไม่มีประจุจึงทำให้ไคตินไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทั่ว ๆ ไป แต่ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดบางชนิด เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก เป็นต้น (วิสิฐและลูกจันทร์ , 2533 ; อุดมชัย , 2535)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของไคติน ไคโตแซน และเซลลูโลส

ที่มา : Ornum (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงการผลิตไคตินและไคโตแซน

ที่มา : Knorr (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติ

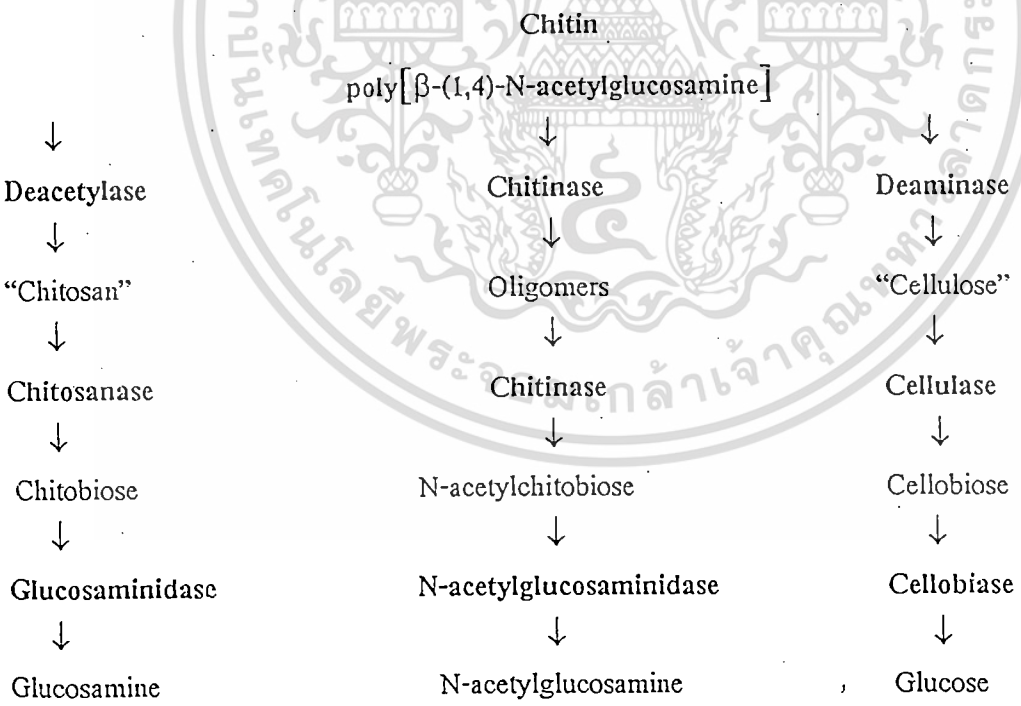
การย่อยไคตินในธรรมชาติอาจเกิดได้ 3 วิถี ดังนี้

วิถีที่ 1 การย่อยไคตินให้เป็นหน่วยย่อยของ N-acetylglucosamine โดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ไคติเนสและไตโตไบเอส หรือ N-acetylglucosaminidase

วิถีที่ 2 การใช้เอนไซม์ดีอะซิติลเลส (deacetylase) ดึงหมู่อะซิติลออกจากไคตินเพื่อให้ได้ไคโตแซน ซึ่งจะถูกย่อยต่อโดยเอนไซม์ไคโตซาเนส (chitosanase) และเอนไซม์กลูโคซามินิเดส (glucosaminidase) ได้กลูโคซามีน (glucosamine)

วิถีที่ 3 การใช้เอนไซม์ดีอะมิเนส (deaminase) ดึงหมู่ N-acetyl ออกจากโมเลกุลของไคตินได้เซลลูโลส และถูกย่อยต่อโดยเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเซลโลไบเอส (cellobiase) ตามลำดับได้น้ำตาลกลูโคส

การย่อยไคตินทั้ง 3 วิถีนี้ มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของไคตินกลับมาเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศอีกครั้ง (Cabib , 1987)



รูปที่ 3 ศักยภาพในการย่อยไคตินให้เป็นสารอื่น

ที่มา : Cabib (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยไคตินโดยไคตินโนไลติกเอนไซม์

การย่อยไคตินในธรรมชาติให้เป็นหน่วยย่อยหรือ N-acetylglucosamine อิสระจำเป็นต้องอาศัยการทำงานอย่างเป็นระบบของไคติโนไลติกเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือไคติเนส (E.C. 3.2.1.14) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยจนกระทั่งได้ diacetylchitobiose เป็นผลผลิตหลัก และอาจพบ triacetylchitotriose บ้างเล็กน้อย และไคโตไบเอสหรือ N-acetylhexosaminidase (E.C. 3.2.1.30) ซึ่งจะทำการย่อย diacetylchitobiose จนกระทั่งได้ N-acetylglucosamine อิสระ 2 โมเลกุล (Shaikh และ Deshpande , 1993)

เอนไซม์ไคติเนสที่พบโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือเอนโดไคติเนส (endo-chitinase) และเอ็กโซไคติเนส (exo-chitinae) โดยเอนโดไคติเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ภายในโมเลกุลของไคติน ในขณะที่เอ็กโซไคติเนสจะย่อยไคตินจากปลาย non-reducing ได้ diacetylchitobiose และ N-acetylglucosamine ตามลำดับ (Watanabe และคณะ , 1990) เอนไซม์ไคติเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่แหล่งของเอนไซม์ไคติเนสที่น่าสนใจมาจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ จุลินทรีย์ที่ทำการศึกษามีทั้งแบคทีเรีย เช่น *Bacillus circulans* (Watanabe และคณะ , 1990) *Streptomyces viridificans* (Gupta และคณะ , 1995) แหล่งของเอนไซม์ไคติเนสจากรา ได้แก่ *Aspesgillus carneus* (Sherief และคณะ , 1992) *Paceilomyces varioti* (Gautam และคณะ , 1996) เป็นต้น

ประโยชน์ของเอนไซม์ไคติเนสมีดังต่อไปนี้ คือ ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากเปลือกกุ้งและปู (Vyas และ Deshpande , 1991) ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของราและยีสต์โดยการรวมโปรโตพลาสต์ (Gautam และคณะ , 1996 ; Hou และ Jong , 1985) ใช้ในการกำจัดเชื้อราและแมลงที่เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด (Gupta และคณะ , 1995 ; Intraphan , 1994)

การปรับปรุงพันธ์ของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนส

การกลายพันธุ์เป็นการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือโดยการเหนี่ยวนำของสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์มีหลายชนิด กลุ่มที่สำคัญคือ Alkylating agent ได้แก่ mustard gas , ethylmethanesulfonate (EMS) , N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methylmethanesulfonate (MMS) เป็นต้น สำหรับ NTG นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการทำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (อรพิน , 2527)

Reid และ Ogrydziak (1981) ทำการปรับปรุงเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* QMB 1466 ด้วยแสงยูวีและสารเคมี Ethylenethane sulfonate พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ IMR.1E1 สามารถผลิตเอนไซม์เอนโดไคติเนส (endochitinase) สูงกว่าสายพันธุ์เดิม 2 ถึง 3 เท่า

ต่อมาในปี 1989 Xiuli และคณะ ทำการศึกษาเชื้อรา *Beauveria bassina* ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ และทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้แสงยูวีและปืนอิเล็กตรอนพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ EU 120 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสูงขึ้น 3 เท่า จากสายพันธุ์เดิม

Vasseur และคณะ (1990) ทำการปรับปรุงพันธุ์ *Aphanocladium album* โดยใช้แสงยูวี พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ E3 และ E12 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงขึ้น 26 และ 2.5 เท่าตามลำดับ

Intraphan (1994) ทำการปรับปรุงพันธุ์รา *Hersutella thompsonii* โดยใช้ NTG พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ M5 , M40 และ M63 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสสูงขึ้นจากสายพันธุ์เดิม 2 และ 1.78 เท่าตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Paecilomyces* sp. ซึ่งคัดเลือกมาแล้วว่าผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0	กรัม
น้ำแช่ข้าวโพด	20.0	กรัม
$NH_4 NO_3$	3.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
swollen clitin	30.0	กรัม
น้ำ	1.0	ลิตร
pH	6.5	

เชื้อราจะเก็บไว้ใน PDA slant ในตู้เย็นทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 6 เดือน

สารเคมี

- Potato dextrose agae (PDA) ของ Difco
- N-acetylglucosamine ของ Sigma
- N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ของ Fulka
- p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide ของ Sigma
- p-nitrophenol ของ Fulka
- skim milk ของ Difco
- ไคติน (chitin) ของ Sigma
- กลูโคส ของ J.B.Baker
- เคซีน (casein) ของ Fulka
- น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ของ Difco
- ทวีน 80 (Tween 80) ของ Fulka
- $NH_4 NO_3$ ของ Merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- KH_2PO_4 ของ J.B.Bakes
- KCl ของ Merck
- $MgSO_4.7H_2O$ ของ Merck
- $FeSO_4.7H_2O$ ของ Merck
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์
- สารเคมีที่ใช้หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส
- สารเคมีที่ใช้หากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตโบเอส
- สารเคมีที่ใช้หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องเขย่า
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
- เครื่องชั่งละเอียด
- เครื่องวัดค่าพีเอช
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- ตู้อบแห้ง
- ชุดกรอง
- ไมโครปิเปต ขนาด 1000 ไมโครลิตร
- ฟลาสก์หลุม ขนาด 250 มล.
- ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)
- กล้องจุลทรรศน์

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์

เขี่ยเชื้อราลงในอาหาร PDA ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาก์ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ราสร้างสปอร์ ทำสารแขวนลอยของสปอร์โดยเติมน้ำกลั่น (ที่มีทวีน 80 0.05 %) ใช้ช้อนสเตนเลสที่สะอาดและฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย กรองผ่านสำลีเพื่อแยกเส้นใยราออก นำสารแขวนลอยของสปอร์มาตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ $1x10^7$ สปอร์/มล. เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เป็นกล้าสปอร์ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวและเพื่อนำไปทำเชื้อกลายพันธุ์ของรา *Paecilomyces* sp.

2. การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Paecilomycis* sp. โดยใช้สาร NTG

นำสารแขวนลอยของสปอร์จากข้อ 1 ปริมาตร 5 มล. ผสมกับสารละลาย NTG เข้มข้น 4000 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 25 มล. นำไปเข้าเครื่องเขย่าในที่มืดเป็นเวลา 1 ชม. (เพื่อให้ได้สปอร์ที่มีชีวิตรอด 0.01 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง แยกสปอร์จากสารละลาย NTG โดยใช้ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้มาทำความเจือจางในระดับ 10^{-2} ถึง 10^{-4} จากนั้นนำมาทำเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง chitin agar medium (ภาคผนวก ก1.) บ่มจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เจริญและมีโซนใสเกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีไว้ทำการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงและผลิตเอนไซม์โปรติเนสต่ำ

3.1 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสูง

นำเชื้อราจากข้อ 2 อายุ 7 วัน โดยตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 มม. นำไปเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง chitin agar medium โดยทำเชื้อละ10 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยไคตินในอาหารแข็ง และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ เลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้โซนใสรอบ ๆ โคโลนีกว้างกว่าสายพันธุ์เดิมไปศึกษาต่อไป

3.2 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่ำ

นำเชื้อจากข้อ 3.1 มาเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง casein hydrolysis (ภาคผนวก ก 2.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7-10 วัน สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา เลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่เกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม

ทำการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่มีสัดส่วนโซนใสต่อขนาดโคโลนี มากกว่าสายพันธุ์เดิมจากอาหารแข็ง chitin agar medium และสัดส่วนบริเวณโซนใสต่อขนาดของโคโลนีน้อยกว่าสายพันธุ์เดิมจากอาหารแข็ง casein hydrolysis ไปเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงและโปรติเอสต่ำในอาหารเหลว

นำเชื้อที่คัดเลือกไว้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากเชื้อสายพันธุ์เดิม โดยนำสารแขวนลอยของสปอร์จากเชื้อกลายพันธุ์ (เตรียมตามวิธีในข้อ 1) ใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาก์ขนาด 250 มล. (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ) โดยปรับให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นประมาณ $1.0x10^6$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. โดยแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อกลายพันธุ์จะทำ 5 ซ้ำ นำฟลาสก์ไปบ่นที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอส และเอนไซม์โปรติเอส นำเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินสูง และโปรติเอสต่ำไปศึกษาต่อไป

5. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไคโตไบเอส โปรติเอสในอาหารเหลว

นำเชื้อจากข้อ 4 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ไคโตโบเอส สูงสุดและมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำที่สุด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์ โดยนำสารแขวนลอยสปอร์เติมลงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ ปรับให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น $1.0x10^6$ สปอร์ต่อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าในสภาวะเดียวกับข้อ 4 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอส และเอนไซม์โปรติเอส

6. การหากิจกรรมของเอนไซม์

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอส เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีในภาคผนวก ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงและผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำในอาหารแข็ง

จากเชื้อกลายพันธุ์ทั้งหมด 300 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีบนอาหารแข็ง chitin agae medium กว้างกว่าสายพันธุ์เดิมของ *Paecilomyces* sp. จำนวน 100 สายพันธุ์ เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์เดิม ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นนำเชื้อกลายพันธุ์จำนวน 100 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง casein hydrolysis พบว่ามีทั้งสายพันธุ์ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสเล็กกว่าและกว้างกว่าสายพันธุ์เดิม เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเล็กกว่าสายพันธุ์เดิมเป็นจำนวน 15 สายพันธุ์ คือ MP-5 , MP-20 , MP-21 , MP-24 MP-26 , MP-42 , MP-43 , MP-46 , MP-53 , MP-56 , MP-60 , MP-63 , MP-71 และ MP-91 โดยทั้ง 15 สายพันธุ์มีอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลโนีบนอาหาร chitin agar medium อยู่ระหว่าง 1.70-1.93 และมีอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหาร casein hydrolysis อยู่ระหว่าง 1.10 -1.22

วิธีการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน บนอาหารแข็ง chitin agar medium โดยดูขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นเป็นวิธีการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นิยมเพราะเป็นวิธีที่สะดวก ใช้เวลาน้อย และสามารถคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์จำนวนมาก ๆ ได้ดี วิธีนี้ใช้ได้ทั้งแบคทีเรีย รา (Reid และ Ofrydziak , 1991 ; Vesseur และคณะ , 1990) โดยโคโลนีใดที่ให้ขนาดของโซนใสรอบ ๆ โคโลนีกว้างกว่า จะผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าโคโลนีที่มีขนาดของโซนใสรอบ ๆ โคโลนีเล็กกว่า ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลงจากสายพันธุ์เดิมจึงดูลักษณะของขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง casein hydrolysis เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของขนาดของโซนใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหาร chitin agar medium (A) และบนอาหาร casein hydrolysis (B) ของเชื้อสายพันธุ์เดิมและเชื้อกลายพันธุ์

เชื้อ	A	B
Paecilomyces sp.	1.42	1.60
เชื้อกลายพันธุ์ MP-1	1.70	1.56
MP-2	1.55	1.33
MP-3	1.63	1.36
MP-4	1.73	1.50
MP-5	1.80	1.20
MP-6	1.64	1.46
MP-7	1.79	1.30
MP-8	1.81	1.39
MP-9	1.64	1.14
MP-10	1.72	1.35
MP-11	1.74	1.50
MP-12	1.74	1.35
MP-13	1.57	1.09
MP-14	1.74	1.24
MP-15	1.76	1.30
MP-16	1.57	1.28
MP-17	1.68	1.11
MP-18	1.62	1.10
MP-19	1.64	1.12
MP-20	1.78	1.16
MP-21	1.74	1.16
MP-22	1.62	1.26
MP-23	1.73	1.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของขนาดของโซนใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหาร chitin agar medium (A) และบนอาหาร casein hydrolysis (B) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม และเชื้อกลายพันธุ์ (ต่อ)

เชื้อ	A	B
เชื้อกลายพันธุ์ MP-24	1.77	1.22
MP-25	1.69	1.18
MP-26	1.75	1.11
MP-27	1.69	1.32
MP-28	1.54	1.21
MP-29	1.64	1.21
MP-30	1.60	1.23
MP-31	1.66	1.18
MP-32	1.68	1.24
MP-33	1.55	1.06
MP-34	1.60	1.10
MP-35	1.66	1.32
MP-36	1.55	1.15
MP-37	1.64	1.15
MP-38	1.68	1.20
MP-39	1.64	1.14
MP-40	1.62	1.10
MP-41	1.69	1.23
MP-42	1.79	1.10
MP-43	1.73	1.20
MP-44	1.64	1.13
MP-45	1.57	1.09
MP-46	1.75	1.13
MP-47	1.61	1.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของขนาดของโซนใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหาร chitin agar medium (A) และบนอาหาร casein hydrolysis (B) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม และเชื้อกลายพันธุ์ (ต่อ)

เชื้อ	A	B
เชื้อกลายพันธุ์ MP-48	1.52	1.11
MP-49	1.64	1.14
MP-47	1.61	1.10
MP-48	1.52	1.11
MP-49	1.64	1.14
MP-50	1.71	1.14
MP-51	1.69	1.20
MP-52	1.71	1.16
MP-53	1.75	1.22
MP-54	1.69	1.16
MP-55	1.66	1.12
MP-56	1.72	1.14
MP-57	1.63	1.20
MP-58	1.72	1.24
MP-59	1.62	1.17
MP-60	1.79	1.22
MP-61	1.65	1.14
MP-62	1.63	1.17
MP-63	1.73	1.16
MP-64	1.81	1.12
MP-65	1.67	1.18
MP-66	1.64	1.11
MP-67	1.64	1.11
MP-68	1.71	1.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของขนาดของโซนใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหาร chitin agar medium (A) และบนอาหาร casein hydrolysis (B) ของเชื้อสายพันธุ์เดิมและเชื้อกลายพันธุ์ (ต่อ)

เชื้อ	A	B
เชื้อกลายพันธุ์ MP-69	1.66	1.19
MP-70	1.85	1.19
MP-71	1.81	1.14
MP-72	1.77	1.23
MP-73	1.54	1.20
MP-74	1.68	1.45
MP-75	1.54	1.31
MP-76	1.73	1.34
MP-77	1.80	1.39
MP-78	1.77	1.38
MP-79	1.52	1.35
MP-80	1.84	1.39
MP-81	1.67	1.42
MP-82	1.90	1.38
MP-83	1.89	1.51
MP-84	1.60	1.23
MP-85	1.81	1.41
MP-86	1.83	1.50
MP-87	1.80	1.29
MP-88	1.56	1.50
MP-89	1.76	1.56
MP-90	1.80	1.44
MP-91	1.92	1.12
MP-92	1.50	1.38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของขนาดของโซนใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหาร chitin agar medium (A) และบนอาหาร casein hydrolysis (B) ของเชื้อสายพันธุ์เดิม และเชื้อกลายพันธุ์ (ต่อ)

เชื้อ	A	B
เชื้อกลายพันธุ์ MP-93	1.78	1.38
MP-94	1.84	1.70
MP-95	1.85	1.36
MP-96	1.74	1.78
MP-97	1.74	1.70
MP-98	1.81	1.60
MP-99	1.61	1.77
MP-100	1.93	1.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34686

2. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงและเอนไซม์โปรติเอสต่ำในอาหารเหลว

นำเชื้อกลายพันธุ์ 15 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้จากข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอสมากกว่าสายพันธุ์เดิม และผลิตเอนไซม์โปรติเอสน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม มี 4 สายพันธุ์คือ เชื้อกลายพันธุ์ MP-5 MP-42 MP-70 และ MP-91 ดังแสดงในตารางที่ 2

เชื้อกลายพันธุ์ MP-91 ผลิตเอนไซม์ไคติเนส 16.44 หน่วยต่อมล. เอนไซม์ไคโตไบเอส 48.20 หน่วยต่อมล. และผลิตเอนไซม์โปรติเอส 35.40 หน่วยต่อมล. โดยจะผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินสูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะลดลง

เชื้อกลายพันธุ์ MP-42 ผลิตเอนไซม์ไคติเนส 11.52 หน่วยต่อมล. เอนไซม์ไคโตไบเอส 24.16 หน่วยต่อมล. และเอนไซม์โปรติเอส 33.61 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อเช่นกัน หลังจากนั้นเอนไซม์ทั้งสามจะเริ่มลดลง

เชื้อกลายพันธุ์ MP-70 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดในวันที่ 3 คือ 8.54 หน่วย ต่อมล. ไคโตไบเอส 36.00 หน่วยต่อ มล.ในวันที่ 4 และโปรติเอส 42.77 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นเอนไซม์ทุกตัวจะลดปริมาณลง สำหรับ MP-5 เป็นเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่ำสุดคือ 5.40 หน่วยต่อมล. ในวันที่สองของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลิตเอนไซม์โคโตไบเอส 77.66 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสูงกว่าเชื้อกลายพันธุ์อื่น ๆ และผลิตโปรติเอสสูงที่สุด คือ 65.30 หน่วยต่อมล. ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นปริมาณเอนไซม์ทั้งสามชนิดเริ่มลดลงเช่นเดียวกับเชื้อกลายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Paecilomyces* sp. พบว่าจะผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพียง 2.20 หน่วยต่อมล. ไคโตไบเอส 23.20 หน่วยต่อมล. แต่มีโปรติเอสสูงมากคือ 98.50 หน่วยต่อมล. สำหรับเชื้อกลายพันธุ์อื่น ๆ ถึงแม้จะผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมแต่มีโปรติเอสมากกว่าหรือในปริมาณใกล้เคียงกัน

ดังนั้นจึงนำเชื้อกลายพันธุ์ MP-91 ไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลาสก์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไคโตโบเอส และโปรติเอส ของใช้สายพันธุ์ต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

เชื้อจุลินทรีย์	วันที่	เอนไซม์ไคติเนส (หน่วย/มล.)	เอนไซม์ไคโตไบเอส (หน่วน/มล.)	เอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.)
Paecilomyces sp	0	-	-	-
	1	0.3	0.0	0.0
	2	2.20	23.20	98.50
	3	1.30	10.20	90.55
	4	0.94	13.58	85.20
	5	0.32	14.45	60.42
MP-5	0	-	-	-
	1	1.80	8.75	6.40
	2	5.40	72.58	65.30
	3	2.80	77.66	60.28
	4	1.50	49.58	55.00
	5	1.40	42.02	32.00
MP-42	0	-	-	-
	1	1.48	2.42	6.94
	2	8.54	19.21	8.89
	3	11.52	24.16	33.61
	4	5.14	11.83	17.22
	5	5.74	14.10	10.00
MP-70	0	-	-	-
	1	5.50	2.58	7.50
	2	7.58	27.50	11.94
	3	8.54	21.50	42.77
	4	4.40	36.00	16.38
	5	1.20	13.10	7.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์	วันที่	เอนไซม์ไคติเนส (หน่วย/มล.)	เอนไซม์ไคโตไบเอส (หน่วน/มล.)	เอนไซม์โปรติเอส (หน่วย/มล.)
MP-91	0	-	-	-
	1	4.20	3.75	6.40
	2	12.64	45.58	25.00
	3	16.44	48.20	35.40
	4	8.20	29.58	20.20
	5	2.10	20.25	18.80

3. การศึกษาความสัมพันธุ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์โคโตไบเอส และเอนไซม์โปรติเอส สารกับค่าพีเอชและน้ำตาลรีดิวซ์

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ MP-91 ในอาหารผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินและแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 1

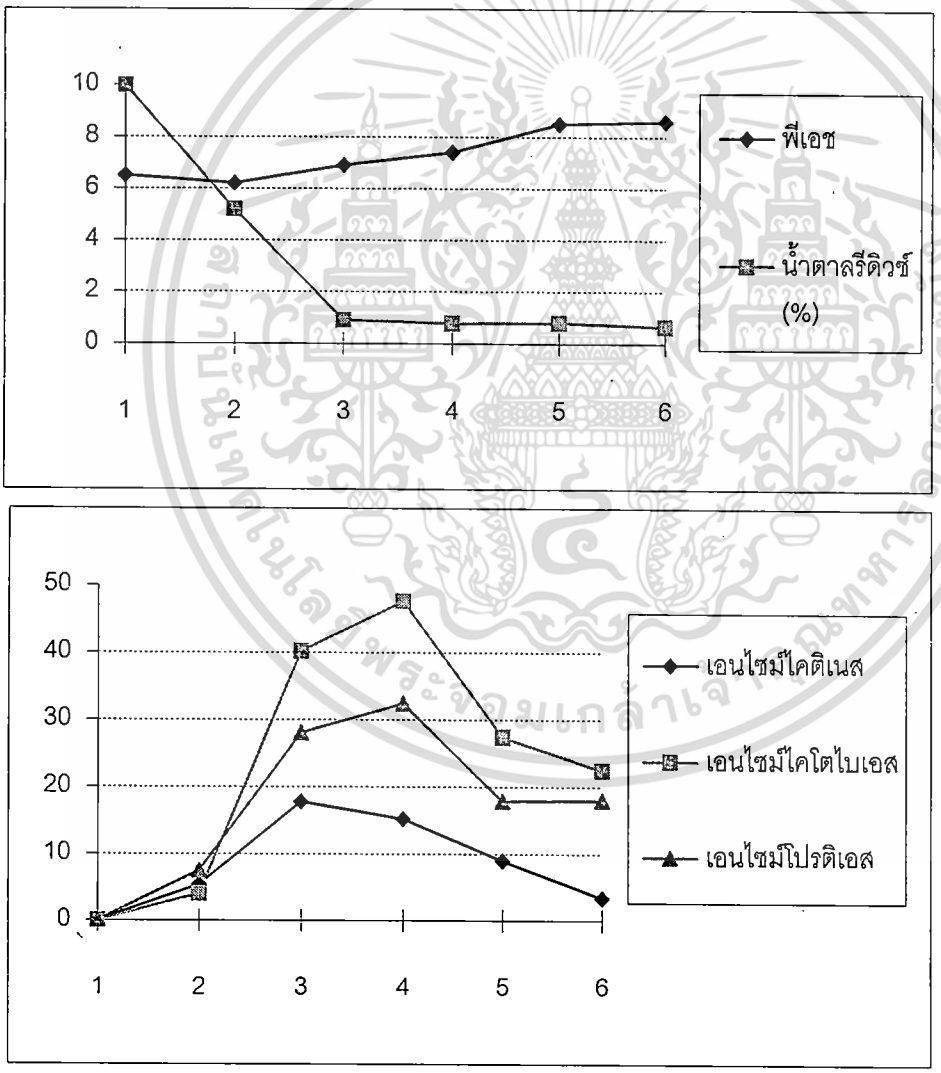
เชื้อกลายพันธุ์ MP-91 เริ่มผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอส เอนไซม์โปรติเอส 5.40 4.00 และ 7.50 หน่วยต่อ มล. ตามลำดับ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 5.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มหมดในวันที่ 2 การผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอส เอนไซม์โปรติเอส จะเพิ่มขึ้นเป็น 17.80 40.20 และ 28.07 หน่วยต่อมล.ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสลดลงเล็กน้อย ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสและโปรติเอสเพิ่มขึ้นเป็น 47.66 และ 32.40 หน่วยต่อมล. พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 1-2 อยู่ระหว่าง 6.2-6.9 จากนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเป็น 7.4 ในวันที่ 3 และมีค่าสูงขึ้นเป็น 8.5 และ 8.6 ในวันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ไคโตไบเอส และโปรติเอส ลดลงเหลือ 8.94 27.40 และ 17.90 หน่วยต่อมล.ตามลำดับ ในวันที่ 4 และลดลงต่ำสุดในการเพาะเลี้ยงในวันที่ 5 ยกเว้น เอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ไคโตไบเอส และโปรติเอส จะเริ่มลดลงเมื่อพีเอชสูงขึ้น แสดงว่าพีเอชมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและไคโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไคโตไบเอสและโปรติเอสของเชื้อกลายพันธุ์ MP-91

เชื้อกลายพันธุ์	วันที่	พีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (%)	เอนไซม์ไคติเนส	อนไซม์ไคโตไบเอ:	เอนไซม์โปรติเอส
MP-91	0	6.5	10	0	0	0
	1	6.2	5.2	5.4	4	7.5
	2	6.9	0.9	17.8	40.2	28.07
	3	7.4	0.78	15.2	47.66	32.4
	4	8.5	0.8	8.94	27.4	17.9
	5	8.6	0.65	3.4	22.48	18



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไคโตไบเอสและโปรติเอส กับน้ำตาลรีดิวซ์และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ MP-91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบเอส Vyas และ Deshpande (1989) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจาก *Myrothecium verrucaria* จะลดลงเมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงขึ้น จากการศึกษาพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสจากรา *M. verrucaria* (Vyas และ Deshpande , 1989) *Paecilomyces varioti* (Gautam และคณะ , 1996) และ *Beauveria bassiana* (Xiuli และคณะ , 1989) คือ พีเอช 5.0

เชื้อกลายพันธุ์ MP-91 ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอสสูงกว่า *Paecilomyces* sp. 8.0 เท่า และ 2.0 เท่า ตามลำดับ และจะให้เอนไซม์ไคติเนสลดลง 3 เท่า จากสายพันธุ์เดิม

ในการศึกษาต่อไปควรทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะทำการเพาะเลี้ยงให้คงที่ เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ให้สูง

หมายเหตุ งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณประจำปี 2541 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

Paecilomyce sp. ที่คัดเลือกมาสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตไบเอส และเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.20 , 23.20 และ 98.50 หน่วยต่อมล. หลังจากนำมาทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG) พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ MP-91 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงขึ้นเป็น 17.80 และ 47.60 หน่วยต่อมล.ตามลำดับ และผลิตเอนไซม์โปรติเอส 32.40 หน่วยต่อมล์.เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในฟลาสก์แบบเขย่า โดยพบว่าเชื้อกลายพันธ์ MP-91 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงขึ้น 8 และ 2 เท่าตามลำดับ ในขณะที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง 3 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง. 2529. การใช้ประโยชน์จากไคติน. อาหาร 16(4) : 219 -211.

วิสิฐ จะวะสิต และลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์ 2533 ไคโตแซน : โพลิเมอร์ตัวใหม่จากของเหลือ อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ วารสารอุตสาหกรรมเกษตร 1(1) : 4-8

อรพิน ภูมิภมร. 2527. การควบคุมระบบจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 243 น.

Austin , P.R.,C.J.Brine,J.E.Castle and J.P.Zikakis. 1981 Chitin : New facets of research. Science 212:749-753.

Cabib , E. 1987. The synthesis and degradation of chitin. Adv. Enzymol. 57:59 -101

Gautam , S.P.,A.K. Gupta , R.Shrivastava and M. Awathi. 1996. Protoplast formation from the thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea* , using the thermostable chitinase and laminarinase of *Paecilomces varioti.* World J. Microbiol. Biotechnol. 12:99-100.

Gupta , R., R.K. Saxena,P. Chaturvedi and J.S. Virdi. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: Its potential in fungal cell wall lysis. J. Appl. Bacteriol. 78:378-383.

Hou, H. and S. Jong. 1985. Protoplast formation from mycelia of *Penicillium digitatum* by cell wall -lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Ferment. Technol. 63:189 -192.

Intraphan , D. 1994. Strain improvement of *Hersutella thompsonii* for control of citrus rust mits. MS.Thesis ,Kasetsart Univ., Bangkok.

Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. Food Technol. 38:85-97.

Kurita , K.,K. Tomita, T. Tado,S. Ishili,S.I. Nishimura and K. Shimoda.1993.Squids chitin as a potential alternative chitin source deacetylation behavior and characteristic properties. J. Polymer. Sci. 31:485-492.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reid,J.D. and D.M. Ogrydziak.1981.Chitinase overproducing mutant of *Serratia marcescens*. Appl.Environ. Microbiol. 41:664-669.

Shaikh, S.A. and M.V. Deshpande. 1993. Chitinolytie enzymes : Their contribution to basic and applied research. World J.Microbiol.Biotech. 9:468-475.

Sherief , A.A., M.M.A. El Sawah and M.A.visAbd El-Naby.1991. Some protesties of chitinase produced by a potent *Aspergillus carneus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:228 -230.

Vasseur,V., F. Arigoni, H. Anderson,G.Defago,G.Bompeix and J. Seng.1990. Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. J. Gen. Microbiol. 136:2561-2567.

Vyas, P.and M.V. Deshpande.1989.Chtinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelium degradation. J. Gen. Appl. Microbiol. 35:343-350.

Vyas,P. and M.V. Deshpande.1991.Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. J. Gen. Appl. Microbiol. Microbiol. 37:267-275.

Watanabe,T., W. Oyanagi, K. Suzuki and H. Tanaka.1990.Chitinase system of *Bacillus circulans* WL- 12 and importance of chitinase A1 on chitin degradation. J. Bacteriol. 172:4017-4022.

Xiuli,H. A.Danmei and R.Qian. 1989.Study on chitinase in cultures of *Beauveria bassina* , pp.309 -317. In G. Skjak-Braek,T. Anthonsen and P. Sandford (eds.) Chitin and Chitosan.Elsevier Applied Science,London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Chitin agar medium

swollen chitin	40.0	กรัม
$NaNO_3$	3.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Oxgall	40.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม
pH	5.5	

การเตรียม swollen chitin

นำผงไคติน 10 กรัม ใส่ลงในฟลาก์ขนาด 250 มล. เติมกรดฟอสฟอริก (85 % phosphoric acid) 90 มล. เขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 16-24 ชม. นำสารละลายเทลงในน้ำกลั่นจะได้ตะกอนสีขาว ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ปรับพีเอชในสารละลายให้ได้ประมาณ 7.0 แยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ตะกอนที่ได้เก็บในตู้เย็น

2. Casein hydrolysis

glucose	10.0	กรัม
skim milk (15 %)	25.0	มล.
KH_2PO_4	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำ	1.0	ลิตร
pH	5.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การหากิจกรรมของเอนไซม์

1. การหากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

สารเคมี 1 % swollen chitin

0.05 M. Citrate-phosphate buffer pH 5.0

สารละลายมาตราฐาน N-acetylglucosamine (NAG)

วิธีการ

1.1 เติมสารละลายเอนไซม์ (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มล. 1% swollen chitin 1.0 มล. และบัฟเฟอร์ 1.0 มล. ลงในหลอดทดลองนำไปบ่มที่ 45 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 1 ชม.

1.2 หลอดคุม ทำโดยการนำสารละลายเอนไซม์ต้มในน้ำเดือนนาน 5 นาที ก่อนเติม 1 % swollen chitin สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์และเติมสารต่าง ๆ เหมือนข้อ 1.1 บ่มที่ 45 $^{\circ}$ ซ นาน 1 ชม.

1.3 เมื่อครบเวลา นำสารละลายในหลอดทดลองต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็น นำน้ำใสในแต่ละหลอดมา 1 มล. นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi Nelson's method นำค่าการดูดกลืนกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย NAG

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซไคติเนส หมายถึง 1 ไมโครกรัม ของ NAG ที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์และสับสเตรทในสภาวะที่กำหนดให้ในเวลา 1 นาที

2. การหากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอส

สารเคมี 1.0 mM p-Nilrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine (NPGlu)

0.50 M citrate-phosphate buffer pH 6.6

0.5 M glycine-NaOH buffer pH 11.0

สารละลายมาตรฐาน p-nitrophenol

วิธีการ

2.1 เติมสารละลายเอนไซม์ (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 0.2 มล. สารละลาย 1.0 mM NPGlu 1.8 มล. บ่มที่ 45 $^{\circ}$ ซ 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม 0.5 m glycine-NaOH 1.8 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol.

2.3 หลอดคุมทำโดยการเติม 0.5 M glycine-NaOH ปริมาตร 1.8 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ 0.2 มล. ก่อนเติม 1.0 mM NPGlu. สำหรับแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ไคไบเอส หมายถึง 1 ไมโครกรัม ของ p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์และสับสเตรทในสภาวะที่กำหนดในเวลา 1 นาที

3. การหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

สารเคมี 1 % casein

5 % trichloroacetic acid (TCA)

0.4 M Na_2CO_3

1 N Folin-Ciocalteu reagent

สารละลายมาตราฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

วิธีการ

3.1 เติมสารละลายเอนไซม์ (ที่มีความเจือจางที่เหมาะสม) 1.0 เติมเคซีน 1.0 มล. นำไปบ่มที่ 45 ^{o} ซ นาน 10 นาที

3.2 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการเติม 5 % TCA 3.0 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที กรองเอาเฉพาะน้ำใส

3.3 นำน้ำใส 1.0 มล. จากข้อ 3.2 เติมสายละลาย 0.4 M Na_2CO_3 5.0 มล.เขย่า จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มล. ให้สารละลายทั้งหมดเสมอกัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตราฐานของไทโรซีน

3.4 หลอดคุมทำโดยสารละลาย TAC ก่อนเติมสารละลายเคซีน แบลงก์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วย ของเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 1 ไมโครกรัมของไทโรซีนที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์และสับสเตรตในสภาวะที่กำหนดในเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi Nelson's medthod

สารเคมี

Copper Reagent

1. 10 % $CuSO_4$. $5H_2O$ 100 มล.

2. Phosphate-tartrate Solution เตรียมโดยละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ Na_2HPO_4. $12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มล. เติม sodium potassium tartrate (tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย จากนั้นเติม 1 N NaOH 100 มล. ตามด้วย Na_2SO_4 (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วันถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออก

ผสมสารละลายในข้อ 1. และ 2. เข้าด้วยกัน

Nelson's Arsenomolybdate Color Reagent

1. ละลาย $(NH_4)_6$ Mo $_7O_{24}$ $4H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มล. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น (H_2SO_4) 21 มล. ผสมให้เข้ากัน

2. ละลาย $Na_2HASO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มล.

ผสมสารละลาย 1 และ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{o} ซ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง สารละลายนี้ควรเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เติมตัวอย่าง 1 มล. ลงในหลอดทดลอง เติม Copper Reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางที่ปากหลอด

2. ทำให้เย็นทันที แล้วเติม Nelson's Arsenomolybdate Color Reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 2 นาที

3. เติมน้ำกลั่น 2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนมเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้