สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการย่อยสลายไคตินด้วย Resting cell

นาย ถนอมพงษ์ เพียรพานิชย์
นางสาว ธีราพร วังแก้ว
นางสาว นพเกล้า แกล้วกล้า

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43961
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

b.....
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study of biodegradation of chitin by resting cell

Mr. Thanompong Pienpanich
Miss. Theeraporn wongkaew
Miss. Nopprakloa klaewkla

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Science
Faculty of science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการย่อยไคตินด้วย resting cell

โดย นายถนอมพงษ์ เพียรพานิชย์

นางสาวธีราพร วังแก้ว

นางสาวนพเกล้า แกล้วกล้า

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชา

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

_____ กรรมการ

(ดร. สมชาย ไกรรักษ์)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการย่อยไคตินด้วย resting cell
โดย นายถนอมพงษ์ เพียรพานิชย์
นางสาวธีราพร วังแก้ว
นางสาวนพเกล้า แกล้วกล้า
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สมชาย ไกรรักษ์
ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์รหัส 13 18 และ 19 คัดเลือกจากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานกุ้งแช่แข็ง ซึ่งสามารถเจริญในอาหารประกอบด้วยไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำมาทดสอบการเจริญและการใช้ไคตินในอาหารเหลว chitin medium ซึ่งประกอบด้วย ไคติน แอมโมเนียมไนเตรท และยีสต์สกัด 1.0 1.0 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 4-7 เป็นเวลา 7 วัน พบว่าจุลินทรีย์รหัส 19 และ 18 ย่อยสลายได้ดี (23.47 และ 23.09 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียม resting cell โดยวิธีการแช่แข็งและการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (20 KHz) ผลการทดลองพบว่า resting cell ของจุลินทรีย์รหัส 18 เตรียมได้โดยการแช่แข็งแล้วทำให้ละลายสลับกันจำนวน 7 ครั้ง หรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงระดับความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ (45วินาที) ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ (15 วินาที) ซึ่งให้ผลการย่อยไคติน 31.06 25.09 25.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับจุลินทรีย์รหัส 19 สามารถเตรียมเป็น resting cell ได้โดยการแช่แข็งแล้วทำให้ละลายสลับกันจำนวน 8 ครั้ง หรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงระดับความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ (70วินาที) และความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ (40วินาที) ซึ่งให้ผลการย่อยไคติน 24.78 25.31 และ 24.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title	Study of biodegradation of chitin by resting cell
Student	Mr. Thanompong Pienpanich
	Miss. Theeraporn Wongkaew
	Miss. Nopaklao Klaewkla
Department	Applied Biology
Special Project Advisor	Mr. Somchai Krairak
Academic Year	2001

abstract

Isolates 13 18 and 19 , chitinolytic microorganisms , were selected and purified from soil samples around the frozen shrimp manufacturing. These isolates showed the high potential for chitin utilization as C-source. Growth and chitin utilization were determined in chitin broth , composed of chitin NH_4NO and yeast extract as 1.0% , 1.0% and 0.3% respectively. These isolates were cultivated on 200 rpm of shaking speed , 30 ^{0}C and initial pH were 4-7 for 7 days. It was found that isolate 19 and 18 indicated the high chitinolytic activity (23.47% and 23.09%, respectively). Then , the resting cell preparative condition were observed by freeze-thaw and sonication methods. The result showed that the resting cell of isolate 18 was prepared by 7 times of freeze-thaw or 50% and 80% amplitude of sonication for 45 s and 15 s resulting in 31.06 25.06 and 25.01% of chitinolytic activity, respectively. In case of isolate 19 , the resting cell preparation was achieved by 8 times of freeze-thaw or 50% and 80% amplitude of sonication for 70 s and 40 s yielding of 24.78 , 25.31 and 24.61% of chitinolytic activity , respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จไปได้ด้วยดี นั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ ได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาด้วย รวมทั้ง คุณพยอม เกียรติกำจร คุณประเสริฐ แพงคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้เบิก-ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลอง

สุดท้าย คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมเอกสาร ตลอดจนช่วยเหลือทางด้านต่างๆ รวมทั้งเพื่อนๆนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ปริมาณไคตินที่ลดลงหลังจากที่เชื้อเจริญครบ 7 วัน 23

ตารางที่ 4.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส18 ที่เวลาต่างๆ ใน อาหาร NB โดยศึกษาการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้ม (Amplitude) ต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญ 25

ตารางที่ 4.3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส19 ที่เวลาต่างๆ ใน อาหารเหลว NB โดยศึกษาการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม (Amplitude) ต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญ 26

ตารางที่ 4.4 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส18 และ19 ในอาหาร NB โดยศึกษาจำนวนครั้งของการแช่แข็งที่มีผลต่อการเจริญ 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซานเปรียบเทียบกับเซลลูโลส 3

รูปที่ 2.2 การเรียงตัวของสายไคตินที่ได้จากธรรมชาติ 8

รูปที่ 2.3 ภาพบนแสดงบริเวณหมู่อะซิติลและตำแหน่งที่เอนไซม์หรือด่าง เข้มข้นตัดบนสายไคติน และผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่ได้ 9

รูปที่ 2.4 ภาพจำลองของโครงสร้างไคติน และไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์ดีดี 20 และ40 เปอร์เซ็นต์ 9

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนสและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย 10

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเอนไซม์เฮกโซซามิเดส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย 11

รูปที่ 2.7 ภาพแสดงโครงสร้างของเอนไซม์เฮกโซซามินิเดส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย 11

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส13 19

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส18 20

รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส 19 20

รูปที่ 4.4 การเจริญของแบคทีเรีย รหัส13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆในอาหารเหลวไคตินที่ไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ 21

รูปที่ 4.5 การเจริญของแบคทีเรียรหัส 13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับเป็น 6.8 ก่อนการฆ่าเชื้อ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเชื้อในแต่ละวัน 22

รูปที่ 4.6 การเจริญของแบคทีเรียรหัส 13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.8 หลังการฆ่าเชื้อ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเชื้อในแต่ละวัน 22

รูปที่ 4.7 กราฟการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยศึกษาการเจริญในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 resting cell ของแบคทีเรีย รหัส18 28

รูปที่ 4.9 resting cell ของแบคทีเรีย รหัส19 28

รูปที่ 4.10 การศึกษาการย่อยไคตินด้วย resting cell รหัส19 ที่สภาวะต่างๆ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (%digestibility) 31

รูปที่ 4.11 การศึกษาการย่อยไคตินด้วย resting cell รหัส18 ที่สภาวะต่างๆ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (%digestibility) 32

รูปที่ 4.12 การย่อยไคตินด้วย resting cell รหัส18 ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้ม (Amplitude) 50และ 80 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวัน 33

รูปที่ 4.13 การย่อยไคตินด้วย resting cell รหัส19 ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้ม (Amplitude) 50และ 80 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวัน 33

รูปที่ 4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวันของ resting cell รหัส19 ที่ผ่านการแช่แข็ง โดยศึกษาจากสภาวะที่ย่อยไคตินได้สูงสุด เปรียบเทียบกับการย่อยของเซลล์ปกติ 34

รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวันของ resting cell รหัส18 ที่ผ่านการแช่แข็ง โดยศึกษาจากสภาวะที่ย่อยไคตินได้สูงสุด เปรียบเทียบกับการย่อยของเซลล์ปกติ 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ไคติน (chitin) เป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพในธรรมชาติซึ่งพบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Cellulose) โครงสร้างเคมีคล้ายเซลลูโลส แต่แตกต่างกันที่หน่วยย่อย (monomer) ซึ่งเป็น N-acetyl-D-glucosamine ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4,-glucosidic (Muzzarelli, 1997) ไคตินจะพบในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์ในวงศ์ crustacean (ได้แก่ กุ้ง ปู และแกนหมึก) และ arthopod (แมลง) นอกจากนั้นยังพบในผนังเซลล์ของเห็ดราและสาหร่ายบางสายพันธุ์ (Roberts, 1992) ไคตินสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นผลิตสารอนุพันธ์ได้หลายชนิดที่มีมากที่สุด คือ ไคโตซาน (Chitosan) เพราะละลายน้ำได้ดีกว่าไคติน ปัจจุบันแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินและอนุพันธ์ไคติน คือ ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล (Carroad และ Raymond, 1978 ; Knorr, 1984) เอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินได้ คือ เอนไซม์ไคติเนส ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยแหล่งเอนไซม์ที่สำคัญมาจากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย (Monreal และ Reese,1969) แอคติโนมัยซิท (Ueno และคณะ,1990) ยีสต์ (Elango และคณะ,1982) และรา (Muzzarelli, 1977 ; Roberts, 1992)

ปัจจุบันของเหลือทิ้งของที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบมีปริมาณมากขึ้นเนื่องจากกำลังการผลิตในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นคณะผู้ทำการวิจัยคำนึงถึงการเปลี่ยนไคตินในเปลือกกุ้งซึ่งเป็นของเหลือทิ้งให้กลับมาเป็นประโยชน์ โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้มีขนาดเล็กลง โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ เนื่องจากในปัจจุบันการผลิตไคตินและไคโตซานอาศัยกระบวนการทางเคมีโดยใช้กรดและด่างเข้มข้นซึ่งใช้เวลาการผลิตสั้น แต่ไม่สามารถควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ และก่อให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ในขณะที่การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่ใช้เวลานานและเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมได้อย่างรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อย่อยไคตินทำให้เซลล์เจริญเพิ่มขึ้นพร้อมกับสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งเซลล์ที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ส่งผลให้การผลิตลดลง ดังนั้นจึงสนใจการใช้เซลล์ในสภาพ resting เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

การเตรียมเซลล์ในสภาพ resting ทำได้โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ให้สูญเสียหน้าที่การแบ่งเซลล์มี 3 วิธี ได้แก่ กระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการทางเคมี และทางกายภาพ ซึ่งในรายงานครั้งนี้อาศัยการแช่แข็ง (Freeze-thaw) และคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อทำให้ผนังเซลล์เสียสภาพ

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

การเตรียมเซลล์ในสภาพ resting เพื่อการย่อยสลายไคติน

1.2 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

นำตัวอย่างดินรอบๆ โรงงานกุ้งแช่แข็งมาคัดแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย colloidal chitin โดยให้วงใส (clear zone) รอบโคโลนีมาศึกษาการเจริญในอาหารเหลวไคติน พร้อมทั้งศึกษาวิธีการเตรียมเซลล์ในสภาพ resting สำหรับการย่อยสลายไคติน

1.3 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ

1.3.1. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้สูงที่สุด

1.3.2. สามารถนำไคตินและอนุพันธ์ของไคตินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

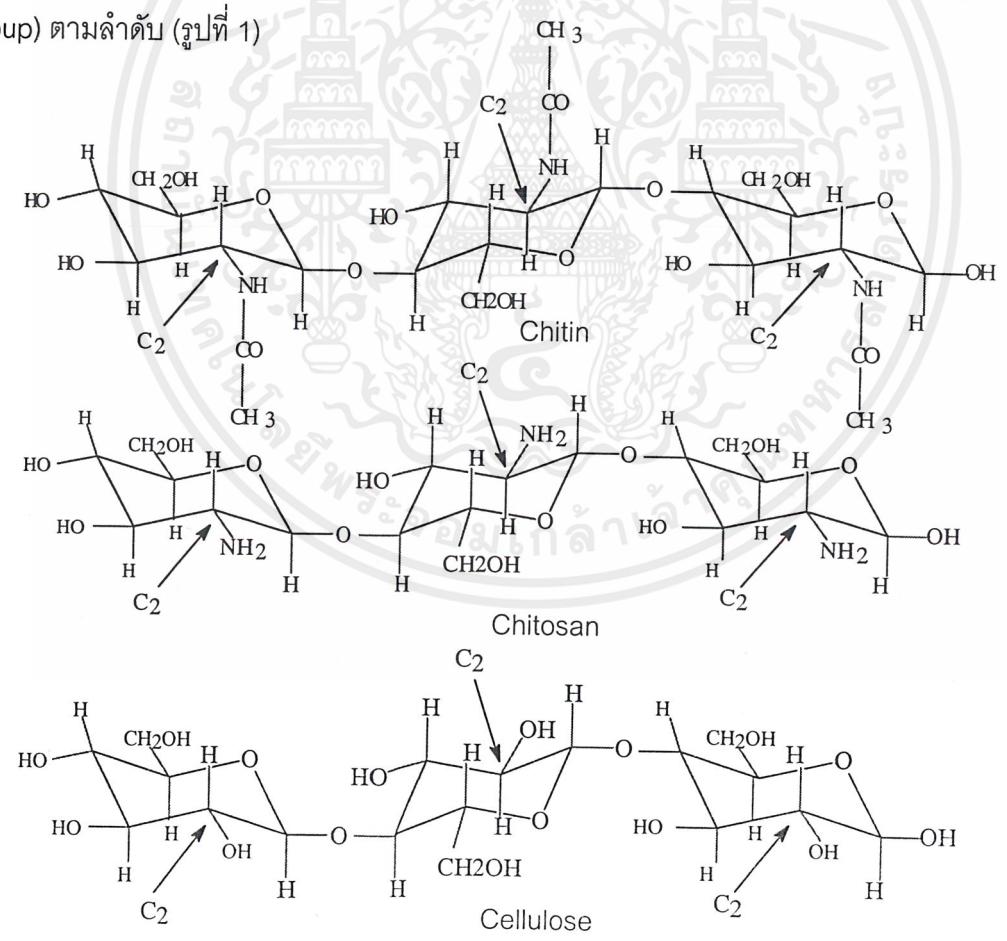
1.3.3. เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน

ไคติน (chitin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ (natural polymer) มีโครงสร้างทางเคมีคือ poly (β-(1-4)-2-acetamido-D-glucose) ส่วนไคโตซาน (chitosan) เป็นอนุพันธ์ (derivative) ชนิดหนึ่งได้จากการกำจัดหมู่อะซิติลในไคตินโดยปฏิกิริยาดิอะซิทิเลชั่น (deacetylation) โดยใช้สารละลายด่างเข้มข้น ไคติน ไคโตซานและเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยย่อย (monomer) เหมือนกันคือ ไพราโนส (pyranose) แต่ต่างกันที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองของหน่วยย่อยนี้ต่อกับหมู่อะซิทาไมด์ (acetamide group) หรือหมู่อะมิโน (amino group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซานเปรียบเทียบกับเซลลูโลส

ที่มา : ดร. รัฐ พิชญางกรู (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคตินและไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ (monomer) 2 ชนิดคือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine

N-acetyl-D-glucosamine มีหมู่อะซิทาไมด์ต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส ส่วน glucosamine มีหมู่อะมิโนต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส ในกรณีที่พอลิเมอร์ประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine มากกว่า glucosamine (m>n) เรียกพอลิเมอร์นั้นว่าไคติน แต่ถ้าในกรณีที่พอลิเมอร์ประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine น้อยกว่า glucosamine (m<n) เรียกพอลิเมอร์นั้นว่าไคโตซาน การเตรียมไคโตซานจากไคตินอาศัยปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชัน ซึ่งเปลี่ยนหมู่ที่ต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนสจากหมู่อะซิทาไมด์เป็นหมู่อะมิโน

ลักษณะโคพอลิเมอร์ของไคตินและไคโตซาน กำหนดได้จากค่าการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation) โดยบ่งบอกสัดส่วนของ D-glucosamine ที่มีอยู่ในสายพอลิเมอร์ของไคตินและไคโตซาน

2.2 วัตถุดิบในการผลิตไคติน

ไคตินเป็นสารประเภทโพลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบเป็นองค์ประกอบในเปลือกของสัตว์กระดอง (crustaceous shell) ประเภทกุ้ง ปู หอย ปลาหมึก และสัตว์อื่นๆ ที่มีเปลือกแข็งหุ้มตัว รวมทั้งในผนังเซลเชื้อรา

วัตถุดิบที่เป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการผลิตไคตินได้แก่ เปลือกกุ้งและเปลือกปูที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง

การเตรียมไคติน

เปลือกของสัตว์ทะเลประเภทกุ้งและปูมีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ โปรตีน (30-40 เปอร์เซ็นต์) แคลเซียมคาร์บอเนต (30-50เปอร์เซ็นต์) ไคติน (20-30เปอร์เซ็นต์) และสารอื่นในปริมาณเล็กน้อย เช่น สารรงควัตถุ (pigment) และไขมัน (lipid) เนื่องจากไคตินไม่ละลายในตัวทำละลายทั่วไป ดังนั้นการเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งและเปลือกปูอาศัยตัวทำละลายสกัดแยกส่วนประกอบอื่นๆ ออกและได้ส่วนที่เหลือเป็นไคติน

การเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

2.3.1 การแยกโปรตีน (deproteinization)

2.3.2 การแยกแคลเซียมคาร์บอเนต (demineralization)

2.3.3 การแยกรงวัตถุ (decoloration)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการแยกโปรตีนและการแยกแคลเซียมคาร์บอเนตอาจสลับลำดับก่อนหลังได้ โดยถ้าต้องการแยกโปรตีนออกมาใช้ประโยชน์ (อาหารสัตว์) ควรทำขั้นตอนการแยกโปรตีนก่อนเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูง เนื่องจากขั้นตอนการแยกแคลเซียมคาร์บอเนตมักใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริคในการสกัด ซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ ส่วนรงควัตถุและไขมันซึ่งมีอยู่ในปริมาณน้อยสามารถสกัดแยกโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดแยกรงควัตถุ และใช้อีเธอร์ (ether) ในการสกัดแยกไขมัน

การเตรียมวัตถุดิบ

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตไคตินและไคโตซาน ประกอบด้วย

1. เนื่องจากเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งหรือแหล่งอื่นๆ เช่น ตลาดสดหรือร้านอาหาร จะอยู่ในสภาพเปียก และอาจมีส่วนเนื้อติดปนมาอาจทำให้เกิดการเน่าเสีย ดังนั้นจึงควรตากแดดให้แห้งก่อนเพื่อง่ายต่อการเก็บรักษา การตากแดดจัดๆ ประมาณ 1-2 วัน ทำให้สีของไคตินที่ได้ขาวขึ้น และลดขั้นตอนการแยกรงควัตถุด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เนื่องจากรังสีอุลตร้าไวโอเลตสามารถทำให้รงควัตถุสลายตัว

2. บดเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูให้มีขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร ล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้งเพื่อแยกส่วนที่เป็นเนื้อกุ้งหรือเนื้อปูที่อาจจะเหลือติดอยู่กับเปลือกออกให้หมด หลังจากนั้นล้างสะอาดแล้วก็นำมาตากแห้ง สามารถเก็บได้นานหลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

2.3.1 ขั้นตอนการแยกโปรตีน

การสกัดแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูทำได้ 2 วิธี ได้แก่ การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) และการใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease)

2.3.1.1. การสกัดแยกโปรตีนโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลายด่างชนิดต่างๆ สามารถใช้สกัดแยกโปรตีนจากเปลือกกุ้งหรือเปลือกปู เช่น สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นต้น แต่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นที่นิยมใช้กันมาก

การสกัดแยกโปรตีนจากเปลือกกุ้งหรือเปลือกปู เริ่มจากใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0-10.0 เปอร์เซ็นต์ มาต้มกับเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูที่อุณหภูมิประมาณ 65-100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 0.5-6.0 ชั่วโมง ขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายด่างและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิที่ใช้ การใช้ภาวะรุนแรงในการสกัดแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งหรือปูอาจเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ได้แก่ ปฏิกิริยาดีพอลิเมอร์ไรเซชั่น (depolymerization) และปฏิกิริยาดิอะเซทิเลชั่น (deacetylation) ซึ่งทำให้ไคตินที่ได้มีค่าการกำจัดหมู่อะซิติลสูงขึ้น

วิธีการ

นำเปลือกกุ้งหรือปูที่แห้งจำนวน 20 กรัม ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1 ลิตรแล้วต้มให้เดือดประมาณ 1 ชั่วโมง ควรระมัดระวังและเติมน้ำเพื่อชดเชยการระเหยที่เกิดขึ้น จากนั้นล้างด้วยน้ำจนกระทั่งน้ำที่ล้างมีค่าพีเอชเป็นกลาง ทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช จากนั้นนำไปตากให้แห้ง

2.3.1.2. **การสกัดแยกโปรตีนโดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน**

การใช้เอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ เปปซิน หรือ ทริปซิน เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้สกัดแยกโปรตีนจากเปลือกกุ้งหรือปู การสกัดแยกโปรตีนโดยใช้เอนไซม์สามารถทำภายใต้สภาวะไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับการสกัดโดยสารละลายด่าง ทำให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลและค่าการกำจัดหมู่อะซิทิลของไคติน แต่การสกัดแยกโปรตีนอาจไม่สมบูรณ์

สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตเอนไซม์ในวัตถุประสงค์นี้ คือ *Pseudomonas maltophilia* LC102 ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายโปรตีนได้ดีโดยที่ไม่ได้ย่อยสลายไคตินด้วย

วิธีการ

ใส่เปลือกกุ้งหรือปูแห้ง 8 กรัม ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วยไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม พีเอช 7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค หลังจากฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1-4 วัน จากนั้นจึงฆ่าเชื้ออีกครั้ง เมื่ออุณหภูมิลดลงจึงล้างเปลือกกุ้งหรือปูที่ได้ด้วยน้ำหลายๆ ครั้งแล้วนำไปตากแห้ง

2.3.2 **ขั้นตอนการแยกแคลเซียมคาร์บอเนต**

การสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนตออกจากเปลือกกุ้งหรือปูทำได้ 2 วิธี คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.1. **การสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนตโดยสารละลายกรด**

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุส่วนใหญ่ในองค์ประกอบของเปลือกกุ้งและปูอยู่ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต สารละลายกรดชนิดต่างๆ สามารถสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนต เช่น กรดไฮโดรคลอริค กรดไนตริก กรดอะซิติก เป็นต้น แต่กรดไฮโดรคลอริคเป็นที่นิยมมาก ซึ่งจะเปลี่ยนแคลเซียมคาร์บอเนตให้อยู่ในรูปแคลเซียมคลอไรด์ที่ละลายน้ำ การสกัดนั้นทำที่อุณหภูมิห้องเพื่อหลีกเลี่ยงการย่อยสลายเนื่องจากกรด

วิธีการ

แช่เปลือกกุ้ง 20 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริค เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากันเป็นระยะ เพื่อกำจัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนสารละลายเมื่อผ่านไป 1 วัน ล้างน้ำหลายๆ ครั้งจนสารละลายเป็นกลาง แล้วนำไปตากให้แห้ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้คือ ไคติน

2.3.2.2. **การสกัดแคลเซียมคาร์บอเนตโดยสารละลาย** EDTA

เนื่องจากการใช้กรดไฮโดรคลอริคทำให้เกิดการย่อยสลายไคติน ทำให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง EDTA เป็นทางเลือกหนึ่งโดยทำปฏิกิริยากับแคลเซียมได้สารประกอบละลายน้ำ แต่ไม่สามารถกำจัดสารประกอบอนินทรีย์ออกได้ทั้งหมด

วิธีการ

แช่เปลือกกุ้งหรือปู 20 กรัม ในสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร พีเอชเริ่มต้น 7.5 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน ทำการเปลี่ยนสารละลาย EDTA ใหม่ทุกๆ 2 วัน คนโดยใช้แท่งแก้ว หลังจากครบ 6 วันแล้ว ให้ล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง จากนั้นตากให้แห้ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ไคติน

2.3.3 ขั้นตอนการแยกรงควัตถุ

ไคตินที่ได้หลังจากขั้นตอนข้างต้นยังมีรงควัตถุเหลือ ที่พบส่วนใหญ่เป็นสารพวกคาโรทีนอยด์ เช่น แอสตาซีน แอสตาแซนทิน และเบตาคาโรทีน เป็นต้น รงควัตถุเหล่านี้กำจัดออกโดยเอทานอล อะซิโตน หรือใช้สารฟอกขาวอื่นๆ เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ โปแตสเซียมเปอร์มังกาเนตหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

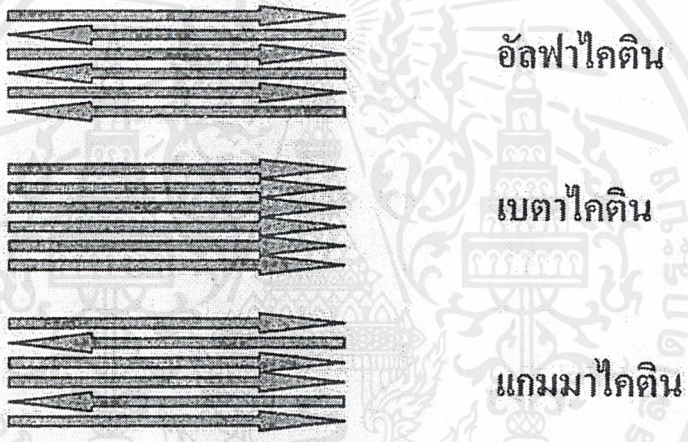
2.4 ความสำคัญของไคตินและไคโตซาน

ไคตินในธรรมชาติมีโครงร่างต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ ซึ่งโครงสร้างมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบ ทำให้มีความแข็งแรงแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

2.4.1. อัลฟา (α) เป็นแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกลับไปมา ซ้อนกันแน่น และมีความแข็งแรงที่สุด พบในเปลือกกุ้งและปู

2.4.2. เบตา (β) เป็นแบบที่โครงสร้างเรียงตัวในทิศทางเดียวกัน แต่ไม่แน่นมาก พบในแกนหมึก

2.4.3. แกมมา (γ) เป็นแบบที่โครงสร้างเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไปในทิศทางเดียวกันบ้าง ตรงข้ามกันบ้าง (รูปที่ 2)

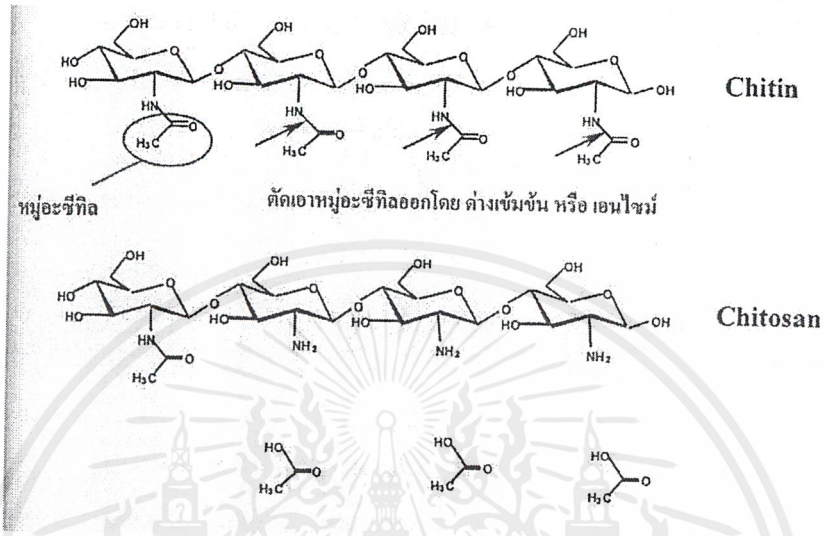


รูปที่ 2.2 การเรียงตัวของสายไคตินที่ได้จากธรรมชาติ
ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยตัดหมู่อะซิติลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไพราโนส โดยใช้ด่างเข้มข้น หรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนจากเอ็นอะซิติลกลูโคซามีนเป็นกลูโคซามีน การตัดหรือดึงส่วนหมู่อะซิติลออกนั้นสามารถทำได้ทั้งหมดหรือบางส่วน มีผลให้คุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไป การดึงหมู่อะซิติลของไคตินออกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ไคโตซานซึ่งละลายได้ในกรดอินทรีย์อ่อนๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลกติค หรือกรดซิตริก เป็นต้น และมีคุณสมบัติต่างไปจากไคติน (รูปที่ 3) ในธรรมชาตินั้นพบไคโตซานน้อยมาก พบในผนังเซลล์ของเห็ดรา และยีสต์บางชนิดเท่านั้น

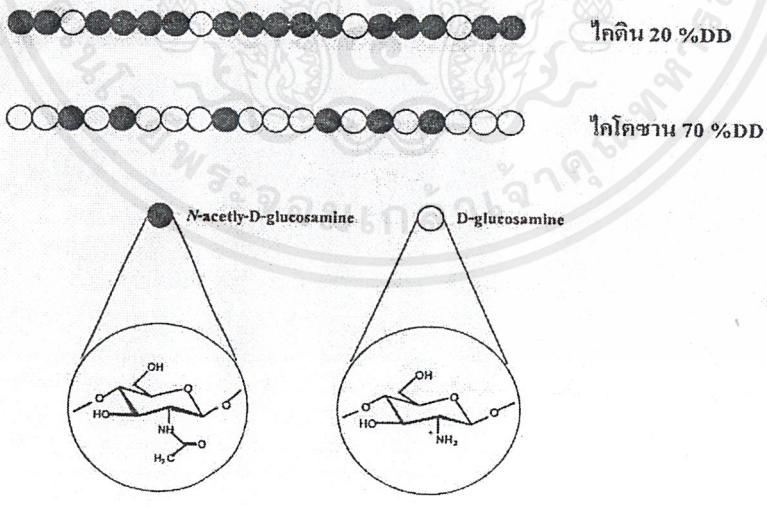
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หากตัดหมู่อะซิติลออกจากไคตินต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ไคตินยังคงมีคุณสมบัติไม่สามารถละลายในกรดอ่อนๆ ดังนั้นค่าการกำจัดหมู่อะซิติล (%DD) ใช้แสดงคุณสมบัติของสารว่าเป็นไคตินหรือไคโตซาน (รูปที่ 4)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างไคตินแสดงบริเวณหมู่อะซิติลและตำแหน่งที่เอนไซม์หรือด่างเข้มข้น ตัดบนสายไคติน (บริเวณลูกศรชี้) และผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่ได้

ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)



รูปที่ 2.4 ภาพจำลองของโครงสร้างไคติน และไคโตซานที่มีการกำจัดหมู่อะซิติล 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์

ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

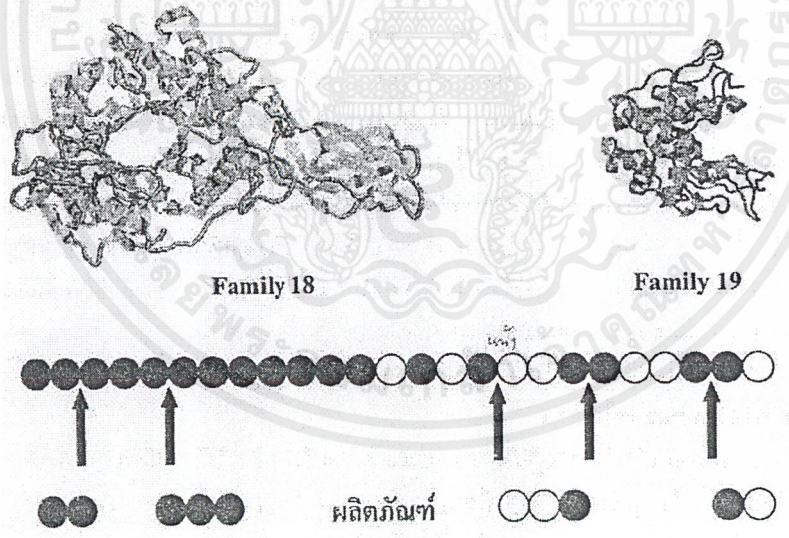
2.5 การย่อยสลายไคตินและไคโตซานในธรรมชาติ

ในธรรมชาติไคตินและไคโตซานถูกย่อยด้วยสาเหตุสำคัญๆ ได้แก่ การย่อยเพื่อการเจริญ เช่น การย่อยสลายเพื่อการลอกคราบ หรือการแบ่งเซลล์ การย่อยเพื่อเป็นอาหาร สำหรับสัตว์กินสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ การย่อยเพื่อต่อต้านการรุกราน เช่น การทำลายผนังเซลล์ของราโดยเซลล์พืชและสัตว์ที่ถูกรุกราน ซึ่งกระบวนการย่อยสลายไคตินและไคโตซานตามธรรมชาติใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.6 เอนไซม์ย่อยไคตินและไคโตซาน

สามารถแบ่งเป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

2.6.1. **ไคติเนส** (chitinase: EC 3.2.1.14) เร่งปฏิกิริยาการย่อยไคตินบริเวณปลายสายและในสาย ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็นกลูโคซามีนสองตัวต่อกัน เรียกว่า ไคโตไบโอส (chitobiose) หรือน้ำตาลสามตัวต่อกัน (chitotetraose) หรือเป็นสายไคตินสั้นๆ (chitooligomer) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ family ที่ 18 และ19 (รูปที่ 5)

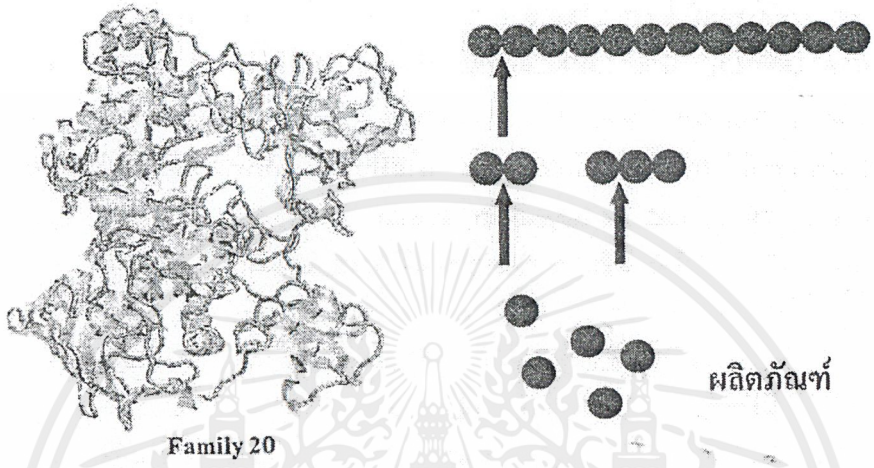


รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย

ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

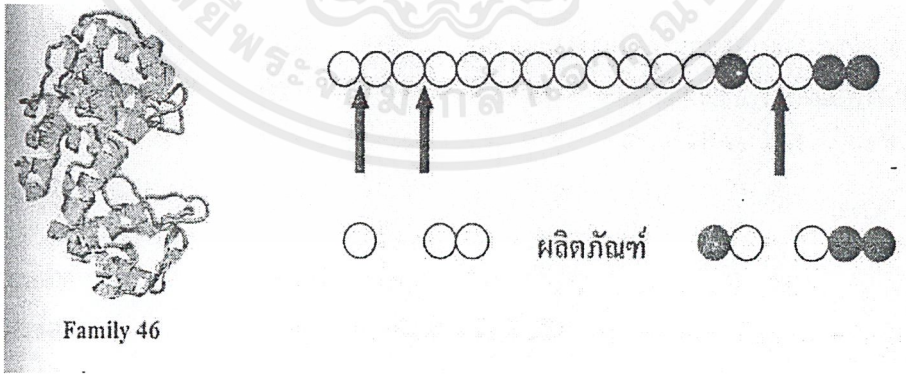
2.6.2. **เฮกโซซามิเดส หรือไคโตไบเอส** (hexosaminidase or chitobiase: EC 3.2.1.52) เร่งปฏิกิริยาการย่อยไคตินจากปลายสายหรือเร่งการย่อยไคโตไบโอส ได้เป็นน้ำตาลเอ็นอะซิติล (รูปที่ 6)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเอนไซม์เฮกโซซามิเดส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย

ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)

2.6.3. **ไคโตซาเนส** (chitosanase: EC 3.2.1.132) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสายไคโตซาน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคซามีน หรือ น้ำตาลโมเลกุลคู่ของกลูโคซามีน เอนไซม์ชนิดนี้ไม่ย่อยสายไคติน (รูปที่ 7)



รูปที่ 2.7 ภาพแสดงโครงสร้างของเอนไซม์เฮกโซซามินิเดส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย

ที่มา : รัฐ พิชญางกรู (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ย่อยไคตินและไคโตซาน

ปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทั่วไปเริ่มจากการจับตัวระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทที่อยู่ในสารละลายเดียวกันซึ่งการรวมเป็นเนื้อเดียวทำให้ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างรวดเร็ว แต่ในปฏิกิริยาของไคตินเนสพบว่าสับสเตรทเป็นของแข็งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นเอนไซม์และสับสเตรทจึงไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้เกิดข้อจำกัดซึ่งเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะบริเวณพื้นผิวของสับสเตรท ทำให้การทำงานช้าลง ดังนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนี้แปรผันตามพื้นที่ผิวในการจับกับสับสเตรท นอกจากนี้ไคตินมีโครงสร้างที่แข็งแรง และอัดตัวกันแน่นทำให้เอนไซม์เข้าไปยึดเกาะกับสับสเตรทยากขึ้น โดยทั่วไปเบตาไคตินมีโครงสร้างซับซ้อนน้อยกว่าอัลฟาไคติน จึงเป็นสับสเตรทที่ย่อยได้ดีกว่า

การย่อยไคโตซานไม่เป็นอุปสรรคมากเพราะละลายได้ในกรดอ่อนๆ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรดอ่อนๆ แต่ความหนืดของสารละลายไคโตซานมีผลต่อการผสมผสานและการรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันระหว่างสับสเตรทและเอนไซม์ อาจทำให้ปฏิกิริยาการย่อยช้าลง ดังนั้นการผสมผสานจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก

2.8 การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน

ปัจจุบันไคตินและไคโตซานนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมายตามคุณสมบัติของสาร โดยแบ่งออกได้เป็นประเภทต่างๆ ดังนี้

2.8.1. **อุตสาหกรรมเกษตร** ปัจจุบันมีบทบาทอย่างมากต่อการนำไปใช้ เพราะมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกัน (elicitor) และมีผลต้านราที่ทำให้เกิดโรครากเน่า จึงนำมาใช้ได้ดีกับพืชหลายชนิด นอกจากนี้สามารถนำไปผสมอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มการเจริญและภูมิคุ้มกัน เช่นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ การเลี้ยงกุ้ง ทำให้กุ้งลอกคราบได้ดี สุขภาพแข็งแรง นอกจากนี้นำเอาไปใช้ในการปรับสภาพน้ำและดิน ทำให้ลดมลภาวะและรักษาสิ่งแวดล้อม

2.8.2. **อุตสาหกรรมอาหาร** ใช้เป็นสารเติมในอาหาร หรือสารกันบูด เนื่องจากสามารถต้านทานจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส สารเคลือบผักและผลไม้

2.8.3. **เภสัชกรรมและอุตสาหกรรมการแพทย์** นำมาใช้ลดสารไขมันบางชนิด เช่น คอเลสเตอรอล ทำให้มีบทบาทในเรื่องของอาหารเสริมสุขภาพ อาหารลดความอ้วน นอกจากนี้นำไปใช้เป็นผิวหนังเทียม รักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ใช้ปลดปล่อยยา ใช้รักษาเหงือกและฟัน เป็นสารหล่อลื่นในเยื่อเมือกตลอดจนเลนส์ตา ช่วยทำให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้น เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.4. **อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** ไคตินและไคโตซานมีคุณสมบัติเด่นในการอุ้มน้ำและเป็นตาข่ายคลุมผิวหนัง ตลอดจนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ นิยมใช้เป็นสารเติมแต่ง สารพื้นฐานของเครื่องสำอางในหลายๆประเภท เช่น ครีม แชมพู แป้งทาหน้า และสบู่ โลชั่นต่างๆ เป็นต้น

2.8.5. **อุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษ** การผสมไคตินและไคโตซานทำให้สามารถป้องกันเชื้อโรค และสร้างความเหนียว และความแข็งแรงให้กับกระดาษ นำมาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพให้แก่กระดาษและผลิตภัณฑ์

2.8.6. **เทคโนโลยีชีวภาพ** นำมาใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์ และเซลล์ต่างๆ ด้วยเทคนิคอิมโมบิไลเซชั่น ใช้เป็นตัวแยกโครมาโตกราฟี ทำขั้วไฟฟ้าทางชีวภาพ วิเคราะห์และตรวจสอบสารต่างๆ นอกจากนี้ อาจนำมาขึ้นรูปเป็นเยื่อบางๆ เพื่อใช้ในการกรองด้วยเทคนิคต่างๆได้ด้วย เช่น ไดอะไลซิส อัลตร้าฟิวเตชั่น นาโนฟิวเตชั่น และรีเวอร์สออสโมซิส เป็นต้น การใช้ไคตินและไคโตซานนี้ปราศจากการตกค้างและสามารถย่อยสลายโดยวิธีทางธรรมชาติได้ ไปเป็นปุ๋ยให้กับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังปลอดมลพิษและสารที่แยกได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ การใช้ไคโตซานในกระบวนการแยกทางชีวภาพ สามารถที่จะนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงทำให้เกิดกระบวนการหมุนเวียนตามธรรมชาติ

2.8.7. **การบำบัดน้ำเสียและทำน้ำให้บริสุทธิ์** ปัจจุบันใช้ไคโตซานในการรวมตะกอนและตกตะกอน แล้วนำตะกอนที่ได้มาพัฒนาเป็นอาหารและปุ๋ยธรรมชาติ ในกรณีที่น้ำทิ้งหรือน้ำเสียนั้นมีโปรตีนสูง สามารถใช้ไคโตซานตกตะกอนได้เป็นอย่างดี ตะกอนที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ นอกจากนี้ใช้ในการทำให้น้ำบริสุทธิ์และสะอาด เช่นการทำน้ำดื่ม น้ำที่ใช้ในการล้างผิวโลหะจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งสามารถใช้ไคโตซานจับ trace element ที่อยู่ในน้ำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 อุปกรณ์

จานเพาะเชื้อ

หลอดทดลอง

ปิเปตต์ขนาด 1.0 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตร

ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

บีกเกอร์ขนาด 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร

ที่วางหลอดทดลอง

เข็มเขี่ยเชื้อ

ลูปเขี่ยเชื้อ

หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1 และ 50 มิลลิลิตร

หลอดหยด

ทิปขนาด 1 และ 0.2 มิลลิลิตร

กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

กระดาษชั่งสาร

จุกสำลีและจุกพลาสติก

ขวดสีชา

ขวดดูแรนขนาด 500 มิลลิลิตร

กระบอกปิเปตต์

กล่องอบจานเพาะเชื้อ

ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร

กระดาษฟลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 **เครื่องมือ**

เครื่องหมุนเหวี่ยง Z 383 K บริษัท HERMLE

เครื่องชั่งละเอียด

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ UV-1601 บริษัท SHIMADZU

ตู้เขี่ยเชื้อ

ตู้อบลมร้อน

กรวยกรอง

เครื่องเขย่า

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

เครื่องโซนิคเคเตอร์ VCX 500 20 กิโลเฮิรต์ บริษัท SONICS AND MATERIAL

ตู้เย็นแช่แข็ง

ไมโครมิเตอร์

เครื่องผสมสาร

3.25 **สารเคมี**

ไคตินผง (Siam Bionet Co.Ltd. Thailand.)

แอมโมเนียมไนเตรต

ยีสต์สกัด

ผงวุ้น

โซเดียมไฮดรอกไซด์

อาหารแข็ง NA และอาหารเหลว NB

กลูโคส

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทาไฮเดรต

โซเดียมซัลเฟต

แอมโมเนียมโมลิบเดท

กรดซัลฟูริกเข้มข้น

โซเดียมอาร์ซิเนท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 <u>การคัดแยกเชื้อที่ย่อยสลายไคติน</u> แบ่งได้ 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.3.1.1. **การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์**

ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากบริเวณโรงงานกุ้งแช่แข็งและดินรอบๆโรงงาน เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไคตินได้ นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวก) เลือกจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารมาทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงศึกษาสันฐานวิทยาของเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ การติดสีแกรม ขนาด และรูปร่าง เป็นต้น

3.3.1.2. **คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด**

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวก) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งอาหารเป็น 3 ประเภท คือ อาหารที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 7 ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อาหารที่ปรับค่าพีเอชหลังการฆ่าเชื้อ และอาหารที่ไม่มีการปรับค่าพีเอช ในระหว่างนี้หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (แสดงในภาคผนวก) และวัดปริมาณเชื้อในแต่ละวันโดยเก็บตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วหมุนเหวี่ยงอีก 2-3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง นำมากรองเพื่อแยกไคตินออกจากอาหารเหลว ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ เปรียบเทียบหาน้ำหนักไคตินที่ลดลงในแต่ละเชื้อที่ทำการทดสอบ

3.3.2 <u>การเตรียมเซลล์ในสภาพ resting</u> แบ่งได้ 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.3.2.1. **ศึกษากราฟการเจริญเติบโต** (growth curve)

เลือกเชื้อย่อยสลายไคตินสูงสุดมาศึกษาการเจริญในระยะเวลาต่างๆ โดยเลี้ยงหัวเชื้อที่คัดเลือกในอาหารเหลว NB (แสดงในภาคผนวก) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารขวดใหม่เลี้ยงที่สภาวะเดิมต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ในระหว่างนี้เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เขียนกราฟการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเตรียมตัวอย่างวัดค่าดูดกลืนแสง

นำอาหารเหลวผ่านการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายน้ำกลั่นแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีก 2-3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด จากนั้นตะกอนเซลล์ที่ได้นำมาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่าเดิม (1 มิลลิลิตร) แล้วนำไปวัดการเจริญโดยอาศัยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ

3.3.2.2. **ศึกษาการเตรียม** resting cell

การทดลองอาศัยการเตรียม resting cell โดยวิธีทางกายภาพ คือ การแช่แข็ง (freeze-thaw) และ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงโดยเครื่อง sonicator

<u>การแช่แข็ง</u> <u>(freeze-thaw)</u>

เลี้ยงหัวเชื้อในอาหารเหลวNBบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวขวดใหม่ ทำการเลี้ยงต่อ 7 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายน้ำกลั่น นำไปหมุนเหวี่ยงอีก 2-3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์ให้สะอาด นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเท่าเดิม (100 มิลลิลิตร) แบ่งสารละลายเซลล์แขวนลอยใส่ลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 15-20 ขวดภายใต้สภาพปลอดเชื้อ นำขวดทั้งหมดไปแช่แข็งทันทีที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –83 องศาเซลเซียสนานประมาณ 30-40 นาที จากนั้นนำขวดทั้งหมดมาตั้งให้ค่อยๆ ละลาย เลือก 1 ขวด แล้วทำการตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ โดยทำการเลี้ยงบนอาหารแข็งNAเพื่อดูการเจริญ และย้อมสีแบบ negative stain ดูการติดสี บันทึกผล ส่วนขวดที่เหลือกลับไปแช่แข็ง หลังจากครบเวลาแล้ว นำออกมาละลายใหม่จนกระทั่งครบทุกขวด ตรวจสอบดูว่าผลจากการแช่แข็งครั้งที่เท่าไรมีผลต่อเซลล์ นั่นคือ เซลล์ไม่มีการเจริญบนอาหารแข็ง NA แต่ยังคงมีการติดสี เซลล์ที่ได้นี้เรียกว่า resting cell

<u>การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงด้วยเครื่อง</u> <u>sonicator</u>

ฆ่าเชื้อเครื่อง sonicator ด้วยแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปไว้ในตู้เขี่ยเชื้อเปิดแสงยูวี เป็นเวลา 9-10 ชั่วโมงก่อนการใช้ เตรียมสารละลายเซลล์แขวนลอยตามวิธีการแช่แข็ง จากนั้นแบ่งใส่บีกเกอร์ที่ผ่านการเชื้อแล้ว ประมาณ 60-70 มิลลิลิตรต่อบีกเกอร์ จำนวน 10 บีกเกอร์ ก่อนเปิดเครื่องทำงาน ควรฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์แล้วเผาบริเวณโพรบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43961

อย่างรวดเร็ว จุ่มโพรบลงในบีกเกอร์ ให้บริเวณโพรบอยู่ 3 ใน 4 ของของเหลว เปิดเครื่อง เลือกความเข้ม (amplitude) ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ตั้งเวลาให้ทำงานครั้งละ 5 วินาที ประมาณ 12 ครั้ง เก็บตัวอย่างทุกครั้งที่เครื่องทำงานในแต่ละ 5 วินาที นำมาทดสอบการอยู่รอดของเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งNA ดูการเจริญ และทำการย้อมสีแบบ negative stain ดูการติดสี บันทึกผล จากนั้นเปลี่ยนความเข้มเป็น 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตรวจสอบดูว่าผลจากความเข้ม และเวลาเท่าไรมีผลต่อเซลล์ นั่นคือ เซลล์ไม่มีการเจริญบนอาหารแข็ง NA แต่ยังคงมีการติดสี เซลล์ที่ได้นี้เรียกว่า resting cell

3.3.3 <u>ศึกษาการย่อยสลายไคตินโดย resting cell</u>

นำเซลล์สภาพ resting มาศึกษาการย่อยสลาย โดยเลี้ยงในอาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ที่สภาวะเดียวกัน หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson และเปรียบเทียบการลดลงของไคตินโดยนำมากรอง อบที่ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์

4.1.1 คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำตัวอย่างดินรอบๆ โรงงานกุ้งแช่แข็งมาคัดแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถย่อยไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลาย colliodal chitin โดยให้วงใส (clear zone) รอบโคโลนีมาทำการศึกษาการเจริญในอาหารเหลวไคติน พร้อมทั้งศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นโดยการย้อมแกรม และวัดขนาดของเซลล์โดยทำการเลือกแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์มาศึกษาพบว่า

รหัส 13 เชื้อมีรูปร่างกลม แกรมลบ มีขนาด 0.4 ไมโครเมตร (colony สีขาว)

รหัส 18 เชื้อมีรูปร่างกลม แกรมบวก มีขนาด 0.6 ไมโครเมตร (colony สีขาว)

รหัส 19 เชื้อมีรูปร่างกลม แกรมลบ มีขนาด 0.3 ไมโครเมตร (colony สีเหลือง)

4.1.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งไคตินเบื้องต้น

เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 ชนิดมาเลี้ยงบนอาหารแข็งไคติน โดยวิธีลากเชื้อ (Cross streak) พบว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิดสามารถเจริญบนอาหารแข็งไคตินได้มีลักษณะการเจริญและโคโลนี (รูปที่ 4.1-4.3)

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส18

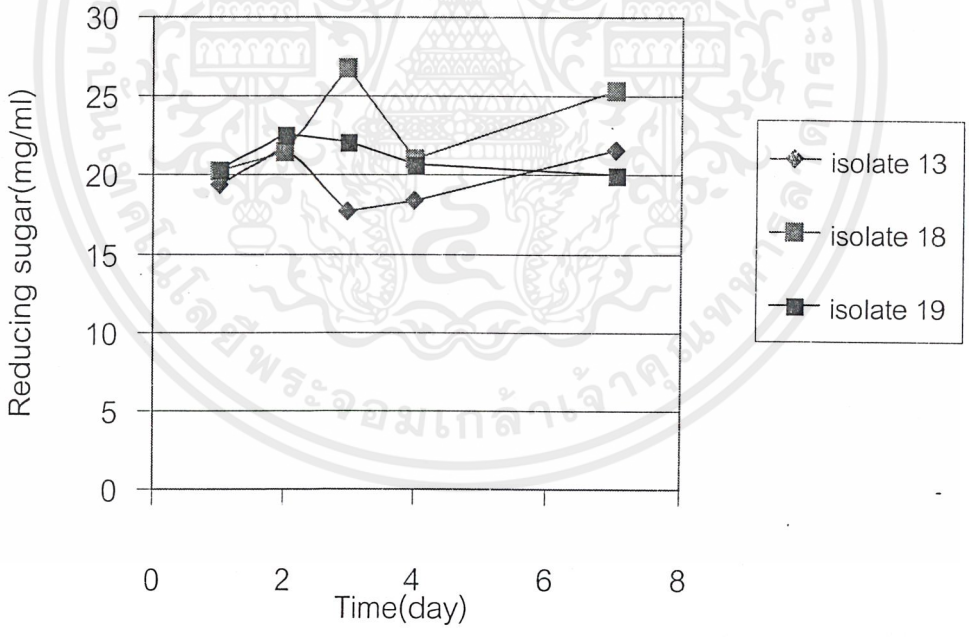
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย รหัส 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการคัดแยกจนได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ 3 สายพันธุ์ หลังจากนั้นนำไปทำการทดสอบการย่อยไคตินในอาหารเหลวขั้นตอนต่อไป

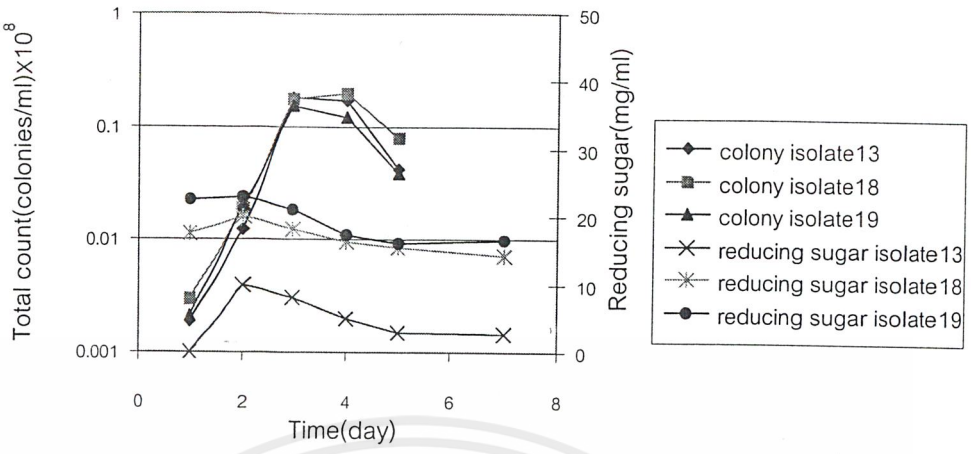
4.1.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์

นำเชื้อแบคทีเรียรหัส 13 18 และ 19 มาเลี้ยงในอาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในภาคผนวก) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไคตินเป็นเวลา 7 วัน ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อทุกวันจะทำการวัดปริมาณการเจริญของเชื้อ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวันพบว่า ในอาหารปรับพีเอชก่อน และหลังการฆ่าเชื้อของเชื้อรหัส 13 และ19 มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุดในวันที่ 3 ส่วนเชื้อรหัส 18 มีการเจริญของเชื้อสูงสุดในวันที่ 4 และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 2 หลังจากนั้นค่อยๆ ลดลง โดยเชื้อรหัส19 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดรองลงมาคือรหัส 18 และ 13 ตามลำดับ แต่ในอาหารไม่ปรับพีเอชเชื้อรหัส 18 จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด รองลงมาคือรหัส 19 และ13 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4-4.6)

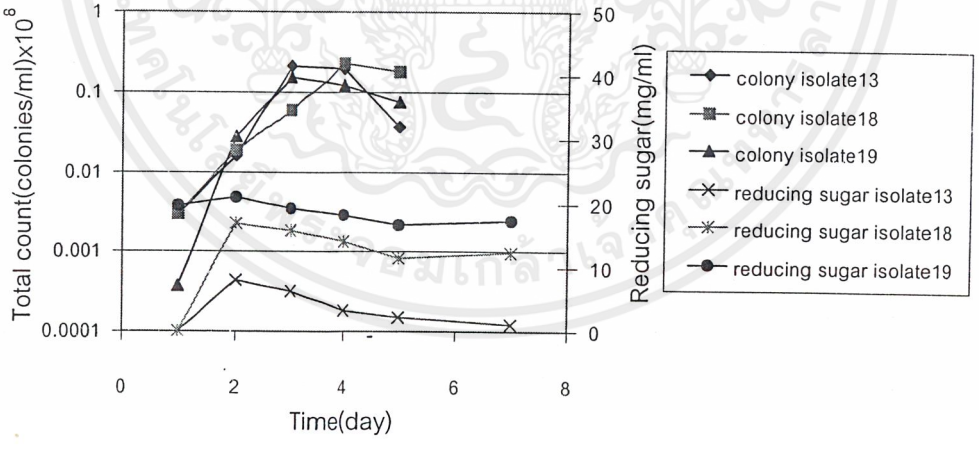


รูปที่ 4.4 การเจริญของแบคทีเรีย รหัส13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆในอาหารเหลวไคติน ที่ไม่ปรับพีเอชโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญของแบคทีเรียรหัส 13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.8 ก่อนการฆ่าเชื้อ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเชื้อในแต่ละวัน



รูปที่ 4.6 การเจริญของแบคทีเรียรหัส 13 18 และ19 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารเหลวไคติน ที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.8 หลังการฆ่าเชื้อ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเชื้อในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวครบ 7 วัน แล้วทำการกรองไคตินออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อล้างด้วยน้ำกลั่น จนแน่ใจว่าไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เกาะอยู่บนกระดาษกรอง นำไปอบที่ตู้อบ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือจนน้ำหนักคงที่แล้วทำการชั่งน้ำหนักไคตินที่เหลืออยู่เพื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ไคตินที่ถูกใช้ไปในเชื้อแต่ละตัวพบว่า เชื้อรหัส 13 ในอาหารไม่ปรับพีเอช อาหารปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และอาหารปรับพีเอชหลังการฆ่าเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์ไคตินที่ถูกใช้เท่ากับ 20.75 14.47 และ12.10 ตามลำดับ เชื้อรหัส 18 ในอาหารไม่ปรับพีเอช อาหารปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และอาหารปรับพีเอชหลังการฆ่าเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์ไคตินที่ถูกใช้เท่ากับ 23.09 19.84 และ 14.23 ตามลำดับ เชื้อรหัส 19ในอาหารไม่ปรับพีเอช อาหารปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อ และอาหารปรับพีเอชหลังการฆ่าเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์ไคตินที่ถูกใช้เท่ากับ 23.47 22.93 และ21.97 (ตารางที่4.1)

ตารางที่4.1 ปริมาณไคตินที่ลดลงหลังจากที่เชื้อเจริญครบ 7 วัน

เชื้อ	พีเอชอาหาร			ปริมาณไคติน		ไคตินที่ใช้ไป (เปอร์เซ็นต์)	พีเอชสุดท้าย
	ไม่ปรับพีเอช	ปรับพีเอช		เริ่มต้น	สุดท้าย		
		ก่อนฆ่าเชื้อ	หลังฆ่าเชื้อ				
13	4.56	-	-	1	0.7625	20.75	4.54
	-	6.85	-	1	0.8553	14.47	6.93
	-	-	6.85	1	0.879	12.1	7.19
18	4.63	-	-	1	0.7691	23.09	4.76
	-	6.88	-	1	0.8016	19.84	7.25
	-	-	6.88	1	0.8577	14.23	7.35
19	4.87	-	-	1	0.7653	23.47	4.88
	-	6.81	-	1	0.7707	22.93	7.02
	-	-	6.81	1	0.7803	21.97	7.23

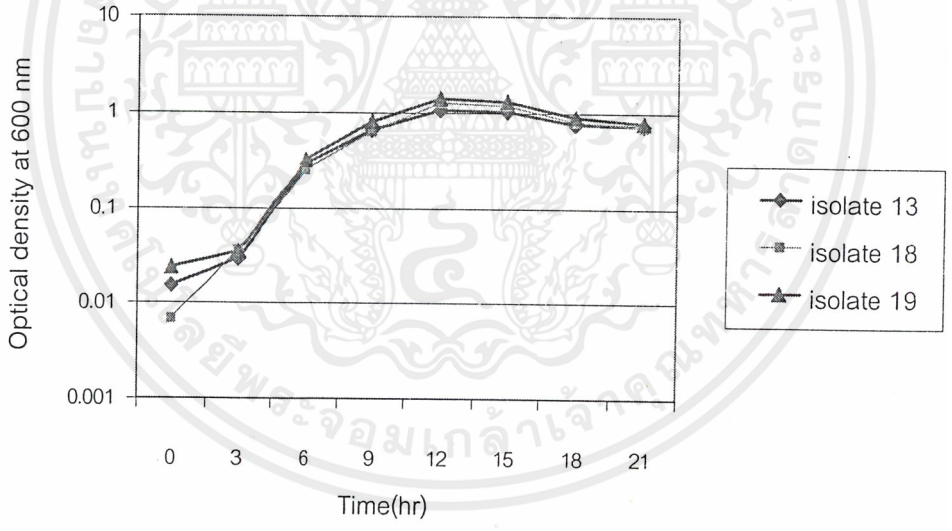
จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าเชื้อรหัส 19 มีประสิทธิภาพการย่อยไคตินได้สูงสุดคือ เฉลี่ยทั้งในอาหารไม่ปรับพีเอช อาหารปรับพีเอชก่อน และหลังการฆ่าเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์การใช้ไคติน เท่ากับ 22.79 รองลงมาคือรหัส 18 และ13 มีเปอร์เซ็นต์การใช้ไคตินเท่ากับ 19.05 และ15.77 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเตรียมเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเตรียม resting cell

4.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหาร NB ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการหาระยะเวลาที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid log phase เพราะว่าระยะนี้ผนังเซลล์ยังไม่สมบูรณ์สามารถถูกทำให้บาดเจ็บได้ง่าย เหมาะที่จะนำไปเตรียมเป็น resting cell โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่าช่วง mid log phase อยู่ในชั่วโมงที่ 7 (รูปที่ 4.7)

4.2.2 การนำเซลล์ในสภาพเหมาะสมมาเตรียม เพื่อทำเป็น resting cell โดยวิธีทางกายภาพ คือ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม 30 50 60 และ80เปอร์เซ็นต์ ณ เวลาต่างๆ และการแช่แข็ง เพื่อหาจำนวนครั้งที่เหมาะสม ซึ่งจะศึกษาคู่กับการย้อมสี และการเจริญบนอาหาร NA (ตารางที่4.2-4.4) โดย resting cellนั้นต้องไม่ติดสีย้อม และไม่เจริญบนอาหาร NA เพราะว่า resting cell เป็นเซลล์ที่ไม่ตาย แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวน ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ผนังเซลล์ถูกทำให้บาดเจ็บไปโดยวิธีที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 4.7 กราฟการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยศึกษาการเจริญในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุกๆ 3 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส18 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร NA โดยศึกษาการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้มต่างๆ (Amplitude) ที่มีผลต่อการเจริญ

เวลา(วินาที)	30(เปอร์เซ็นต์)	50(เปอร์เซ็นต์)	60(เปอร์เซ็นต์)	80(เปอร์เซ็นต์)
5	+++	+++	+++	+
10	+++	+++	+++	-
15	+++	+++	++	-
20	+++	++	++	-
25	+++	++	+	-
30	+++	+	-	-
35	+++	-	-	-
40	+++	-	-	-
45	+++	-	-	-
50	++	-	-	-
55	++	-	-	-
60	++	-	-	-

หมายเหตุ

+++ =มีการเจริญมาก

++ =มีการเจริญปานกลาง

+ =มีการเจริญน้อย

- =ไม่มีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส19 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร NA โดยศึกษาการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้มต่างๆ (Amplitude) ที่มีผลต่อการเจริญ

เวลา(วินาที)	30(เปอร์เซ็นต์)	50(เปอร์เซ็นต์)	60(เปอร์เซ็นต์)	80(เปอร์เซ็นต์)
5	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++
15	+++	+++	++	+++
20	+++	+++	+++	++
25	+++	+++	+++	++
30	+++	+++	+++	+
35	+++	+++	++	-
40	+++	+++	++	-
45	+++	++	++	-
50	++	++	+	-
55	++	++	+	-
60	++	+	-	-
65	++	+	-	-
70	++	-	-	-
75	++	-	-	-

หมายเหตุ

+++ =มีการเจริญมาก

++ =มีการเจริญปานกลาง

+ =มีการเจริญน้อย

- =ไม่มีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส18 และ19 ในอาหาร NA โดยศึกษา
จำนวนครั้งของการแช่แข็งที่มีผลต่อการเจริญ

จำนวนครั้งการแช่แข็ง	แบคทีเรีย รหัส 18	แบคทีเรีย รหัส 19
1	+++	+++
2	+++	+++
3	+++	+++
4	++	+++
5	++	++
6	+	++
7	+	+
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-

หมายเหตุ

+++ =มีการเจริญมาก

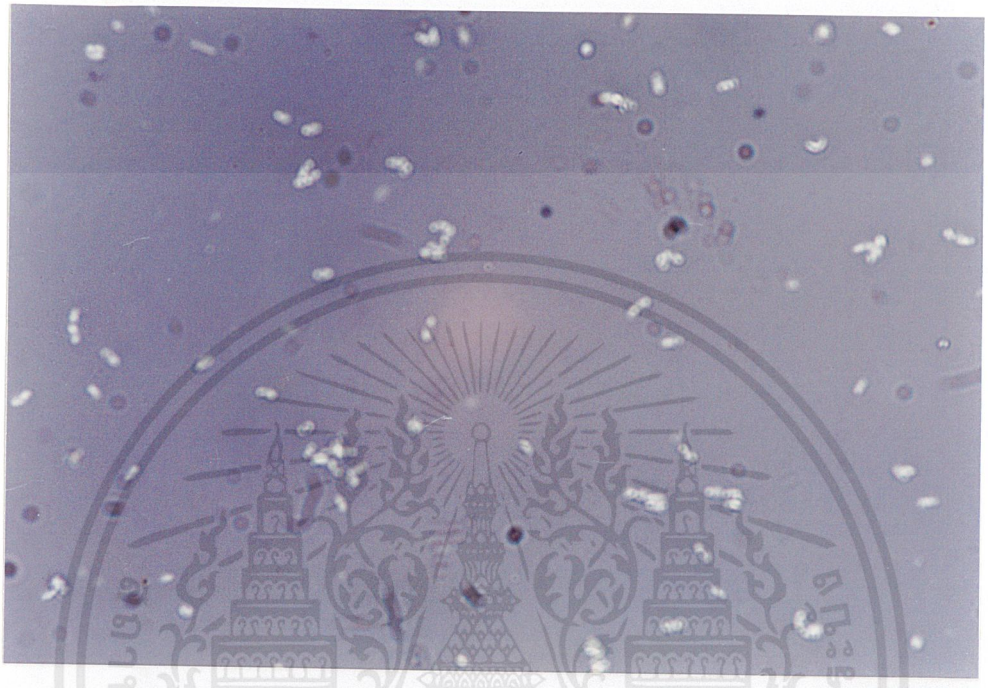
++ =มีการเจริญปานกลาง

+ =มีการเจริญน้อย

- =ไม่มีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มื่อนำเซลล์ที่เป็น resting cell มาย้อมสีเพื่อดูลักษณะของเซลล์พบว่าเซลล์นั้นโปร่งแสง ซึ่งสีไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ เพราะว่า resting cell ไม่ใช่เซลล์ตายแต่เพียงแค่ผนังเซลล์ถูกทำให้บาดเจ็บ จึงทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการแบ่งตัวไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 4.8-4.9)



รูปที่ 4.8 resting cell ของแบคทีเรีย รหัส18

รูปที่ 4.9 resting cell ของแบคทีเรีย รหัส19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองจะเห็นว่า การแช่แข็งตั้งแต่ครั้งที่ 7 เป็นต้นไป มีผลต่อผนังเซลล์ ทำให้เกิดการบาดเจ็บของผนังเซลล์ แต่ไม่ทำให้เซลล์ตาย

ส่วนการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงนั้น จะเห็นว่าที่ความเข้ม (Amplitude) 30 เปอร์เซ็นต์ นั้นไม่ค่อยมีผลต่อผนังเซลล์มากนัก แต่ 50 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ในเวลาต่างๆ ทำให้เราสามารถเลือกสภาวะ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมเป็น resting cell ได้ดังนี้

- เชื้อจุลินทรีย์รหัส18 ที่ทำเป็น resting cell โดยการแช่แข็ง 7 8 และ9 ครั้ง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ เวลา 35 40 และ 45 วินาที และที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ เวลา 5 10 และ 15 วินาที

- เชื้อจุลินทรีย์รหัส19 ที่ทำเป็น resting cell โดยการแช่แข็ง 7 8 และ9 ครั้ง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ เวลา 65 70 และ 75 วินาที และที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์เวลา 30 35 และ 40 วินาที

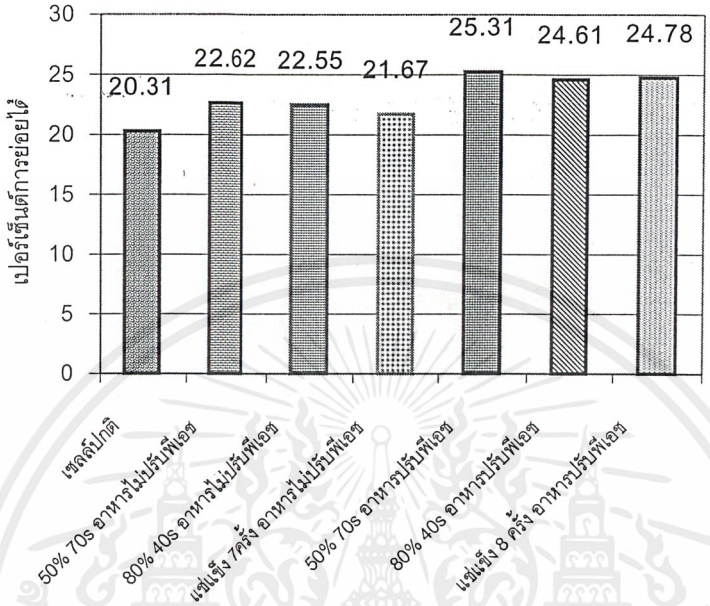
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การนำ resting cell ไปทดสอบในอาหารเหลวไคติน

จากการศึกษาการย่อยไคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ซึ่งทำการคัดเลือกจากดินรอบ ๆ บริเวณโรงงานกุ้งแช่แข็ง มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากเปอร์เซ็นต์การย่อยไคตินดังกล่าวของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์จึงทำการเลือกเฉพาะเชื้อรหัส 18 และ19 มาศึกษาการเตรียม resting cell เพื่อทดสอบการย่อยไคตินในอาหารเหลวไคติน เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยวิธีการที่ใช้เตรียม resting cell คือ การแช่แข็ง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง พบว่าในเชื้อรหัส 18 ในการแช่แข็ง จำนวนครั้งที่เหมาะสมต่อการเป็น resting cell คือครั้งที่ 7 8 และ9 เมื่อนำไปทดสอบการย่อยไคตินในอาหารเหลวการแช่แข็งครั้งที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การย่อยไคตินสูงสุดเท่ากับ 31.06 และ 22.83 เปอร์เซ็นต์ในอาหารไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ ส่วนการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์เวลา ที่เหมาะสมต่อการเป็น resting cell คือ 35 40 และ 45 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดที่เวลา 45 วินาทีเท่ากับ 25.06 และ20.51 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ ที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่เหมาะสมคือ 5 10 และ15 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดที่เวลา 15 และ 5 วินาที เท่ากับ 25.01 และ 21.78 เปอร์เซ็นต์ในอาหารไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ เชื้อรหัส 19 การแช่แข็งจำนวนครั้งที่เหมาะสมต่อการเป็น resting cell คือครั้งที่ 7 8 และ9 มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดที่ครั้งที่ 7 และ8 เท่ากับ 21.67 และ24.78 เปอร์เซ็นต์ในอาหารไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ การใช้คลื่นสียงความถี่สูงความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์เวลาที่เหมาะสมคือ 65 70 และ75 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดที่เวลา 70 วินาที เท่ากับ 22.62 และ 25.31 เปอร์เซ็นต์ในอาหารไม่ปรับพีเอชและปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ ที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่เหมาะสมคือ 30 35 และ40 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสูงสุดที่เวลา 40 วินาที เท่ากับ 22.55 และ24.61 ในอาหารไม่ปรับพีเอช และปรับพีเอชก่อนฆ่าเชื้อตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพ resting cell มีเปอร์เซ็นต์การย่อยไคตินสูงกว่าเซลล์ปกติ (รูป 4.10-4.11)

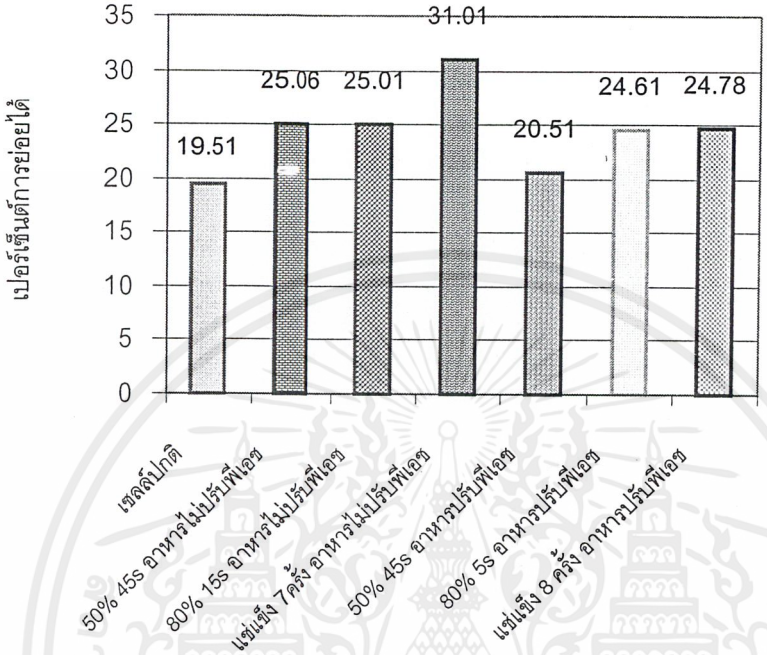
ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ทำการวัดได้ บางสภาวะมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลง ในขณะที่ปริมาณการย่อยไคตินของ resting cell มีค่าสูงขึ้นทุกสภาวะ (รูป 4.12-4.15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



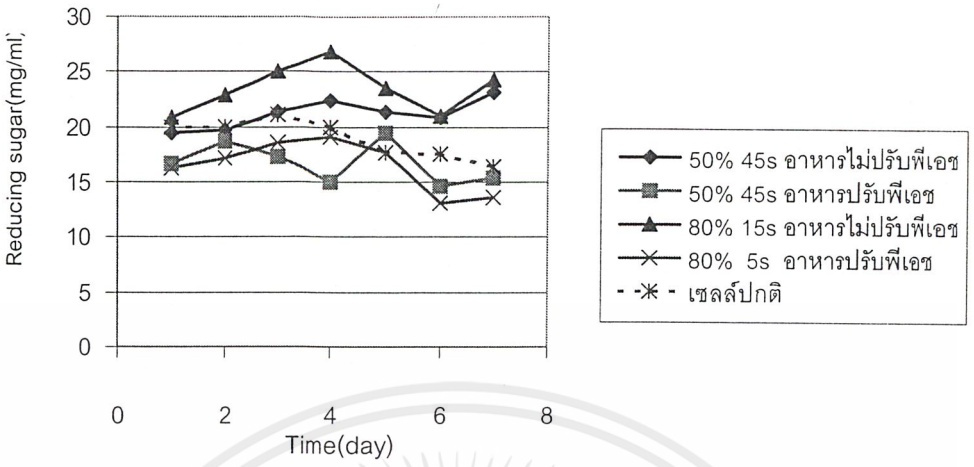
รูปที่ 4.10 การศึกษาการย่อยไคตินด้วยresting cell รหัส19 ที่สภาวะต่างๆ ในอาหารเหลวไคติน ที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อและไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (% digestibility)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

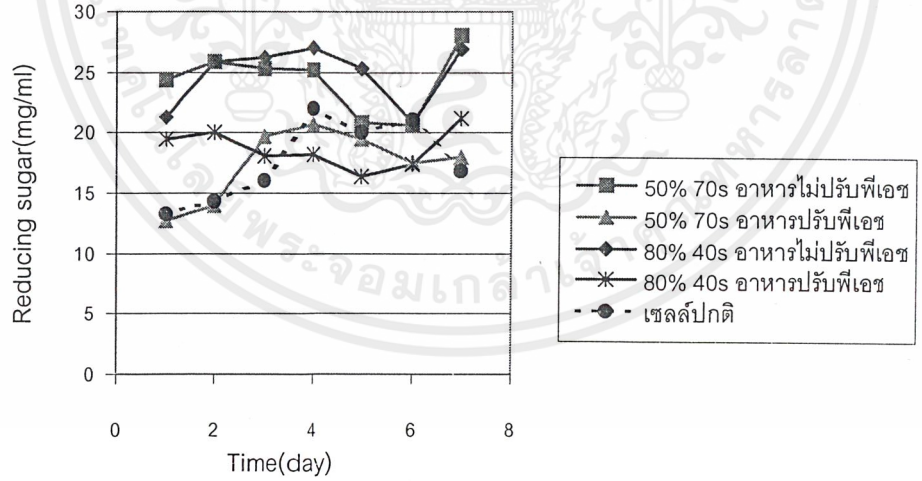


รูปที่ 4.11 การศึกษาการย่อยไคตินด้วยresting cell รหัส18 ที่สภาวะต่างๆ ในอาหารเหลวไคติน ที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อและไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ (%digestibility)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

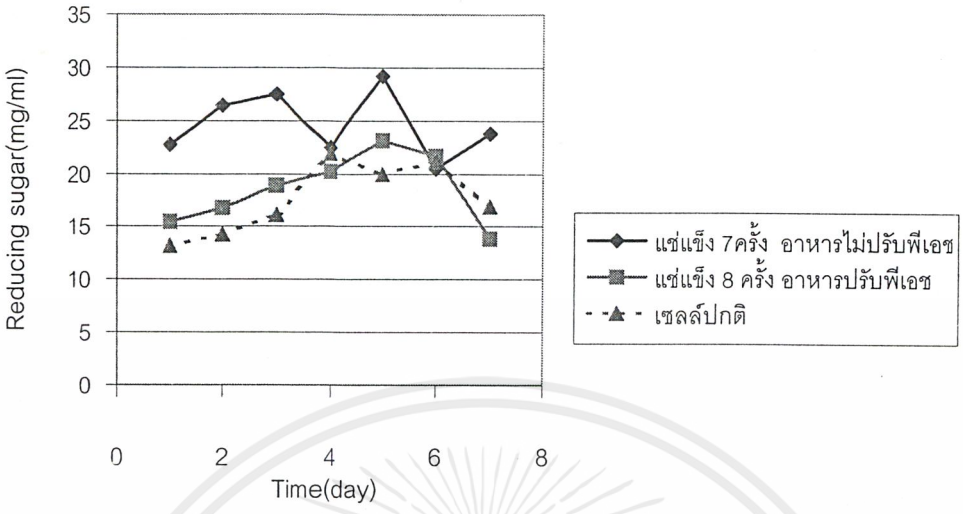


รูปที่ 4.12 การย่อยไคตินด้วย resting cell รหัส18 ที่ผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้ม (Amplitude) 50 และ80เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวไคติน ที่มีการปรับพีเอช ก่อนการฆ่าเชื้อและไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวัน

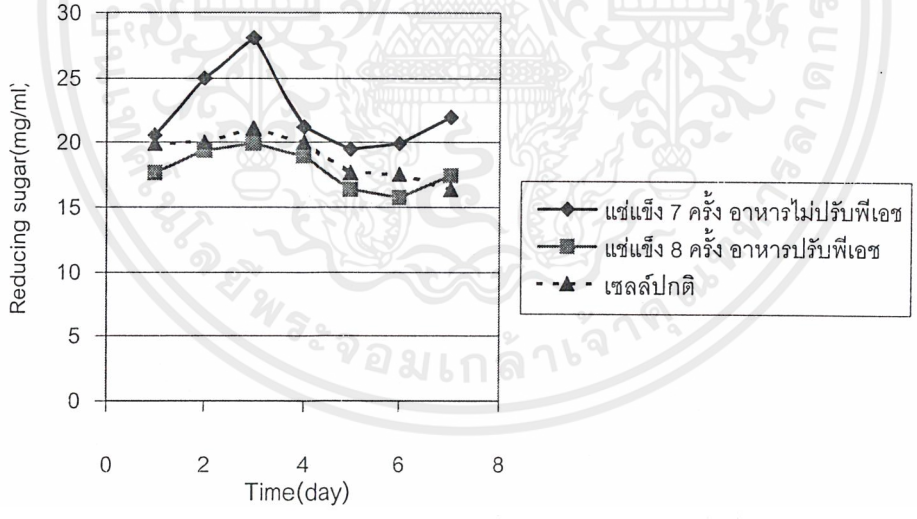


รูปที่ 4.13 การย่อยไคตินด้วยresting cell รหัส19 ที่ผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้ม (Amplitude)50 ละ 80 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวไคติน ที่มีการปรับพีเอช ก่อนการฆ่าเชื้อ และไม่ปรับพีเอช โดยศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวันของ resting cell รหัส19 ที่ผ่านการแช่แข็ง โดยศึกษาจากสภาวะที่ย่อยไคตินได้สูงสุด เปรียบเทียบกับการย่อยของเซลล์ปกติ



รูปที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละวันของ resting cell รหัส18 ที่ผ่านการแช่แข็ง โดยศึกษาจากสภาวะที่ย่อยไคตินได้สูงสุด เปรียบเทียบกับการย่อยของเซลล์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไคติน พบว่า แบคทีเรียรหัส 19 สามารถย่อยสลายไคตินได้ดีที่สุด รองลงมา คือ 18 และ 13 ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรียรหัส 19 18 และ 13 สามารถย่อยสลายไคตินได้เท่ากับ 22.79 19.05 และ15.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซ์ ในแต่ละวัน พบว่ามีสูงสุดในวันที่ 2 และจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ อาจเนื่องมาจากในช่วงวันที่ 2 แบคทีเรียมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าความสารถในการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูง แต่หลังจากวันที่ 2 แบคทีเรียมีอัตราการเจริญสูงขึ้น แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์มีเท่าเดิมหรือลดลง ทำให้เชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ เป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้ในการเจริญ เป็นผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง เพราะฉะนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จะให้ความสำคัญกับแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคตินได้ดี มากกว่าที่จะดูปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดขึ้น

ได้คัดเลือกแบคทีเรียรหัส 19 และ18 เพื่อเตรียมเซลล์ให้เหมาะสมต่อการเตรียมเป็น resting cell โดยหาระยะเวลาที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid log phase คือ ชั่วโมงที่ 7 เพราะว่าเซลล์ระยะนี้ผนังเซลล์ยังไม่สมบูรณ์ สามารถถูกทำให้บาดเจ็บได้ง่าย เหมาะที่จะใช้ช่วงนี้ทำเป็น resting cell ซึ่งในการทำเป็น resting cell นั้นจะใช้วิธีทางกายภาพ คือ การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงและการแช่แข็งเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำเป็น resting cell ซึ่งได้ผลดังนี้

เชื้อจุลินทรีย์รหัส 18 ที่ทำเป็น resting cell โดยการแช่แข็ง 7 8 และ 9 ครั้ง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ เวลา 35 40 และ 45 วินาที และที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ เวลา 5 10 และ15 วินาที

เชื้อจุลินทรีย์รหัส 19 ที่ทำเป็น resting cell โดยการแช่แข็ง 7 8 และ 9 ครั้ง และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ที่ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ เวลา 65 70 และ 75 วินาที และที่ความเข้ม 80 เปอร์เซ็นต์ เวลา 30 35 และ40 วินาที

โดยที่ภาวะทั้งหมดนี้ได้ศึกษาควบคู่กับการย้อมสีเซลล์ และการเจริญบนอาหาร NA ซึ่ง resting cell นั้นต้องเป็นเซลล์ที่ไม่ติดสีย้อม ไม่เจริญบนอาหารแข็ง NA เป็นผลมาจากผนังเซลล์สูญเสียคุณสมบัติการเพิ่มจำนวน เมื่อมีการนำ resting cell ในสภาวะต่างๆนี้ไปศึกษาการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคตินในอาหารเหลวไคตินที่มีการปรับพีเอชก่อนการฆ่าเชื้อและไม่ปรับพีเอช พบว่า เชื้อจุลินทรีย์รหัส 18 ที่ทำเป็น resting cell โดยการแช่แข็ง 7 ครั้ง สามารถย่อยสลายไคตินในอาหารเหลวไคตินที่ไม่ปรับพีเอช สูงสุด คือ 31.06 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์รหัส 19 ที่ทำเป็น resting cell โดยผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง ความเข้ม 50 เปอร์เซ็นต์ เวลา 70 วินาที สามารถย่อยไคตินในอาหารเหลววไคตินที่มีการปรับพีเอชได้สูงสุด คือ 25.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง resting cell รหัส 19 และ 18 นั้นสามารถย่อยสลายไคตินได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นั้น ไม่ได้เป็นตัวบ่งบอกว่าแบคทีเรียนั้นมีประสิทธิภาพสูง เพราะว่าบางสภาวะย่อยสลายไคตินได้สูง แต่น้ำตาลรีดิวซ์กลับลดลง เป็นผลมาจากวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ นั้นจะใช้วิธี Somogyi-Nelson ซึ่งสามารถตรวจวัดได้แต่น้ำตาลรีดิวซ์ที่เป็นโมโนเมอร์ ส่วนโอลิโกเมอร์อื่นๆ ไม่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งการย่อยไคตินของแบคทีเรียไม่จำเป็นว่าต้องได้น้ำตาลโมโนเมอร์เสมอไป ฉะนั้นเราจึงคำนึงถึงปริมาณไคตินที่แบคทีเรียสามารถย่อยได้เป็นหลัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิเคราะห์ชนิดของสารที่ถูกย่อยได้ ว่ามีสารโมโนเมอร์ เตตราเมอร์ หรือโอลิโกเมอร์ อะไรบ้าง โดยการใช้เครื่อง HPLC
2. อาจมีภาวะอื่นๆที่เหมาะสมต่อการเตรียมเป็น resting cell ซึ่งก็ควรจะมีการศึกษากันต่อไป
3. จุลินทรีย์อีกหลายชนิดสามารถย่อยสลายไคตินได้ ซึ่งสามารถนำผลจากการทดลองนี้ไปใช้อ้างอิง และศึกษากันต่อไปเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

รัฐ พิชญางกรู . การผลิตไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์ . วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . (2544).

รัตนา รุจิรวนิช . การผลิตไคตินและไคโตซาน . ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . (2544).

สุวลี จันทร์กระจ่าง . การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน . แผนกเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีแห่งชาติ . (2544).

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

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

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

Krairak, S. and Buddha N. The production of short chitin oligomers by chitinolytic microorganism. 5th Asia Pacific chitin chitosan symposium and exhibition. 132.

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

Muzzarelli, R. and E. Cabib. Chitin. Pergamon Press. New York. , (1977) 55-181.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

1. อาหารเหลวไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย

ไคติน	1.0 เปอร์เซ็นต์
ยีสต์สกัด	0.3 เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมไนเตรต	1.0 เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	

2. อาหารแข็งไคติน ประกอบด้วย

ไคติน	1.0 เปอร์เซ็นต์
ยีสต์สกัด	0.15 เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมไนเตรต	1.0 เปอร์เซ็นต์
ผงวุ้น	1.5 เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	

3. อาหารทดสอบ resting cell ประกอบด้วย

เปปโตน	5.0 กรัม
เนื้อสกัด	3.0 กรัม
ผงวุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

4. อาหารเหลวใช้ทำหัวเชื้อ ประกอบด้วย

เปปโตน	5.0 กรัม
เนื้อสกัด	3.0 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson

การเตรียมสารละลาย A

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71.0 กรัม

โซเดียมโปแตสเซียม ทาร์เทรต 40.0 กรัม

น้ำกลั่น 700.0 มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันแล้วเติม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล 100.0 มิลลิลิตร

คอปเปอร์ซัลเฟต เพนทาไฮเดรต 10.0 เปอร์เซ็นต์ 80.0 มิลลิลิตร

ทำให้ร้อนแล้วเติม

โซเดียมซัลเฟต 180.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้าย 1,000.0 มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมงก่อนใช้ ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนใช้

การเตรียมสารละลาย B

แอมโมเนียมโมลิบเดท เตตราไฮเดรต 53.2 กรัม

น้ำกลั่น 900.0 มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันแล้วเติม

กรดซัลฟิวริคเข้มข้น 42.0 มิลลิลิตร

โซเดียมอาร์ซิเนท เฮปทาไฮเดรต 50.0 มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson (1952)

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที
3. ทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย B 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

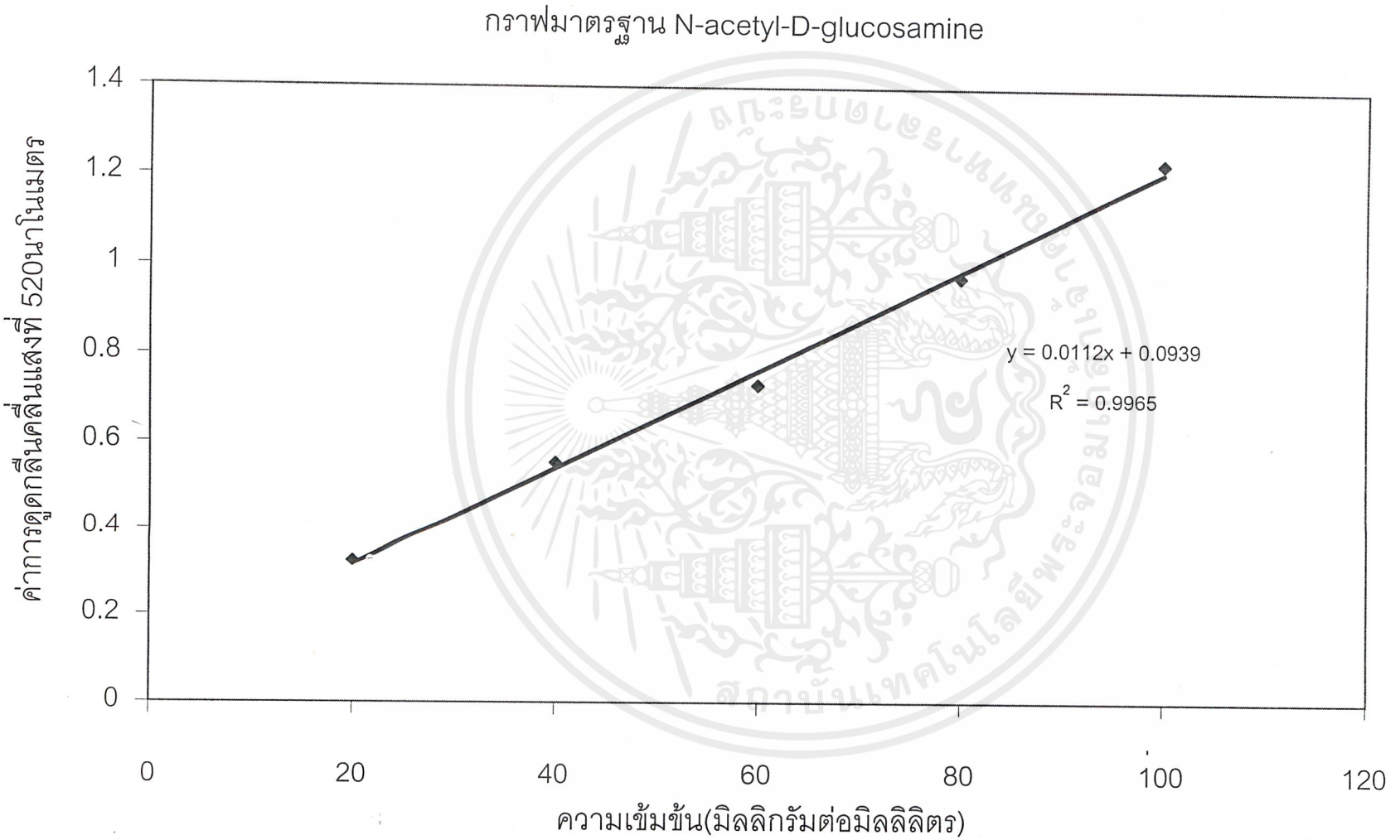
การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอ็นอะซิติล กลูโคซามีน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอ็นอะซิติล กลูโคซามีนให้มีความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

3. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้