สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

นาย เกรียงไกร พรวิลาศสิริ
นาย ฉัตรชัย เจริญชุษณะ
นาย นพพล บรรลือเชตร์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปพ.
ก767ก
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30613
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation of *Chitinase* producing bacteria

Mr. Kriengkrai Pornwillassiri

Mr. Chaichai Charoenchusana

Mr. Noppol Bunluekhet

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

โดย นาย เกรียงไกร พรวิลาศสิริ
นาย ฉัตรชัย เจริญชุษณะ
นาย นพพล บรรลือเขตร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาพิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ
(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

_____ กรรมการ
(รศ. ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)

_____ กรรมการ
(อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

โดย นาย เกรียงไกร พรวิลาศสิริ

นาย ฉัตรชัย เจริญชุษณะ

นาย นพพล บรรลือเขตร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

เสนอ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

ไคตินเป็นสารโฮโมพอลิเมอร์ของอะเซทิลกลูโคซามีน พบมากในธรรมชาติโดยเฉพาะเปลือกของแมลง สัตว์ในกลุ่มคัสตาเซีย และผนังเซลล์ของเชื้อรา จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจำนวน 50 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดิน และแบคทีเรียรหัส 1A-5 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ดีที่สุด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ (สูตร A-3) ประกอบด้วย ไคติน 2 เปอร์เซ็นต์ , เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ , กลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ , ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ , โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดที่ 6.0 และ 4.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ แล้วให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด คือ ความเข้มข้นของไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจนจะใช้ ความเข้มข้นของเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 7.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสเท่ากับ 4.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title	Isolation of Chitinase producing bacteria
Student	Mr. Kriengkrai Pornwillassiri
	Mr. Chatchai Charoenchusana
	Mr. Noppol Bunluckhet
Department	Applied Biotechnology
Special Project Advisor	Miss. Nuamphan Naranong
Academic year	1997

ABSTRACT

Chitin , a homopolymer of N-acetyl-D-glucosamine , is distributed widely in nature. It can be found in insect exoskeleton , outer shells of crustaceans and the cell walls of fungi. In this study , about 50 strains of chitinase producing bacteria were isolated from soil. Among them , strain 1A-5 appeared to be the most potential for chitinase producer. The maximum chitinase activity was obtained when the strain was grown aerobically in a medium consisting of 2 % colloidal chitin , 0.5 % peptone , 0.2 % glucose , 0.5 % yeast extract , 0.1 % KH_2PO_4 , 0.1 % NaCl pH 7 at 30 $^{\circ}C$ after 24 hrs. The optimization for chitinase and chitobiase is 1 % chitin as a carbon source and 0.5 % peptone as a nitrogen source. The highest activities of chitinase and chitobiase are 7.75 and 4.82 units/ml , respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต และ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

ผศ. อรไท สุขเจริญ ประธานกรรมการ สอบโครงงานพิเศษ รศ. ดร. ดุษณี ธระบริ-พัฒน์ และอาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาด้วย รวมทั้ง คุณ ผยอม เกียรติกำจร , คุณ วิทยา เขียวเขิน , คุณ ประเสริฐวิทย์ แพงคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้าย คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาที่ช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	-ก-
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	-ข-
กิตติกรรมประกาศ	-ค-
สารบัญรูป	-ง-
สารบัญตาราง	-จ-
บทที่ 1. บทนำ	1
บทที่ 2. ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
บทที่ 4. ผลการทดลองและวิจารณ์	17
บทที่ 5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	แสดง	หน้า
1.	แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 ในอาหาร NA Slant	20
2.	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 ในอาหารแข็ง A-2	21
3.	แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์	21
4.	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบ - เอส ในเวลา 5 วัน	25
5.	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นของไคตินต่าง ๆ	26
6.	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสที่ความเข้มข้นของไคตินต่าง ๆ	27
7.	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆกัน	28
8.	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสที่แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน	29
9.	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส	41
10.	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคโต-ไบเอส	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	แสดง	หน้า
1.	แสดงอัตราส่วนโซนใสต่อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย	17
2.	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่ให้สัดส่วนโซนใสต่อโคโลนีสูงสุด	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1.
บทนำ

ไคติน (Chitin) เป็นสารโฮโมโพลิเมอร์ (Homopolymer) ที่มีอยู่ในธรรมชาติ พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Cellulose) ประกอบด้วย N - acetyl - D - glucosamine มาต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 - glucosidic (Muzzarelli, 1977) ไคตินสามารถจะพบได้มากในเปลือกของสัตว์ในตระกูล Crustaceae หรือบริเวณโครงร่างภายนอกของแมลงและเปลือกของสัตว์ทะเล เช่น พวกกุ้ง หอย ปู และปลาหมึก นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในผนังเซลล์ของพืช เชื้อรา และยีสต์ (อุดมชัย, 2535 ; Austin และคณะ, 1981) ในปัจจุบันแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินและอนุพันธ์ไคติน คือ ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล (Carroad และ Raymond, 1978 ; Knorr, 1984) เนื่องจากไคตินเป็นสารที่มีอยู่และเกิดขึ้นในธรรมชาติจึงเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม เพราะสามารถถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการธรรมชาติ กลายเป็นปุ๋ยและสารอนินทรีย์ในดินและน้ำ (อุดมชัย, 2535) เอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินได้คือ เอนไซม์ไคติเนส ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดแต่แหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญมาจากจุลินทรีย์ (Jeuniaux, 1966 ; Muzzarelli, 1977) จุลินทรีย์เหล่านั้นได้แก่ แบคทีเรีย (Monreal และ Reese, 1969 ; Ueda และ Arai,1992) แอคติโนมัยซีท (Ueno และคณะ, 1990) ยีสต์ (Elango และคณะ, 1982) และเชื้อรา (Vyas และ Deshpande, 1989) โดยเอนไซม์ไคติเนสจะย่อยไคตินเป็น N - acetyl - D -glucosamine (NAG) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถเจริญและผลิตเป็นสารที่มีประโยชน์อื่น ๆ ได้ ในปัจจุบันมีผู้ทำการวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่สูง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยใช้ย่อยไคตินและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีคุณค่าหรือมีราคาแพง ซึ่งจะเป็นการลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม และนำของเสีย เช่น เปลือกกุ้ง และปู มาเปลี่ยนเป็นของมีคุณค่ามากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันมีการคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ โดยพิจารณาจากสิ่งต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. สามารถนำของเหลือใช้จากกระบวนการผลิตต่าง ๆ มาใช้ให้เกิดประโยชน์
2. เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน โดยใช้วัสดุที่มีราคาถูกและเป็นการเพิ่มคุณค่าของของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม
3. ในปัจจุบันยังไม่สามารถที่จะทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยไคตินได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ทำให้การผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในอุตสาหกรรมมีปริมาณจำกัดและมีราคาแพง ซึ่งไม่เหมาะต่อการผลิตในขั้นอุตสาหกรรม

จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการทดลองหาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่มีประสิทธิภาพสูง โดยทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากดิน และทำการหาสัดส่วนของโซนใส (Clear zone) ต่อโคโลนี (Colony) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้สูงที่สุด

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ทำการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมรรถภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคติน โดยอาศัยตัวอย่างดินจากบริเวณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ทำการศึกษาและทดสอบหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมหรือปัจจัยที่จำเป็นที่จะสามารถทำการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยไคตินที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและเป็นข้อมูลในการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ในถังหมักเพื่อประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

สามารถคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ปริมาณสูงสุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไคตินได้ปริมาณสูงสุดได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2.

ตรวจเอกสาร

1.ไคติน (Chitin)

1.1โครงสร้าง

ไคติน เป็นโครงสร้างของสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรทที่มีมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ (Knorr, 1984) ประกอบด้วย ไฮโดรเจน 6.5 เปอร์เซ็นต์ , คาร์บอน 47.3 เปอร์เซ็นต์ , ไนโตรเจน 6.9 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 39.4 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ สูตรโมเลกุล คือ $[C_8H_{13}NO_5]_n$ (อุดมชัย, 2535) ไคติน เป็นสารโพลิเมอร์ (Polymer) ของ β -1,4 - N - acetyl - D - glucosamine หรือ 2 - acetamido - 2 - deoxy - D - glucose (Austin และคณะ, 1981 ; Muzzarelli, 1977) เป็นสารโมเลกุลยาวที่มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส ต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองมีหมู่ -NH-CO-CH (Acetamido Groups) แทนที่จะเป็นหมู่ -OH (Hydroxyl Groups)(วิสิฐ และลูกจันทร์,2533) จึงทำให้ไคตินไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดบางชนิด เช่น กรดเกลือ , กรดกำมะถัน , กรดฟอสฟอริก (อุดมชัย, 2535)

1.2 คุณสมบัติของไคติน

ไคตินเป็นสารให้ความแข็งแรงแก่เปลือกสัตว์จำพวกกุ้ง หอย ปู และแมลง รวมทั้งยังเป็นองค์ประกอบของชิ้นส่วนขากรรไกรและกระดูกสันหลังของสัตว์จำพวกไส้เดือน เนื่องจากไคตินเป็นองค์ประกอบอินทรีย์ในโครงสร้างภายนอกที่สำคัญ เพราะเป็นตัวทำให้โครงสร้างยึดกันเป็นรูปและคงสภาพแข็งแรงพอที่จะใช้เป็นเครื่องป้องกันตัวจากการทำร้ายของสัตว์อื่น ๆ ไคตินไม่ละลายในตัวทำละลายธรรมดา เช่น น้ำ หรือแอลกอฮอล์ และมักเกาะกับโปรตีนเกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ ไคตินของสัตว์ชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะของโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น ความยาวของสายโซ่โมเลกุล รูปแบบของผลึกและจำนวนหมู่อะเซติล ไคตินจะมีลักษณะบางเบา จึงได้มีการนำมาใช้แทนสารส้มสำหรับการตกตะกอนได้เป็นอย่างดี แต่ไม่เป็นอันตรายต่อคนเหมือนสาร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส้มสามารถสลายตัวได้เอง บางแห่งมีการนำมาใช้ในการจับตะกอนเงินและทอง เพราะเมื่อเผาทิ้งก็จะระเหยไป (ฉกามาศ, 2529)

1.3 แหล่งของไคติน

ไคตินพบได้เสมอตามผนังเซลล์ของพืชและสัตว์ โดยในพืชบางชนิดอาจมีไคติน แทนเซลลูโลสหรือเกิดร่วมกับเซลลูโลส ในสัตว์ส่วนมากจะพบไคติน มากในเปลือกของสัตว์ในตระกูล Crustaceae เช่น กุ้ง ปู หอย ปลาหมึก แมลง (อุดมชัย, 2535 ; Austin และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด โดยพบในส่วนของผนังเซลล์สปอร์ และเส้นใยของรา ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น *Schizophyllum commune* มีไคตินปริมาณ 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ , *Allomyces macrogymus* มีไคตินปริมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (Bartnicki และ Garcia, 1968)

ปัจจุบันแหล่งของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินที่มีราคาถูก คือ จากเปลือกกุ้ง และปู ที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (วิสิฐ และลูกจันทร์, 2533) โดยกุ้งจะมีไคติน 14 - 27 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง และปูมีไคติน 13 -15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Deshpande, 1986) ในต่างประเทศจึงมีการผลิตไคตินจากเปลือกกุ้ง และปูที่เหลือทิ้งเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย

1.4 ประโยชน์ของไคติน

(1) อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

ไคตินมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตกระดาษเพราะการเพิ่มไคตินเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ลงในเยื่อกระดาษจะเพิ่มความทนทานของกระดาษและเร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ และเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่เหลือ เมื่อทำเป็นแผ่นกระดาษแล้ว ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ รวมทั้งยังประหยัดพลังงานที่ใช้ตีเยื่อกระดาษได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ กระดาษที่ผสมไคตินจะมีความแข็งแรงขณะเปียกดีขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงชาปิ้งและกระดาษเช็ดมือ (Deshpande, 1986 ; ธีระพล, 2534)

(2.) ทางการแพทย์

ใช้ในการเร่งการรักษาบาดแผล คือ แผ่นเส้นใยฟองน้ำ และด้ายเย็บแผลที่ทำมาจากไคติน จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากกระดูกอ่อน และใช้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตแซนที่มีประสิทธิภาพใช้ประโยชน์ในการเพิ่มความรวดเร็วในการรักษาบาดแผล ผ่าตัดและไฟไหม้ ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ หลายรูปแบบ เช่น เป็นผง สารข้นเหนียว สาร-ละลายฟิล์ม เส้นใยผลิตภัณฑ์แต่งแผล ทำน้ำยาทารักษาแผล ด้ายเย็บแผล เป็นต้น (Technical Insighte Inc.,1989 ; ธีระพล, 2534)

(3) ทางอื่น ๆ

พบว่าไคตินสามารถเร่งการเจริญเติบโตในไก่กระทง เมื่อผสมไคตินลงในอาหารไก่กระทงด้วยปริมาณ 0.57 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ไก่มีอัตราการกินอาหารลดลง แต่จะมีน้ำหนักหลังการฆ่าเพิ่มขึ้นถึง 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงไก่ด้วยอาหารธรรมดา ผลที่ได้คือ ผู้เลี้ยงไก่ได้กำไรเพิ่มขึ้นถึง 70 เปอร์เซ็นต์ การใช้ไคตินในอาหารไก่เพื่อเร่งการเจริญเติบโตนี้ เป็นการใช้ของเสียจากการผลิตผลิตภัณฑ์จากกุ้ง เช่นในประเทศอินเดียมีถึง 66,000 ตันต่อปี ในจำนวนนี้จะสามารถผลิตไคตินได้ถึง 2,000 ตัน เมื่อคิดเป็นเนื้อไก่ก็จะเพิ่มขึ้นประมาณ 20,000 ตันต่อปี (ฉกามาศ, 2529)

1.5 กระบวนการผลิตไคติน

กรรมวิธีการผลิตไคตินจากกากของเสียพวกเปลือกกุ้งจะประกอบไปด้วยสองขั้นตอน

1. การแยกโปรตีน (Protein Separation) กากของเสียจะถูกใช้ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง (NaOH) เพื่อละลายเอาโปรตีนออกมาที่ประมาณ พีเอช 4 และตกตะกอนทำให้แห้ง
2. การแยกแคลเซียมคาร์บอเนต (Demineralization) กากที่เหลือจากการแยกโปรตีนนำมาล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (10 เปอร์เซ็นต์ของ HCl) เพื่อชะล้างเอาแคลเซียมคาร์บอเนตออกไปในรูปของแคลเซียมคลอไรด์ สารที่เหลือคือ ไคติน นำไคตินที่ได้มาดึงเอาหมู่อะเซ็ทธิล (Acetyl Group) ออก โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร) จากนั้นล้างจนเป็นกลางและทำให้แห้ง บดให้ละเอียด จะได้ไคโตแซนผง (วิสิฐ และลูกจันทร์, 2533 ; Knorr, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยไคติน

เนื่องจากไคตินเป็นสารที่มีอยู่และเกิดขึ้นในธรรมชาติเช่นเดียวกับเซลลูโลส ไคตินจึงเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะด้านสิ่งแวดล้อม เพราะ ไคตินจะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการในธรรมชาติกลายเป็นปุ๋ยและสารอินทรีย์ในพื้นดิน พื้นน้ำ วนเวียนอยู่เช่นนี้ ซึ่งจัดเป็นทั้งข้อดีและข้อได้เปรียบของไคตินในการจะนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

ไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนสได้ผลผลิตสุดท้าย คือ N - acetylglucosamine (NAG) (Jeuniaux, 1966) เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในพืชพบในเมล็ดถั่ว (Powning และIrzybieviez, 1965) เมล็ดข้าวโพด เมล็ดของ Coix Lachryma - Jobi L. (Zhe - fu และคณะ, 1992) สำหรับในสัตว์พบในพวก Protozoans , Coelenterates , Nematodes , Mollusca , Arthropod และ จุลินทรีย์ (Jeuniaux, 1966) แหล่งของเอนไซม์ที่น่าสนใจนำมาจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกแบคทีเรีย และรา

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ ***Serratia*** **sp.**(Monreal และ Reese,1969) ***Bacillus*** **sp.** , ***Micrococcus*** **sp.** , ***Aeromonas*** **sp.** (Cody และคณะ, 1990) ***Streptomyces*** **sp.** (Ueno และคณะ, 1990)

เชื้อราที่พบว่าผลิตเอนไซม์ไคติเนส คือ ***Aspergillus*** **sp.** (Otakara, 1964) ***Saccharomyces cerevisiae*** (Elango และคณะ, 1982) ***Beauveria bassiana*** (Smith และ Grula, 1983) ***Mycrothecium verucaria*** (Vyas และ Deshpande, 1989) เป็นต้น

<u>ข้อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชและจุลินทรีย์</u>

1. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชต้องใช้พื้นที่มาก ทำให้ไม่สะดวกต่อการควบคุมสภาวะแวดล้อม รวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ต่างจากการผลิตโดยจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย เสียค่าใช้จ่ายน้อย
2. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับ ฤดูกาล แต่การผลิตโดยใช้จุลินทรีย์จะให้ผลผลิตที่คงที่
3. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่าจุลทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุด

ก. แหล่งคาร์บอน

เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ส่วนมากเป็น เอนไซม์ชักนำ (Inducible Enzyme) (Monreal และ Reese, 1969 ; Ohtakara และคณะ, 1979 ; Vyas และ Deshpande, 1989 ; Ueda และ Aria, 1992) บางชนิดเป็น Constitutive Enzyme แต่เมื่อเติมไคตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น (Deshpande, 1986) ไคตินและอนุพันธ์ของไคติน หลายชนิดที่สามารถชักนำ (Induce) ให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น ไคตินที่ใช้จะอยู่ในรูป Swollen Chitin หรือ Colloidal Chitin (Monreal และ Reese, 1969 ; Ohtakara และคณะ, 1979 ; Vyas และ Deshpande, 1989 ; Ueda และ Aria, 1992) Monreal และ Reese (1969) พบว่า ไคโตไบโอส เป็นสับสเตรทที่กระตุ้นให้ *Serratia Marcescens* ผลิตเอนไซม์ไคติเนส แต่ NAG ไม่มีผลในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคติเนส สำหรับ NAG glucosamine และ ไคโตไบโอส สามารถกระตุ้นให้ *Beauveria bassiana* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดี (Smith และ Grula, 1983)

การศึกษาของ Monreal และ Reese (1969) พบว่าจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไคติ-เนสจะผลิตเอนไซม์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้ม-ข้นของไคตินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียและรา คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถ้าเติม ยีสต์สกัด ลงในอาหารอีก 0.02 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การผลิตเอนไซม์สูงขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 7 - 7.5 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของรา คือ 4.5 จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของ *S. marcescens* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไคตินเป็นสับสเตรทจะมีการผลิตเอนไซม์สูงกว่าการใช้สารชนิดอื่น แต่เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ N - acetylglucosamine 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไคติเนส พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *S. marcescens* คือ พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohtakara และคณะ (1979) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของแบคทีเรีย แกรมลบ No. 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส (Glucose) , เปปโตน (Peptone) , ยีสต์สกัด(Yeast Extract) , โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ Colliodal Chitin พบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อเจริญในอาหารที่มี Colliodal Chitin 0.2เปอร์-เซนต์ , กลูโคส0.2 เปอร์เซ็นต์ , เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ , ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบไคตินและอนุพันธ์ของไคตินที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส พบว่า Colliodal Chitin จะชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์สูงสุด

ข. แหล่งไนโตรเจน

Vyas และ Deshpande (1989) ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของ *Myrothecium verucaria* ใน Basal medium ที่ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 3.0 , แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.7 , แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) 1.4 , โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5 , แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.5 , ยีสต์สกัด 0.5 , เปปโตน 0.5 ,และ ไคติน 5.0 (กรัมต่อลิตร) แหล่งของไนโตรเจนและ คาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.14 เปอร์เซ็นต์ และ ไคติน 0.5 -1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่า ยูเรีย 0.01 - 0.05 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ให้สูงกว่าส่วนควบคุม (Control) จากการศึกษาผลของโลหะบางชนิด เช่น Fe^{2+} , Mn^{2+} ,Cu^{2+} , CO^{2+} และ Zn^{2+} พบว่าสารละลายผสมของ เฟอริกซัลเฟต ($FeSO_4$) 5.0 , ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) 1.4 , แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) 1.6 และ แคลเซียมคลอไรด์ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยเติมในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรของสารละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร จะให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1.421 IU ต่อมิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 6.0

ค. ปัจจัยอื่น ๆ เช่น

เกลืออนินทรีย์

Pseufomonas aeruginosa K-187 พบว่าเมื่อทำการใช้เกลืออนินทรีย์ คือ ซิงค์ซัลเฟต , เฟอริกซัลเฟต , คอปเปอร์ซัลเฟต และ แมกนีเซียมซัลเฟต จะมีการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ ซิงค์ซัลเฟต ตั้งแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0 - 0.1 เปอร์เซ็นต์ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของ ซิงค์-ซัลเฟต ถึง 0.25 เปอร์เซ็นต์ (Wang และคณะ, 1995)

อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ส่วนใหญ่คือ อุณหภูมิระหว่าง 25 -30 องศาเซลเซียส (Monreal และ Reese, 1969 ; Skujins และคณะ, 1970 ; Ohtakara, 1988 ; Rast และคณะ, 1991 ; Peberdy, 1991 ; Sherief และคณะ, 1991 ; Mahaderen และ Crawford, 1997.)

ความเป็นกรด - ด่าง

พีเอชในอาหารย่อยมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราโดยพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4 - 8 (Monreal และ Reese, 1969 ; Skujins และคณะ, 1970 ; Ohtakara และคณะ, 1979 ; Yabuki, 1986 ; Ohtakara, 1988 ; Rast และคณะ, 1991 ; Sherief และคณะ, 1991 ; Takayanagi และคณะ, 1991 ; Ulhoa และ Peberdy, 1991.) และมีแนวโนมว่าถ้าเพิ่มพีเอชสูงการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสจะลดลง (Wang และคณะ, 1995.)

4. ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยไคติน

เอนไซม์ไคตินเนสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่าง ๆ ได้มากมาย ดังนี้

Carroad และ Raymond (1978) ได้เสนอขั้นตอนการนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลคือ เปลือกกุ้ง และปู มาเปลี่ยนเป็นสารที่มีประโยชน์หรือมีราคาแพง ซึ่งเป็นวิธีการนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก การนำของเสียมาใช้ประโยชน์แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นที่ 1.</u> จะนำของเสียจากโรงงานมาผ่านกระบวนการ เตรียมโดยการทำให้แห้ง และบดให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาสกัดเอาไคตินออกโดยใช้กระบวนการทางเคมี ทำการสกัดโปรตีนออกด้วยการต้มกับด่าง และกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกโดยต้มกับกรดเกลือ (HCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 2. นำไคตินที่ได้ไปเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ปริมาณมาก จากนั้นกรองแยกเอนไซม์ออก

ขั้นที่ 3. นำเอนไซม์ที่ได้ย่อยไคตินที่เหลือจะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น NAG หรือ ไคโต-ไบโอส (dimer) กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกจากกากที่เหลือ นำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนสารต่าง ๆ เหล่านั้นให้เป็นของที่มีคุณค่า เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein) เป็นต้น

Cody และคณะ (1990) ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด จากนั้นนำมาทำการผลิตเอทานอล (Ethanol) จากกระบวนการหมักน้ำตาล และ น้ำตาลอะมิโน โดยใช้จุลินทรีย์ 4 ชนิด ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล คือ ***Hansenula anomala*** (ATCC 16763) , ***Pachysolen tannophilus*** (ATCC Y - 2460) , ***Saccharomyces cerevisiae*** (ATCC 7754) และ ***Zymononas mobils*** (ATCC 10988)

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถนำไปใช้ในการย่อยไคติน และได้ผลผลิตสุดท้าย คือ NAG ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับผลิตเอทานอล หรือ โปรตีนเซลล์เดียวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ย่อยไคตินที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืช (Sivan และ Chet , 1989) และกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูของพืช (Smith และ Grula, 1983) เช่น ***Beauveria bassiana*** ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น White fly colorado , Patato beatle และ Corn earworm (***Heliothis zea***) เป็นต้น รวมทั้งยังสามารถใช้ในการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อรา และการศึกษาทางเทคโนโลยีของรา (Smith และ Grula, 1983) ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยหรือสปอร์ของราเพื่อทำ โปรโตพลาสต์ฟิวชั่น (Protoplast fusion) ของรา เพราะเอนไซม์ไคติเนสเป็น ไมโคเลส (Mycolase) ที่มีบทบาทสำคัญในการเจริญและการแบ่งเซลล์ของรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3.

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

<u>อุปกรณ์และเครื่องมือ</u>

1. อุปกรณ์

(1) จานเพาะเชื้อ

(2) หลอดทดลองขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร

(3) ปิเปตต์ ขนาด 1.0 , 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร

(4) ฟลาสต์ขนาด 200 , 250 และ 500 มิลลิลิตร

(5) บีกเกอร์ขนาด 50 , 100 , 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

(6) กระบอกตวงขนาด 100 , 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

(7) ที่วางหลอดทดลอง

(8) เข็มเขี่ยเชื้อ

(9) ลูปเขี่ยเชื้อ

(10) หลอดเซนตริฟิวจ์

(11) หลอดหยด

(12) สายยาง

(13) Tip ขนาด 1 และ 0.2 มิลลิลิตร

2. เครื่องมือ

(1) เครื่องหมุนเหวี่ยง

(2) เครื่องชั่งละเอียด

(3) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

(4) ตู้เขี่ยเชื้อ

(5) ตู้บ่มเชื้อ

(6) ตู้อบลมร้อน

(7) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยระบบไฟฟ้า

(8) ไมโครปิเปตต์

(9) เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>สารเคมี</u>

(1) ไคตินของ Sigma

(2) กลูโคส

(3) กรดฟอสฟอริก

(4) แคลเซียมคลอไรด์

(5) คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทาไฮเดรท

(6) โซเดียมคาร์บอเนต

(7) โซเดียมคลอไรด์

(8) โซเดียมซัลเฟต

(9) โซเดียมไบคาร์บอเนต

(10) โซเดียม-โปแทสเซียมทาทาเรต

(11) โซเดียมไนเตรท

(12) โซเดียมอาร์ซิเนท

(13) โซเดียมไฮดรอกไซด์

(14) ซิงค์คลอไรด์

(15) เฟอริกซัลเฟต

(16) โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

(17) ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต

(18) แมกนีเซียมซัลเฟต

(19) แมงกานีสคลอไรด์

(20) ผงวุ้น

(21) ยีสต์สกัด

(22) อาหาร นิวเตรียน

(23) 0.1 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6)

(24) 0.5 M glucine-NaOH (พีเอช 11)

(25) ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide

(26) ρ -nitrophenol

(27) N-acetyl glucosamine

(28) แอมโมเนียมโมลิปเดท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากดิน

   1.1 นำตัวอย่างดินจากแหล่งต่าง ๆ 2 กรัม เติมลงในอาหารเหลว A-1 (ภาคผนวก ก.) ที่บรรจุอยู่ในฟลาสต์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า (Shaker) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

   1.2 นำตัวอย่างอาหารที่มีแบคทีเรียจากข้อ 1.1 มาทำความเจือจางให้อยู่ในช่วงระหว่าง 10^{-1} -10^{-8} เท่า จากนั้นนำเฉพาะความเจือจาง 10^{-6} - 10^{-8} เท่า มาทำการคัดเลือกเชื้อโดยวิธี Spread plate technique โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ ในอาหารแข็งสูตร A-2 (ภาคผนวก ข.) ที่เททับ 2 ชั้น ชั้นบนเติมไคติน 15 กรัมต่อลิตร ชั้นล่างไม่เติมไคติน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน เลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่มีโซนใสรอบ ๆ

   1.3 นำเชื้อจากข้อ 1.2 มาแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และบริสุทธิ์ โดยทำการลาก (Streak)บนอาหารแข็งสูตร A-2 จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ บันทึกสีของโคโลนี สีของแบคทีเรียแต่ละชนิด จากนั้นเก็บในอาหาร NA slant เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

   1.4 นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกให้บริสุทธิ์จากข้อ 1.3 มาคัดเลือกการผลิตเอนไซม์เบื้องต้น โดยการนำแบคทีเรีย อายุ 24 - 48 ชั่วโมง มาทำ point inoculation ในอาหารแข็ง A-2 โดยทำเชื้อละ 3 ซ้ำ นำอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันทำการวัดขนาดของโคโลนี และโซนใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ ในวันที่ 5 จากนั้นนำมาทำให้เชื้อที่ได้บริสุทธิ์ แล้วหาอัตราส่วนของโซนใส ต่อขนาดของโคโลนี ที่มากที่สุด 3 - 5 เชื้อ ไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

2.1 นำเชื้อที่คัดเลือกจากข้อ 1.4 อายุ 24 - 48 ชั่วโมง มาทำเป็นสารละลายเชื้อ โดยนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่ใน NA slant ที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่แล้ว ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขูดเชื้อให้หลุดจาก NA slant ขูดเบา ๆ ระวังอย่าให้มีอาหาร NA ติดออกมามากนัก นำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.5 เติมลงในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตเอนไซม์สูตร A-3 (ภาคผนวก ก.) โดยใส่เชื้อละ 2 มิลลิลิตรต่อฟลาสต์ ทำเชื้อละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 - 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ วัน สารละลายที่ได้นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์ไคโตไบเอส คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสูงสุดมา 1 เชื้อ เพื่อใช้ในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

2.2 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไคติน

ก. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

- นำตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มาเติมใน โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6) 1 มิลลิลิตรและสารละลายไคติน 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เมื่อครบตามเวลา แล้วจึงต้มอีก 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ไคตินตกตะกอน
- ดูดเอาส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ด้วยวิธี Alkaline copper sulfate โดยใช้สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ภาคผนวก ข.) ดังนี้

(1.) ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ใน รีเอเจนต์-4 1 มิลลิลิตร

(2.) ทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3.) เติม รีเอเจนต์-3 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าจนกระทั่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หมดแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที

(4.) เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสไว้ศึกษาต่อไป

ข. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอส

- นำ สารละลายของ ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (NPGlu ที่ละลายในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6)) 1.8 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างของเอนไซม์ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.5 M Glycine-NaOH ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- วัด ρ -nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากสับสเตรทโดยวัดที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
- Bank ทำโดยเติมน้ำกลั่นแทน เอนไซม์ แล้วทำเหมือนวิธีข้างต้น
- Control เติมตัวอย่างของเอนไซม์ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 M Glycine-NaOH ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตรก่อน (เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์) จากนั้นจึงเติมสับสเตรท

นำไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ แล้วจึงคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสไว้ศึกษาต่อไป

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

ก. ความเข้มข้นของไคติน

นำเชื้อจากข้อ 2.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว A-3 โดยใช้ความเข้มข้นของไคตินต่าง ๆ กัน คือ 0.0 , 0.5 ,1.0 , 2.0 , 3.0 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำตามวิธีข้อ 2.1 ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จากนั้นตรวจหากิจกรรมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ย่อยไคติน ทุก ๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกความเข้มข้นของไคตินที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดไว้ศึกษาต่อไป

ข. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน (Organic nitrogen) คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของเปปโตน
2. สารอนินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน (Inorganic nitrogen) คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของ แอมโมเนียซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$, แอมโมเนียคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3), โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

นำเชื้อจากข้อ ก. มาเลี้ยงในอาหาร A-3 ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น สารอินทรีย์และ สารอนินทรีย์ ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำตามวิธีข้อ2.1 ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จากนั้นตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไคตินทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดไว้ศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4.
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารแข็ง A - 2 ที่มีโซนใสรอบ ๆ มาทำให้บริสุทธิ์ ได้จำนวน 50 เชื้อโดยดูอัตราส่วนระหว่าง โซนใส ต่อโคโลนี ดังแสดงในตารางที่ 1. จากเชื้อทั้งหมดพบว่า แบคทีเรียรหัส 1A-5 , 1A-9 , 1B-2 , 3A-2 , 2B-1 ให้อัตราส่วนโซนใสต่อโคโลนีสูงสุด คือ 5.3 , 5 , 4 , 3.8 , 2.83 ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 5 เชื้อ มาศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง A-2 ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 1. แสดงอัตราส่วน โซนใสต่อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลาง โซนใส	เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี	อัตราส่วน โซนใส : โคโลนี
1A-1	0.8	0.3	2.67
1A-2	0.5	0.4	1.25
1A-3	0.1	0.1	1
1A-4	0.5	0.5	1
1A-5	4.2	0.8	5.3
1A-6	1.2	0.7	1.7
1A-7	2.2	1.1	2
1A-8	3.8	1.8	2.1
1A-9	2	0.4	5
1A-10	0.4	0.3	1.3
1A-11	1.3	0.9	1.44
2A-1	0.8	0.7	1.14
2A-2	0.6	0.6	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30613

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี	อัตราส่วนโซนใส : โคโลนี
2A-3	0.35	0.35	1
2A-4	0.5	0.5	1
2A-5	0.7	0.6	1.17
2A-6	0.7	0.5	1.4
2A-7	0.9	0.8	1.13
2A-8	0.8	0.65	1.23
2A-9	0.8	0.8	1
2A-10	0.6	0.6	1
2A-11	3.7	1.3	2.85
2A-12	0.9	0.8	1.13
2A-13	0.7	0.7	1
1B-1	0.6	0.6	1
1B-2	2.8	0.7	4
1B-3	1	0.9	1.1
1B-4	2.3	0.8	2.87
3A-1	0.5	0.45	1.1
3A-2	3	0.8	3.75
3A-3	1.5	0.6	2.5
3A-4	1	0.7	1.43
3A-5	0.4	0.4	1
3A-6	0.4	0.2	2
3A-7	1.8	1.5	1.29
3A-8	0.3	0.3	1
3A-9	0.8	0.8	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย	เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี	อัตราส่วนโซนใส : โคโลนี
3A-10	0.8	0.5	1.6
3A-11	0.5	0.4	1.25
3A-12	1.8	0.8	2.25
3A-13	1.2	1.2	1
3A-14	0.5	0.5	1
3A-15	0.6	0.6	1
3A-16	1.9	1	1.9
2B-1	0.85	0.3	2.83
2B-2	0.4	0.4	1
2B-3	0.5	0.3	1.67
2B-4	4.1	1.4	2.93
2B-5	2	1.9	1.05
2B-6	1	0.8	1.25
2B-8	1.6	1.2	1.3

ตารางที่ 2. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่ให้สัดส่วน โซนใสต่อโคโลนีสูงสุด

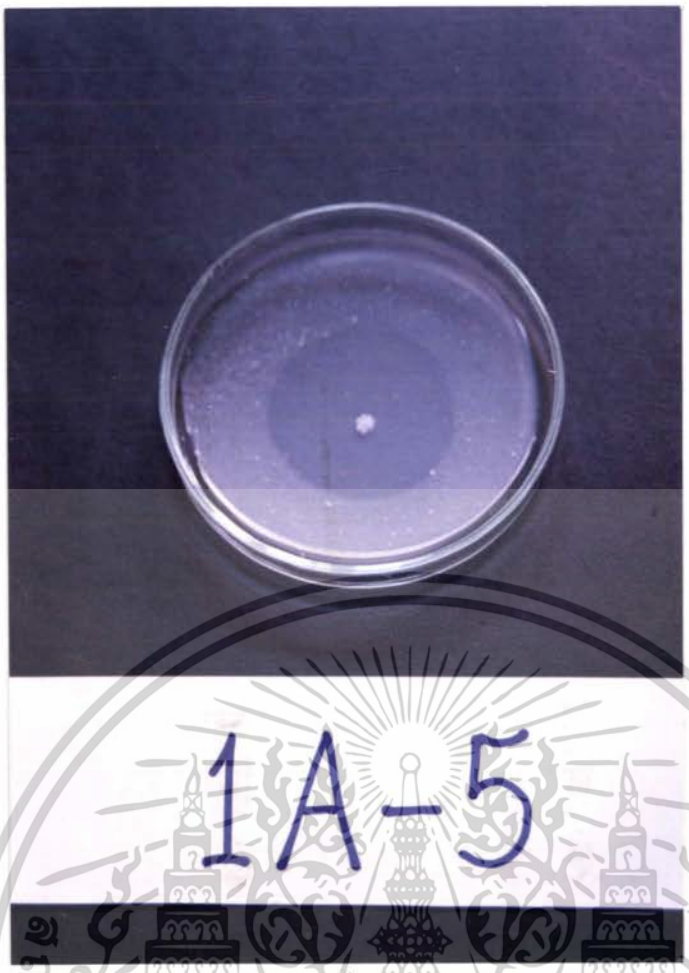
แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี
1A-5	แบคทีเรีย , สีเหลืองผิวมันวาว ขอบเรียบ
1A-9	แบคทีเรีย , สีแดงปนส้มผิวมันวาวขอบเรียบ
1B-2	แอคติโนมัยสิท , สีขาวฟู ขอบหยัก
3A-2	แอคติโนมัยสิท , สีชมพูอมขาวฟู ขอบหยัก
2B-1	แบคทีเรีย , สีเหลืองผิวมันวาว ขอบหยัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

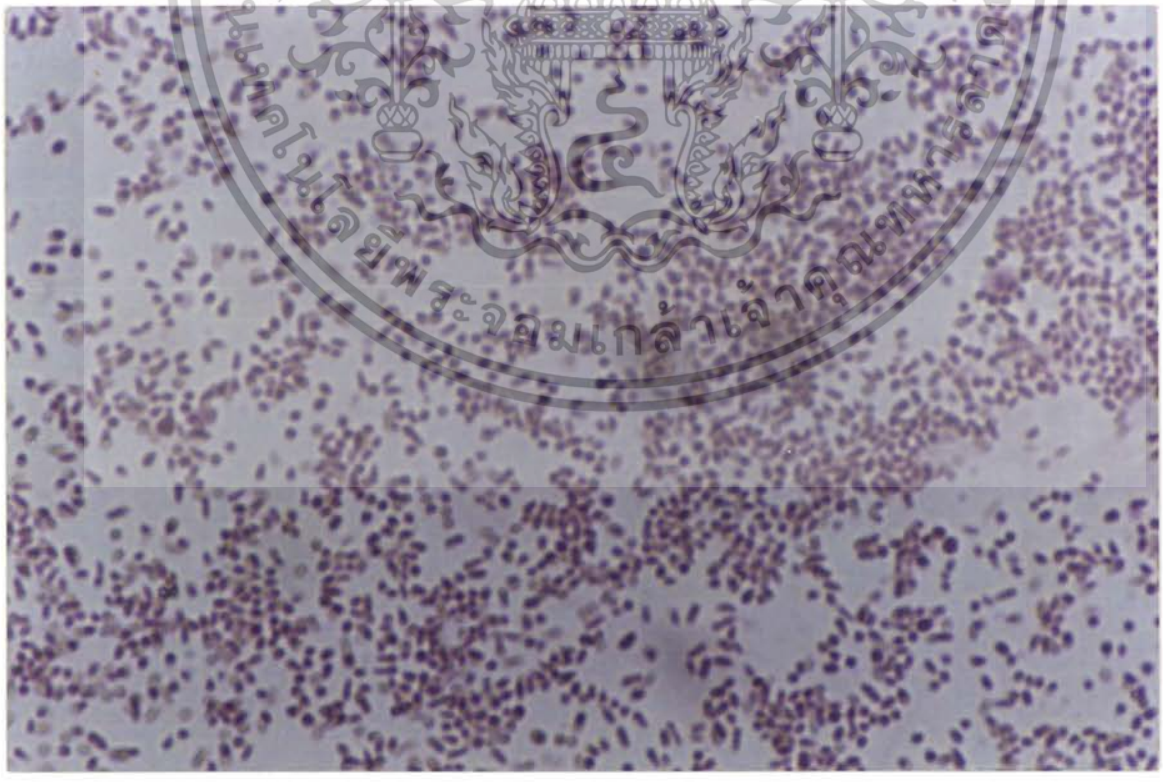
จากนั้นเลือกเอาเชื้อแบคทีเรียรหัส 1A-5 ไปศึกษาในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน เนื่องจากว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหารแข็ง A-2 แล้วพบว่า มีอัตราส่วนโซนใสต่อโคโลนีสูงสุดและเกิดโซนใสได้เร็วเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง A-2 เพียง 1-2 วันเท่านั้น มาทำให้บริสุทธิ์ ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียรหัส 1A-5 ดังแสดงในรูปที่ 1. และรูปที่ 2. แล้วทำการย้อมแกรมพบว่าเป็น แบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเป็นท่อน ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.

รูปที่ 1. แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 ในอาหาร NA Slant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 ในอาหารแข็ง A-2



รูปที่ 3. แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

เมื่อนำเชื้อ 1 A-5 มาเลี้ยงในอาหารทดสอบเอนไซม์ย่อยไคติน (A-3) เป็นเวลา 5 วันแล้วหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสพบว่า ในช่วงวันที่ 1 หลังจากลงเชื้อในอาหารแล้วจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด คือ 6.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดคือ 4.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พีเอชเป็น 6.8 และในวันต่อ ๆ มา ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 5 แทบจะกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเลย ในขณะที่พีเอชจะค่อย ๆ สูงขึ้น ถึง 9 ในวันที่ 5 อีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4. ต่อมาจากนั้นจึงนำไปศึกษาหาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบ-เอสในอาหารเหลว A-3 เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคตินและแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน

3.การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสของเชื้อ 1A-5 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว A -3

3.1 ความเข้มข้นของไคติน

ผลของความเข้มข้นของไคตินต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโต-ไบเอสของเชื้อ 1A-5 ที่ความเข้มข้นของปริมาณไคติน 0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 5. และรูปที่ 6.) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของไคตินเท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นนี้เชื้อ 1A-5 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 7.96 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสเท่ากับ 8.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง และมีพีเอชเท่ากับ 6.6 ดังนั้นความเข้มข้นของไคตินที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสคือ 1.0 เปอร์เซ็นต์หลังจากเลี้ยงเชื้อไว้ 24 ชั่งโมง

3.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์ไคโตไบเอสของเชื้อ 1A-5 เมื่อใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

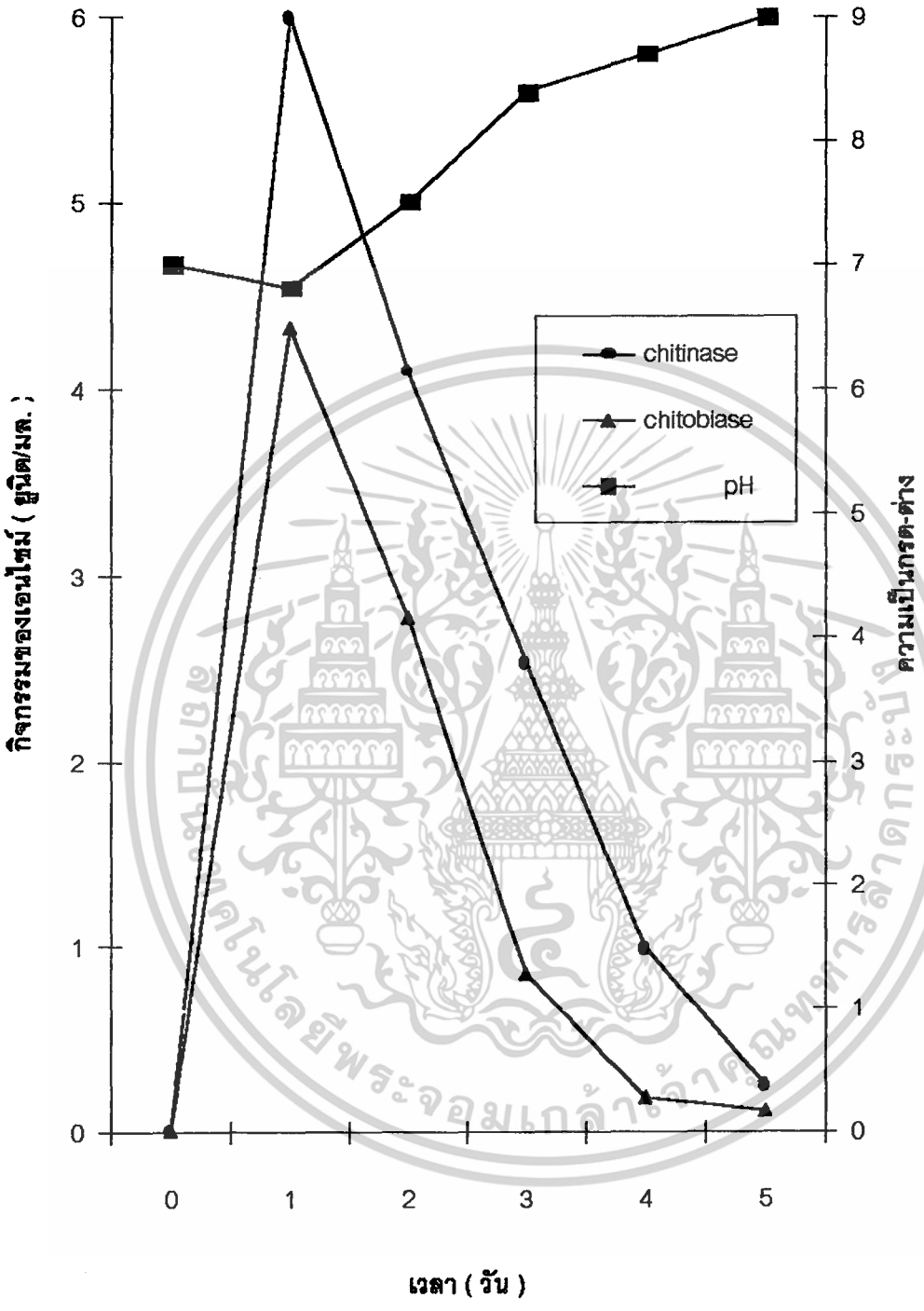
เทียบกับ แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ ที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต , แอมโมเนียม - คลอไรด์ , แอมโมเนียมไนเตรท , โซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมดพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนดีที่สุด แต่เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นพวกสารอนินทรีย์ แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพไม่ดีนักเมื่อเทียบกับการใช้ เปปโตน (รูปที่ 7. และรูปที่ 8.) โดยจะพบว่าค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโต-ไบเอสหลังจากเลี้ยงเชื้อไว้นาน 24 ชั่วโมง เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น เปปโตนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส เท่ากับ 7.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอน-ไซม์ไคโตไบเอส เท่ากับ 4.82 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีพีเอชเท่ากับ 7.5 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสรองลงมาคือ แอมโมเนียม ซัลเฟต โดยจะให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.056 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแหล่งไตโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสรองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรท โดยจะให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสของเชื้อ 1A-5 คือ เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสได้ปริมาณสูงโดยมีสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ ไคตินความเข้ม-ข้น 1 เปอร์เซ็นต์ , เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ , กลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ , ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ , โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสูตรอาหารมีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ไนโตรเจนพอเพียงให้เชื้อแบคทีเรีย 1A-5 ใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี ประกอบกับเมื่อมีไคติน และเปปโตนความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 แล้ว ยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุ และ วิตามินต่าง ๆ ที่จะส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญได้เร็ว เร่งการผลิตเอนไซม์ จึงทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงภายใน 24 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Woo และคณะ (1996) เมื่อเลี้ยงเชื้อ ***Bacillus* sp.** สายพันธุ์ WY 22 ที่ใช้ ไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ และ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

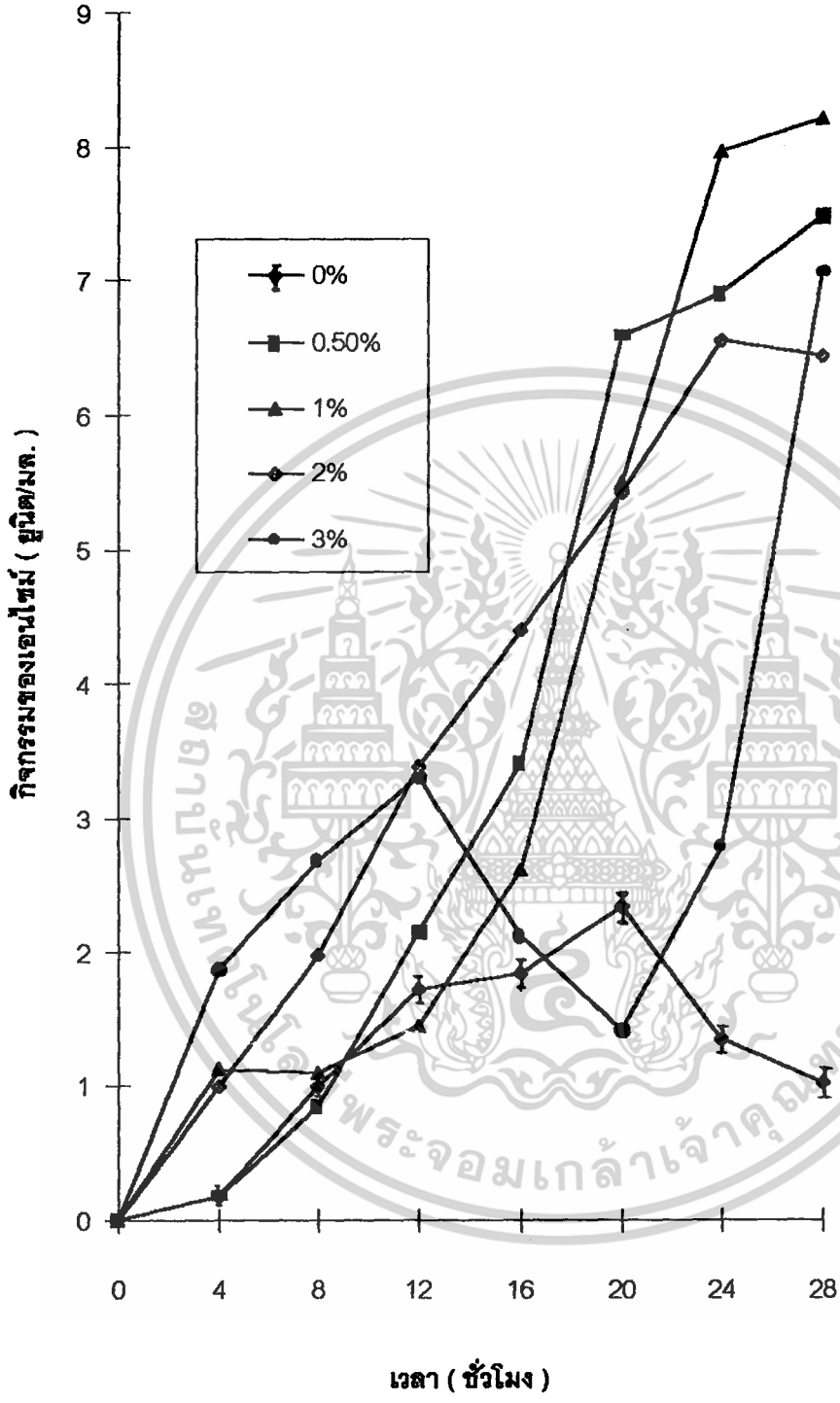
นอกจากนี้จากการทดลองจะเห็นได้ว่าพีเอชของอาหารเหลว A-3 หลังจากการลงเชื้อแบคทีเรีย 1A-5 จะมีค่าพีเอชสูงขึ้น และเมื่อพีเอชของอาหารสูงขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างก็มีค่าปรับตัวลดลง สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Wang และคณะ (1995) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* K-187 ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็น ผงเปลือกกุ้งและกระดองปู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



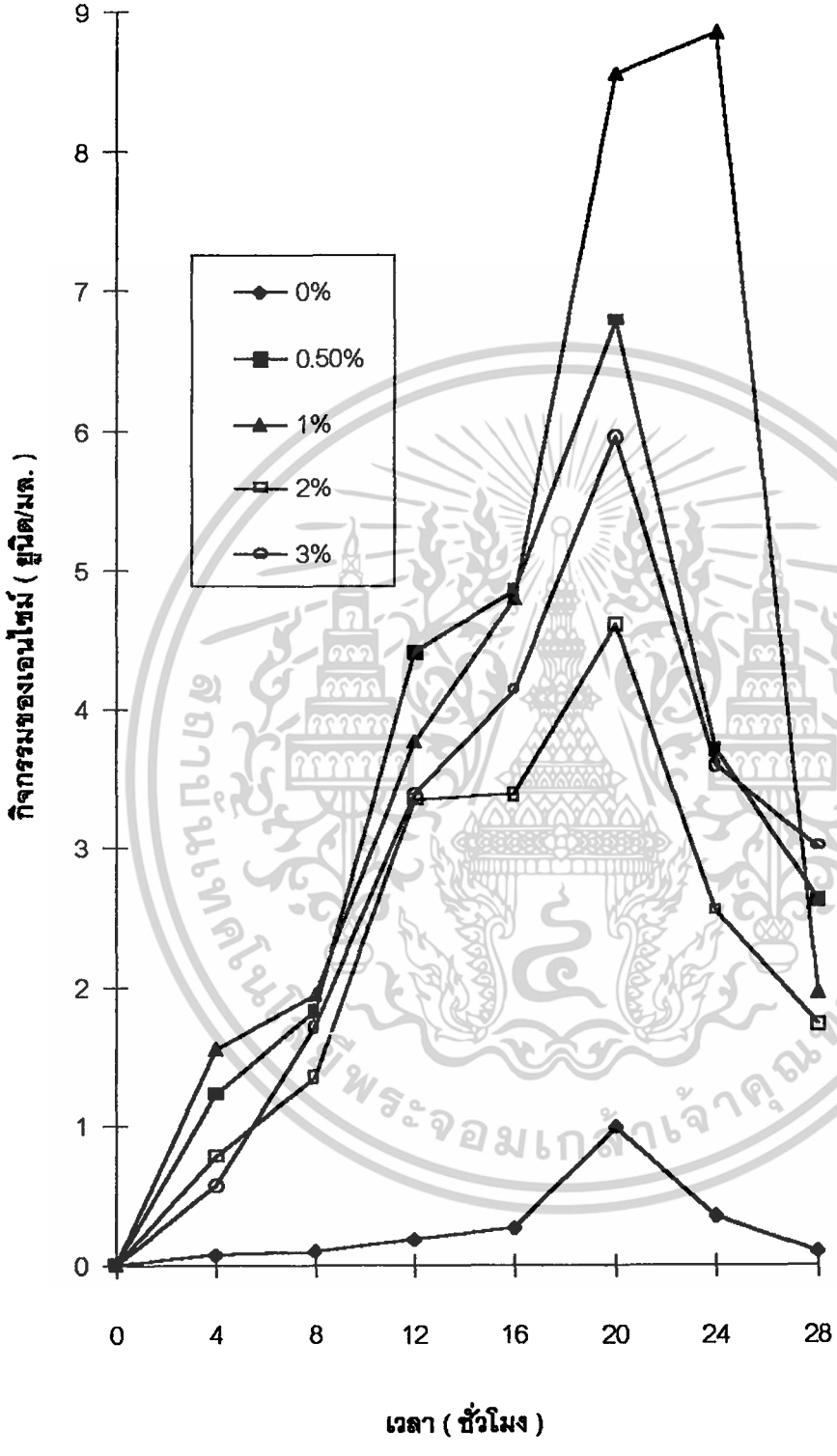
รูปที่ 4. กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสในเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



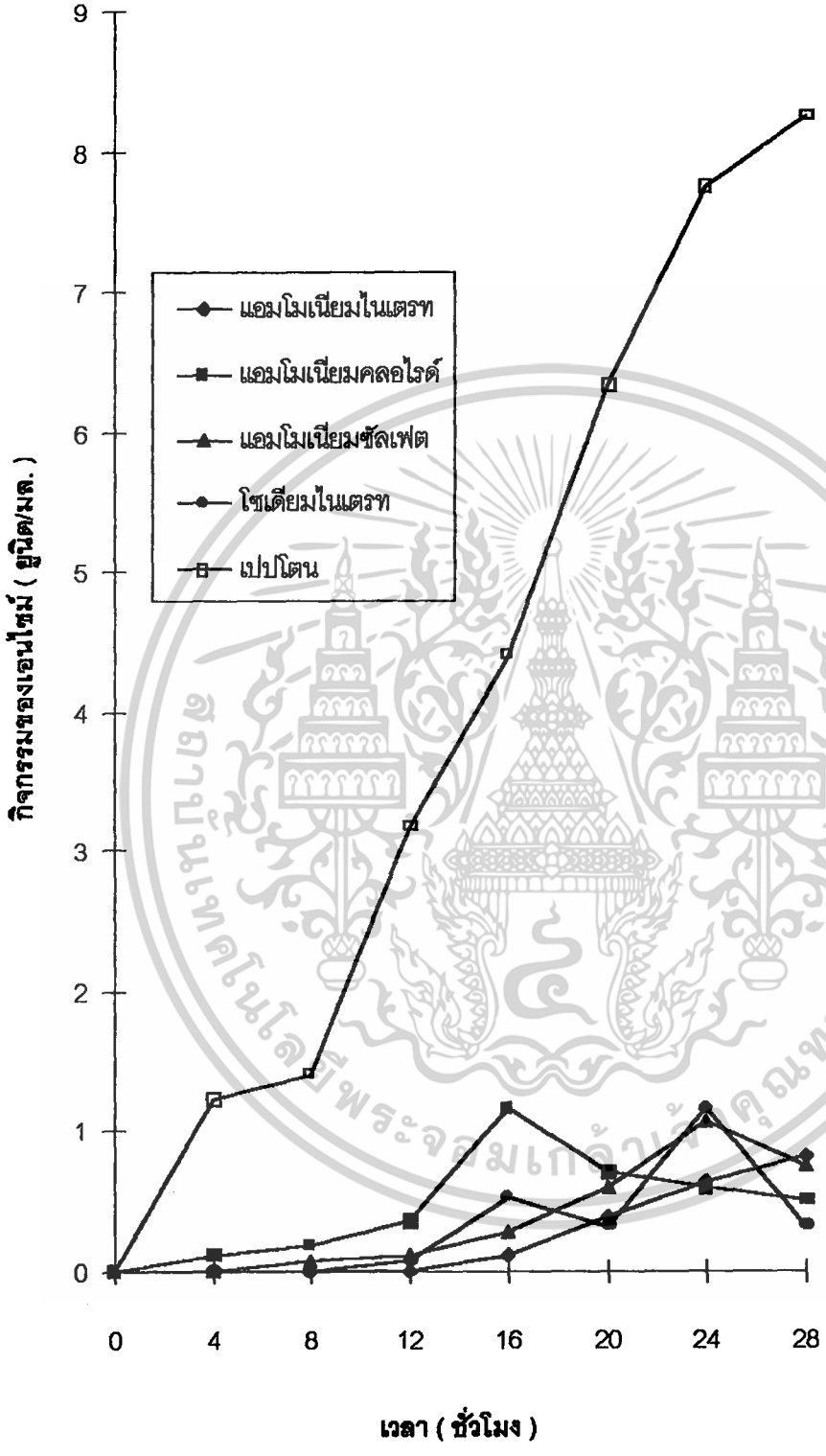
รูปที่ 5. กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นของไคตินต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



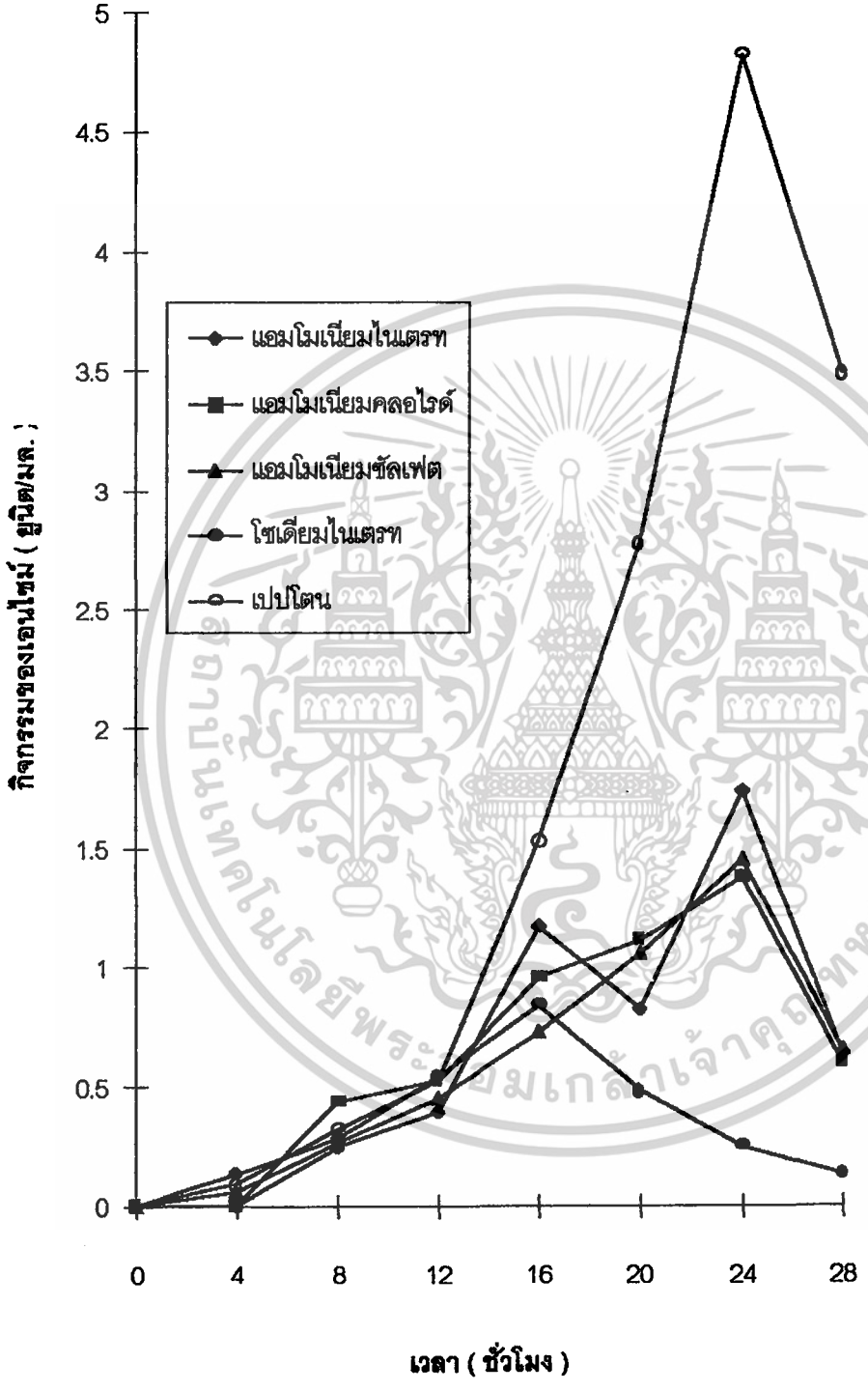
รูปที่ 6. กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสที่ความเข้มข้นของไคตินต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7. กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสที่แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5.
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากดินในบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่ามีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไคตินที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อในอาหารแข็ง A-2 จะเห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 1A-5 สามารถให้อัตราส่วน โซนใส ต่อ โคโลนีสูงสุดถึง 5.3 และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ในอาหารทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลายเชื้อ 0.5 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเข้มข้นของไคติน และแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ใช้ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ที่พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียสหลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเป็นคอลลอยย์เล็ก ๆ สีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ A-3 ทำการเก็บตัวอย่างอาหารทุก ๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และเมื่อนำอาหารไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอสของเชื้อ 1A-5 คือ แหล่งคาร์บอนใช้ความเข้มข้นของไคติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 7.958 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสเท่ากับ 8.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้เชื้อจะให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและกิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุด (7.746 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 4.824 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) เมื่อใช้ เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินโดยประกอบด้วย ไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ , เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ,กลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ , ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ , โปแตสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ , โซเดียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาอื่น ๆ ที่มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินของเชื้อ 1A-5 ในสภาวะอาหารเหลว A-3 ที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มมากขึ้น เช่น ความแตกต่างของอุณหภูมิ , ปริมาณเชื้อเริ่มต้น , ความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง , การใช้ประโยชน์จากไคติน **สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิต-ภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** (2529)

ธีระพล ประมวล , อุตสาหกรรมผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง **ว. อุตสาหรรมสาร** , (2534)7 -12 .

อุดมชัย จินะดิษฐ์ , ผลิตภัณฑ์จากเปลือกกุ้งกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. **วารสาร สสท. ฉบับเทคโนโลยี** , 19(104) (2534) 50 -54.

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

Beyer , M. and H. Diekmann. , The chitinase system of ***Streptomyces*** **sp. ATTCC 11238** and its significance for fungal cell wall degradation. **Appl. Microb. Biotech.**, 23 (1985) 140 - 146.

Carroad. P.A. and R. A. Tom. , Bioconversion of Shellfish chitin wastes : Process conception and selection of microorganisms. **J. Food Sci.**, 43(1978)1158-1161

Cody , R. M. , N. D. David , J. Lin and D. Shaw. , Screening microorganism for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugar. **Biomass.** , 21 (1990) 285 - 295.

Deshpande , M. V. , Enzymatic degradation of chitin and its biological application. **J. Sci. Ind. Res.** , 45 (1986) 273 - 281.

Elango , N. , J. U. Correa and E. Cabib. , Secretory mature of yeast chitinase. **J. Biol. Chem.** , 257 (1982) 1398 - 1400.

Frandberg , E. and J. Schnurer. , Chitinolytic propertion of ***Bacillus pabuli*** K1. **J. Appl. Bacteriol.** , 76 (1994) 361 - 367.

Jeuniaux , C. , Chitinase. **Method Enzymol.** ,8 (1966) 645 - 650.

Korr , D. , Use of chitinous polymers in food. **Food technol.** , 38 (1984) 85 - 97.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mahadeven Brinda and D. L. Crawford. , Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent ***Streptomyces ludicus*** WYEC108. **Enzyme Microb. Technol.** , 20 (1997) 489-4963.

Monreal , J. and E. T. Reese. , The chitinase of ***Serratia marcescens***. **Can. J. Microb.** , 15 (1969) 689 - 694.

Muzzarelli , R. A. A. , Chitin. **Pergamon Press. New York.** , (1977) 55 - 181.

Ohtakara , A. , The last biomass : Chitin , Chitosan , Gihoudou press . **Tokyo , Japan.** , (1988)

Ohtakara , A. , M. Mitsutami nad Y. Uchida. , Purification and some properties of chitimase from ***Vibrio*** **sp. J. Fermentation Technol.** , 57 (1979) 169 -173.

Peberdy , J. F. , Fungal cell walls. **A review. In biochemistry of walls and membrance in fungi . , (1990)** 5 - 30.

Rast , D. M. , M. Horsch , R. furter and G. W. Gooday. , Acomplex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of ***Mucor rouxii*** : Properties and function. **J. Gen. Microb.** , 137 (1991) 2797 - 2810.

Roberts , R. L. and E. Cabib. , ***Serratia marcescens*** chitinase : One-step purification and use for the determination of chitin. **Anal. Biochem.** , 127 (1982) 402 - 412.

San Lang Wang, Wun-Tsu Chang and Ming Chou Lu. , Production of Chitinase by ***Pseudomonas aeruginosa*** K-187 Using Shrimp and Crrub Shell Powder as a Carbon Source. **Proceeding of The National Science Council. ROC part B: Life Sciences.** , 19 (1995) 105-112.

Sherief, A.A. , M. A. A. EI-Sawah , and M. A. Abd EI- Naby. , Some properties of chitinase produced by a potent ***Aspergillus carneus*** strain. **Appl. Microb. Biotech.** , 35 (1991) 228-230.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sivan , A. and I. Chet. , Degradation of fungi cell walls by lytic enzyme of ***Trichoderma harziamum*. J. Gen. Microb.** , 135 (1989) 675 - 682.

Skujins , J. J. , A. Pukits. and McLaren. , **Enzymologia .** ,39 (1970) 353 - 370.

Smith , R. J. and E. A. Grula. , Chitinase is an inducible enzyme in ***Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol.** , 42 (1983) 319 - 329.

Tanaka , H. , N. Ogasawara , T. Nakajima and K. Tamari. , Cell walls of ***Piricularia oryzae*** , I. Selective enzymolysis of ***Piricularia oryzae*** walls by wall-lytic enzymes of ***Bacillus circulans*** WL-12. **J. of General and Applied Microb.** , 16 (1970) 39 - 60.

Ueda , M. and M. Arai. , Purification and some properties of chitinase from ***Aeromonas* sp.** No. 10S-24. **Biosci. Biotech. Biochem.** , 56 (3) (1992) 460 -464.

Ueno , H. , K. Miyashita , Y. Sawada and Y. Oba. , Purification and some properies of extra cellular chitinase from ***Streptomyces* sp.** S-84. **J. Gen. Appl. Microb.**, 36 (1990) 377 - 392.

Ulhoa , C. J. and J. F. Peberdy. , Regulation of chitinase. Systhesis in ***Trichoderma harziamum*. J. Gen. Microb.** , 137 (1991) 2163 - 2169.

Vyas , P. and M. V. Deshpande. , Chitinase production by ***Myrothecium verrucaria*** and its. Significance for fungal mycelia degradation. **J. Gen. Appl. Microb.** , 35(1989) 343 - 350.

Woo , Cheol-Joo , Un-Jung Yon ,and Heni-Dong Park. , Isolation of Chitin- Utilizing Bacterium and Production of Its Extracellular Chitinase. **J. Microbiol.** , 2 (1996) 439-444.

Yabuki , M. , K. Mizushina , T. Amatatsu , A. Ando , T. Fujii , M. Shimada and M. Yamashita. , Purification and Characterization of chitinase and chitobiase produced by ***Aeromonas hydrophila*** subsp. ***Anaerogenus*** A52. **J. Gen. Appl. Microb.** , 32 (1986) 25 -38.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียม Colliodal Chitin

- นำผงไคตินมาชั่ง 10 กรัม ผสมกับกรดฟอสฟอริก 90 กรัม ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.
- นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำตะกอนไคตินที่ได้จากการย่อยสลายมาล้างด้วยน้ำกรองที่ปราศจากอิออน 2-3 ครั้ง
- ทำการปรับ พีเอชด้วย 20เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้พีเอช 7
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง
- นำตะกอนที่ได้เก็บไว้ในขวด ดูแรน ขนาด 250 มล. ทิ้งส่วนใสออกไป
- นำไปแช่แข็งในตู้เย็น ตะกอนที่ได้นี้จะเรียกว่า ไคตินของSigma หรือ Swallen Chitin

2. อาหารเหลวไคติน (A-1) โดยใช้ดัดแปลงอาหารจากวิธีของ Woo และคณะ(1996) ประกอบด้วย

Chitin	30.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.7	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.3	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.4	กรัมต่อลิตร
$NaNO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
น้ำ	1	ลิตร

พีเอช 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.อาหารแข็งไคติน (A-2) โดยใช้ดัดแปลงอาหารจากวิธีของ Woo และคณะ (1996) ประกอบด้วย

ชั้นแรก	KH_2PO_4	0.7	กรัมต่อลิตร
	K_2HPO_4	0.3	กรัมต่อลิตร
	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
	NaCl	0.4	กรัมต่อลิตร
	$NaNO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
	วุ้น	15	กรัมต่อลิตร
	น้ำ	1	ลิตร
	พีเอช 7		
ชั้นที่สอง	Chitin	15	กรัมต่อลิตร
	KH_2PO_4	0.7	กรัมต่อลิตร
	K_2HPO_4	0.3	กรัมต่อลิตร
	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
	NaCl	0.4	กรัมต่อลิตร
	$NaNO_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
	วุ้น	15	กรัมต่อลิตร
	น้ำ	1	ลิตร
	พีเอช 7		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อาหารทดสอบเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอส (A-3) โดยใช้ดัดแปลงอาหารจากวิธีของYabuki และคณะ (1986)ประกอบด้วย

Chitin	20.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	2.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yest extract	5.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	1.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
น้ำ	1	ลิตร

พีเอช 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมี

1. สารละลายไคติน 0.7 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง ไคติน 0.7 กรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช ๕ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในที่เย็น

2. สารละลายมาตรฐาน N-acetyl glucosamine (NAG) เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง NAG 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

3. สารละลายมาตรฐาน ρ-nitrophenol เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง ρ--nitrophenol 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่เย็น

4. สารละลาย ρ-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (NPGlu)

ชั่ง NPGlu 0.3423 กรัมละลายในโซเดียม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็งเวลานำมาใช้ทำการดูดสารละลาย NPGlu ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช6 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร

5. 0.5M glycine-NaOH (พีเอช 11)

ชั่ง ไกลซีน หนัก 3.7525 กรัมมาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารทั้งสองชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน ไกลซีน 50 มิลลิลิตร ต่อ โซเดียมไฮดรอก-ไซด์ 48 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาณให้เป็น 100มิลลิลิตร

6. 0.1M โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ชั่ง $Na_2HPO_4.12H_2O$ 7.17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมในอัตราส่วนระหว่าง $NaH_2PO_4.2H_2O$ ต่อ $Na_2HPO_4.12H_2O$

เท่ากับ 87.7 มิลลิลิตร ต่อ 12.3 มิลลิลิตร

แล้วปรับปริมาณแป็น 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. สารเคมีของวิธี Alkaline copper sulfate ที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

รีเอเจนต์-1

โซเดียมคาร์บอเนต(ปราศจากน้ำ) 25 กรัม ผสมกับ โซเดียม-โปแตสเซียม ทาร์เรต 25 กรัม กับ โซเดียมไบคาร์บอเนต 20 กรัม และ โซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) 200 กรัม ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

รีเอเจนต์-2

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท 30 กรัมละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วหยด กรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 4 หยด

รีเอเจนต์-3

แอมโมเนียม โมลิปเดรท 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม กรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปอีก 21 มิลลิลิตร จากนั้น ละลาย โซเดียมอาร์ซีเนต 3 กรัมใน น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรล้วจึงค่อยเติมสารละลาย โซเดียมอาร์ซีเนต ลงใน สารละลาย แอมโมเนียมโมลิปเดรท ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาในที่เย็น

รีเอเจนต์-4

ผสม รีเอเจนต์-2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน รีเอเจนต์-1 ปริมาณ 25 มิลลิลิตร เตรียมไว้ก่อนทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมของไคติเนส

1. เตรียม Strock solution ของ NAG ให้มีความเข้มข้น 100 , 200 , 400 , 600 , 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1. มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์พีเอช 6 1 มิลลิลลิตรและน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
3. นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Alkaline copper sulfate ดังนี้ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (วิธีการทดลองหน้า 13.)
4. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรแล้วนำมาเขียนได้กราฟเส้นตรงความชันเท่ากับ 0.00142

การคำนวณค่ากิจกรรมไคติเนสคำนวณจากสูตร

ยูนิต/มิลลิลิตร = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงxจำนวนเท่าของการเจือจางxปริมาตรสาร}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานxระยะเวลาในการบ่ม}}$

$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x 1 x 3}}{0.00142 \times 60}$

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หากิจกรรมของไคโตไบเอส

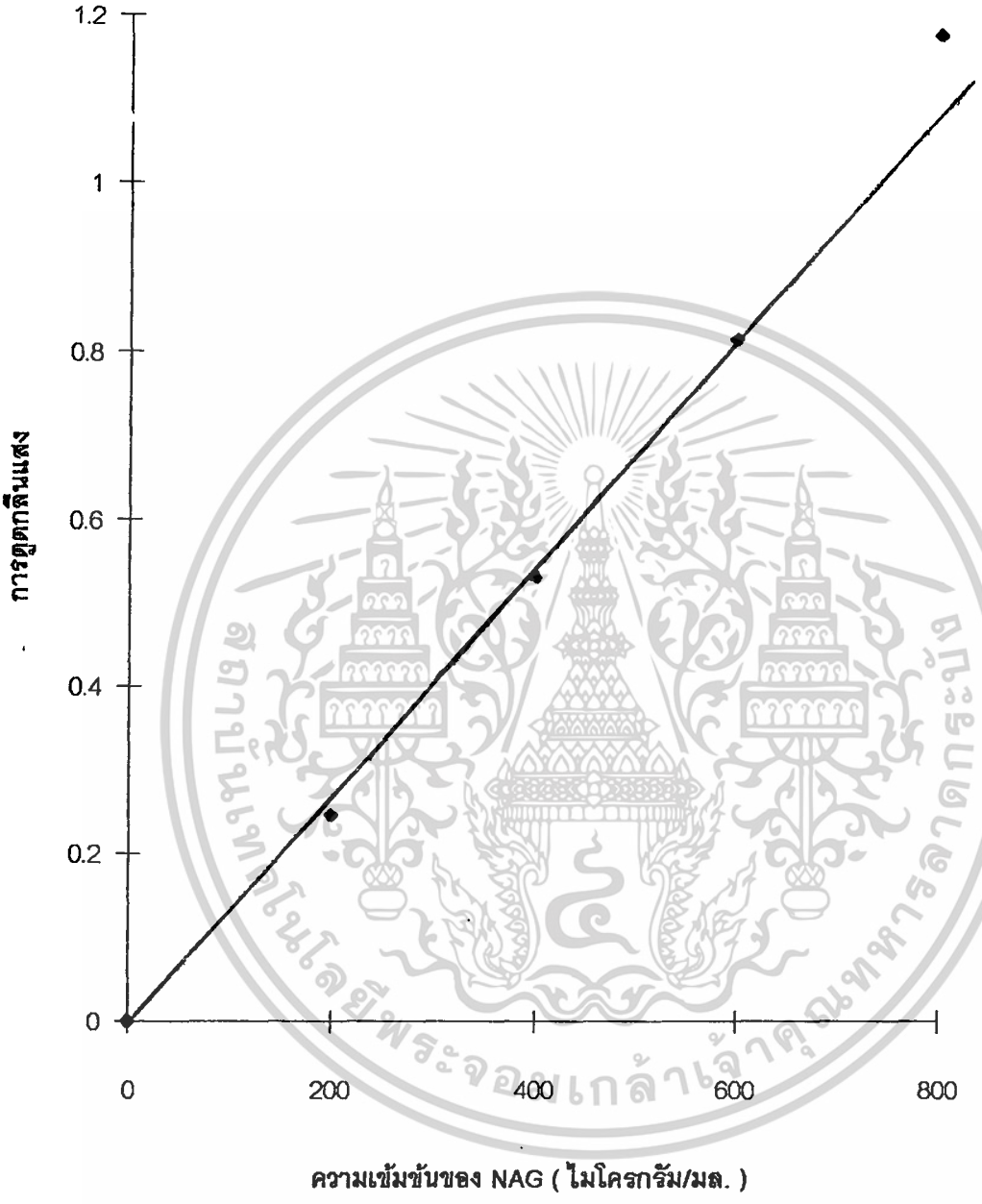
1. เตรียม Stock solution ของ ρ-nitrophenol ให้มีความเข้มข้นเป็น 10 , 20 , 30 , 40 , 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เติม 0.5 M glycine- NaOH ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตรแล้วนำมาเขียนกราฟได้ความชันเท่ากับ 0.0344

การคำนวณค่ากิจกรรมไคโตไบเอสคำนวณจากสูตร

ยูนิต/มิลลิลิตร = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงxจำนวนเท่าของการเจือจางxปริมาตรสาร}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานxระยะเวลาในการบ่ม}}$

$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x 5 x 3.8}}{0.344 \times 30}$

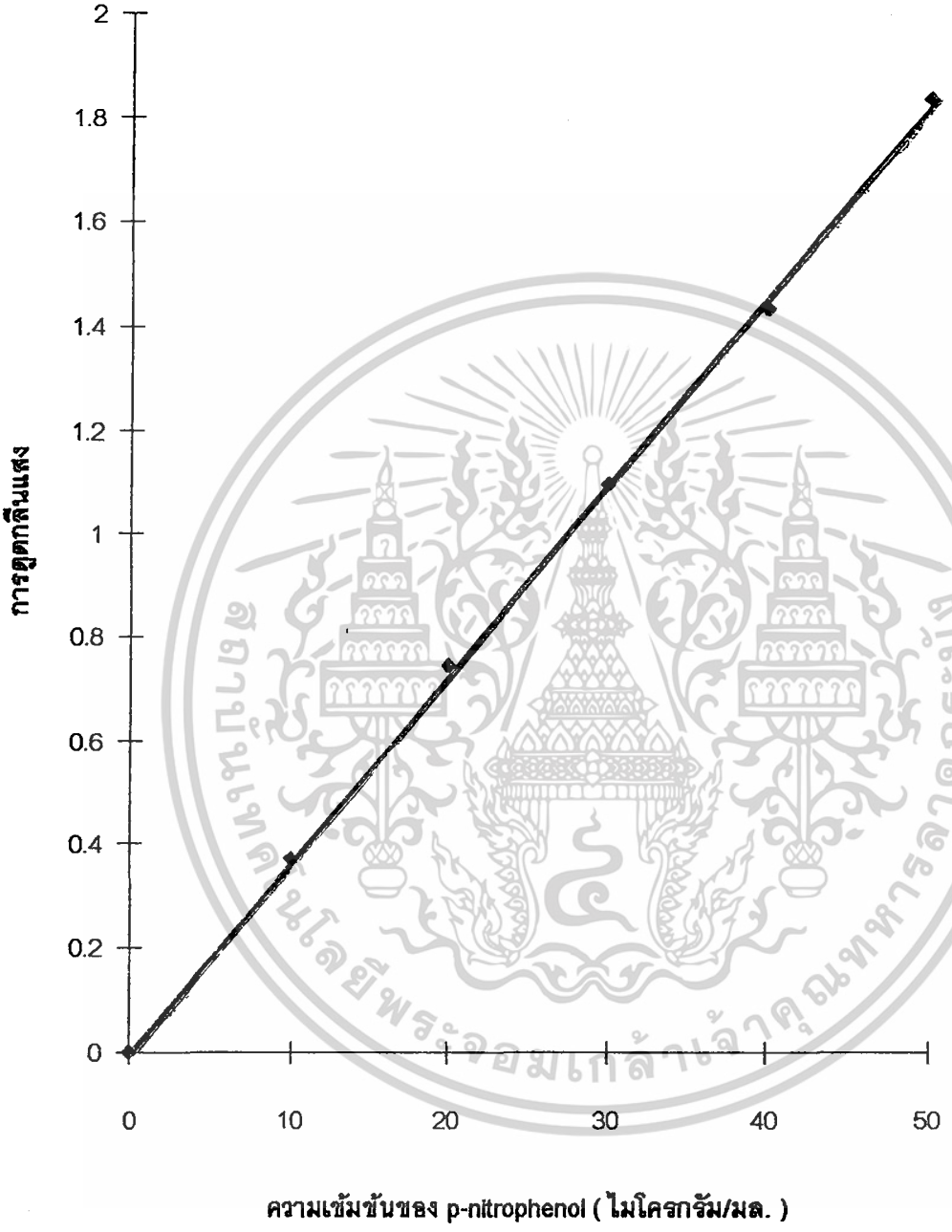
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9. กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

$$\text{Slope} = \frac{0.529 - 0.246}{400 - 200} = 0.00142$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคโตไบเอส

$$\text{Slope} = \frac{1.434 - 0.747}{40 - 20} = 0.0344$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้