สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการเจริญ และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสของ *Serratia marcescens* TISTR 1354

T 043960

นายโฆษิต สุขสมจิตร
นางสาวนวลพรรณ หรุ่มเรืองวงษ์
นางสาวอัจฉรา ควรประเสริฐ

เลขหมู่ 2544
เลขทะเบียน 43960
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545
b
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studies on growth of *Serratia marcescens* TISTR 1354 and Chitinolytic Enzyme actiivties

Mr. Kosit Suksomjit
Miss Nualphan Roomruangwong
Miss Atchara Kuanprasert

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment
for the Degree of Bachelor of Science
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang
Academic year 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของ *Serratia marcescens* TISTR 1354
โดย	นายโฆษิต สุขสมจิตร
	นางสาวนวลพรรณ หรุ่มเรืองวงษ์
	นางสาวอัจฉรา ควรประเสริฐ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ประสิทธ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

_____ กรรมการ

(ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ประสิทธ์ ดีวัฒนวงศ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการเจริญเติบโต และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส ของ *Serratia marcescens* TISTR 1354

โดย นายโฆษิต สุขสมจิตร
นางสาวนวลพรรณ หรุ่มเรืองวงษ์
นางสาวอัจฉรา ควรประเสริฐ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่สร้างจาก *Serratia marcescens* TISTR 1354 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ไคตินและอนุพันธ์ของไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ พบว่าเมื่อใช้สวอลเลน ไคติน (Swollen chitin) เป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวในกระบวนการผลิตจะทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไคติเนส และให้ค่ากิจกรรมที่สูง โดยที่ถ้าใช้สวอลเลน ไคติน เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดเท่ากับ 0.437 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเมื่อใช้สวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 8.5 มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.2248 ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title	Studies on growth of *Serratia marcescens* TISTR 1354 and Chitinolytic Enzyme activities.	
Name	Mr.Kosit	Suksomjit
	Miss Nualphan	Roomruangwong
	Miss Atchara	Kuanprasert
Special Project Advisor	Assistant professor Aree	Rittiboon
Special Project Co – advisor	Mr. Prasit	Dewatthanawong
Department	Applied Biology	
Acadamic Year	2001	

Abstract

From the studies on chitinase activity of *Serratia marcescens* TISTR 1354 ,a bacteria capable of using chitin and chitin derivatives as carbon sources, found that when swollen chitin was used as sole carbon source, the chitinase could be produced and the highest activity (0.437 U/ml) was obtained when the concentration of the swollen chitin was 10 g/l . It was also found that the initial pH of the liquid medium of the swollen chitin had no significantly effects on the enzyme activity, therefore the suitable pH should be 8.5 as it gave the highest specific growth rate (0.2248 hr^{-1}) of the bacterium.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จบรรลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และอาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ซึ่งให้ความรู้ และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทาน แก้ไขและปรับปรุงโครงงานพิเศษมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ อันเป็นประโยชน์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านผู้ซึ่งคอยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองและเจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกท่าน ตลอดจนป้าชูศรีแม่บ้านประจำภาควิชา

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก.
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข.
กิตติกรรมประกาศ	ค.
สารบัญ	ง.
สารบัญภาพ	จ.
สารบัญตาราง	ช.
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์	22
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก ก.	44
ภาคผนวก ข.	46
ภาคผนวก ค.	48
ภาคผนวก ง.	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของไคติน (1) และเซลลูโลส (2)	4
2	ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซน	8
3	การนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาใช้ประโยชน์	13
4	ลักษณะของแบคทีเรียจีนัส Serratia	16
5	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด – ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน	24
6	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด – ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน	25
7	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลวเมื่อมี ไคติน และ สวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน	26
8	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 4.0 กรัมต่อลิตร	28
9	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลนไคตินเป็น 6.0 กรัมต่อลิตร	29
10	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 8.0 กรัมต่อลิตร	30
11	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 10.0 กรัมต่อลิตร	31
12	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลว เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 7.0	34
14	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 7.5	35
15	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 8.0	36
16	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 8.5	37
17	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 9.0	38
18	ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลว ซึ่งแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	39
19	กราฟมาตรฐานน้ำตาล N –acetyl – D - glucosamine	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	การใช้ประโยชน์จากไคตินและอนุพันธ์	5
2.	ชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส	11
3.	จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน	51
4.	ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน	
5.	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	51
6.	สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	52
7.	ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	53
8.	จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน เท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	55
9.	ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน เท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	55
10.	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ สวอลเลน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	56
11.	สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของ สวอลเลน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	56
12.	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ กรัมต่อลิตร	57
13.	ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อเมื่อแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14.	จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้น เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	60
15.	ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้น เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	60
16.	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	61
17.	สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	61
18.	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ไคตินเป็นสารโฮโมโพลิเมอร์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ประกอบด้วย N - acetyl - D – glucosamine มาต่อกันด้วยพันธะ β - 1,4 – glycosidic (Muzzarelli, 1997) พบมากในเปลือกของสัตว์ทะเลเช่น กุ้ง ปู และหอย นอกจากนี้ยังพบได้ในผนังเซลล์ของพืช รา และยีสต์ (อุดมชัย, 2535 ; Austin และคณะ, 1981) ในปัจจุบันแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินและอนุพันธ์ของไคติน คือของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล (Carroad และ Raymond, 1978 ; Knorr, 1984) และเนื่องจากว่าไคตินเป็นสารที่มีอยู่และเกิดขึ้นในธรรมชาติ จึงเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม เพราะสามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติจนกลายเป็นปุ๋ยและสารอินทรีย์ (อุดมชัย, 2535) เอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินได้คือไคติเนสซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่แหล่งที่สำคัญในการผลิตส่วนใหญ่จะได้จากจุลินทรีย์ (Jeuniaux, 1996 ; Muzzarelli, 1977) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ไคตินจะถูกไฮโดรไลส์ (hydrolyse) ไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ และโมเลกุลที่ถูกย่อยนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำออกสู่ตลาดได้ โดยนำไปเป็นอาหารของยีสต์เพื่อผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวและใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป รวมถึงประโยชน์ในด้านการกำจัดของเสียและการนำมาใช้การควบคุมทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่นการนำเอนไซม์ไคติเนสมากำจัดลูกน้ำยุงที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เป็นต้น และในปัจจุบันยังคงมีผู้ทำการวิจัยเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณสูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยใช้ย่อยไคตินและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีคุณค่าหรือราคาแพง ซึ่งเป็นการลดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมและนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล เช่นเปลือกกุ้งหรือปูมาเปลี่ยนเป็นของที่มีคุณค่ามากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Serratia marcescens* TISTR 1354 ที่สัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ไคติเนส
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสโดย *Serratia marcescens* TISTR 1354

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสโดย *Serratia marcescens* TISTR 1354 ในระดับฟลาสก์เขย่า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Serratia marcescens* TISTR 1354 ให้ดียิ่งขึ้น และเพื่อการประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้มากขึ้นในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

โครงสร้างของไคติน

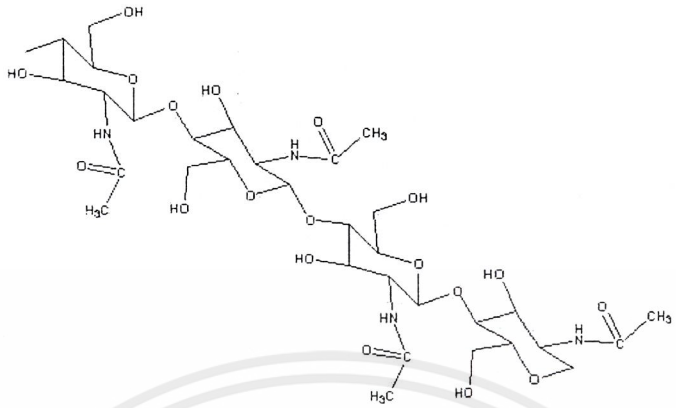
ไคติน (poly-β-(1,4)-N-acetyl-D-glucosamine) เป็นสารโพลิเมอร์ประเภทคาร์โบไฮเดรต มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็นกลุ่ม NH-CO-CH_3 แทนที่จะเป็นกลุ่มไฮดรอกซิล (–OH group) ดังในเซลลูโลส (Carroad และ Tom, 1978) ไคตินเป็นสารโมเลกุลยาวที่ไร้ประจุ (non-electric polymer) ทำให้ไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) (ฉกามาศ, 2529; วิสิฐ และลูกจันทร์, 2533) แต่ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดบางชนิด เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน และกรดฟอสฟอริก เป็นต้น (อุดมชัย, 2535; Deshpande, 1986) ไคตินประกอบด้วยไฮโดรเจน 6.5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอน 47.3 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 6.9 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 39.4 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณ สูตรโมเลกุลคือ $(C_3H_{13}NO_5)_n$ (อุดมชัย, 2535)

เนื่องจากไคตินเป็นสารที่ไม่ละลายในสารละลายทั่วไป การใช้ประโยชน์จึงไม่แพร่หลายนัก แต่สามารถดัดแปลงไคตินโดยวิธีการทางเคมีเพื่อเพิ่มประโยชน์ในการใช้งานให้มากขึ้น คือการผลิตไคโตแซน (chitosan: poly-β-(1,4)-2-amino-deoxy-D-glucan) ซึ่งสามารถผลิตได้โดยแยกเอากลุ่มอะซิติลออก (Deacetylation) จากไคตินด้วยด่างเข้มข้น เมื่อพิจารณาสูตรโครงสร้างของไคโตแซนแล้วจะเห็นว่าไคโตแซนมีประจุบวกในกลุ่มอะมิโน ทำให้ไคโตแซนละลายได้ในสารละลายหลายชนิดที่มีความเป็นกรดจึงทำให้มีการใช้ประโยชน์จากไคโตแซนสูงกว่าไคติน (วิสิฐ และ ลูกจันทร์, 2533) โครงสร้างของไคติน และเซลลูโลส แสดงในภาพที่ 1

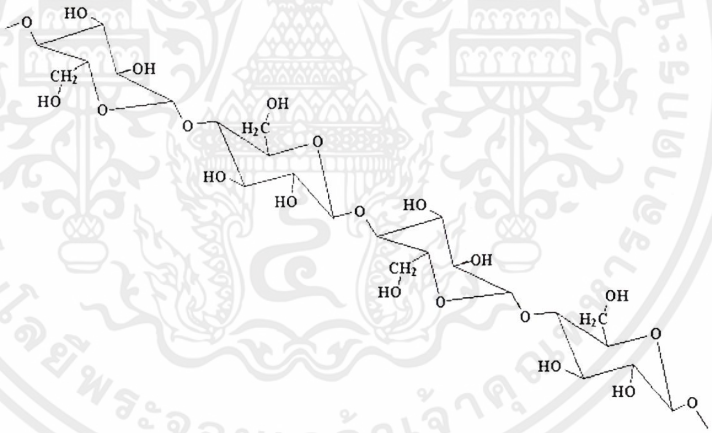
การใช้ประโยชน์จากไคติน และอนุพันธ์แสดงในตารางที่ 1 และ Knorr (1984) ได้สรุปถึงศักยภาพการใช้ประโยชน์ของไคโตแซนในอุตสาหกรรมอาหารไว้ 3 ประการคือ

1.) ใช้ในการผลิตหรือเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหาร
2.) ใช้เป็นสารตกตะกอน
3.) ใช้เป็นสารโมเลกุลยาวชนิดใหม่เพื่อประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีพอลิเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(1)



(2)

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ

(1) ไคติน

(2) เซลลูโลส

ที่มา : Ornum (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากไคตินและอนุพันธ์

อุตสาหกรรม	การใช้งาน
1. สิ่งทอและแผ่นฟิล์ม	เส้นใย
	เมมเบรน
2. กระดาษและเยื่อกระดาษ	
3. โลหะ	การนำอิออนของโลหะและอโลหะกลับมาใช้ใหม่
4. โพลิเมอร์กึ่งสังเคราะห์	copolymers of glucosamine
	optically active polymers
5. สารฆ่าเชื้อรา	ใช้กับดินและพืช
6. ชีวเคมี	สารยับยั้งการเกิดโคเลสเตอรอล
	อุตสาหกรรมอาหารและเอนไซม์
	สารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด
	ช่วยรักษาบาดแผลให้หายเร็วขึ้น
	รักษาโรคผิวหนัง
7. ศัลยกรรม	N-acetylglucosamine
8. ยา	glucosamine

ที่มา : Deshpande (1986)

การใช้ประโยชน์ไคตินในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

ไคตินมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตกระดาษเนื่องจากการเพิ่มไคตินเพียง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ลงในเยื่อกระดาษจะเพิ่มความทนทานของกระดาษและเร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ และเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่เหลือเมื่อทำเป็นแผ่นกระดาษแล้ว ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ รวมทั้งยังประหยัดพลังงานที่ใช้ตีเยื่อกระดาษได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ กระดาษที่ผสมไคตินจะมีความแข็งแรง ขณะเปียกดีขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงช๊อปปิ้งและกระดาษเช็ดมือ (Deshpande, 1986; ธีระพล, 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ประโยชน์ไคตินในทางการแพทย์

ใช้ในการเร่งการรักษาบาดแผล คือ แผ่นเส้นใยฟองน้ำ และด้ายเย็บแผลที่ทำมาจากไคติน จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากกระดูกอ่อน และใช้ผลิตไคโตแซนที่มีประสิทธิภาพ ใช้ประโยชน์ในการเพิ่มความรวดเร็วในการรักษาบาดแผล ผ่าตัดและไฟไหม้ ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ หลายรูปแบบ เช่น เป็นผง สารข้นเหนียว สารละลายฟิล์ม เส้นใยผลิตภัณฑ์แต่งแผล ทำน้ำยาทารักษาแผล ด้ายเย็บแผล เป็นต้น (ธีระพล, 2534)

การใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ

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

คุณสมบัติของไคติน

ไคตินเป็นสารให้ความแข็งแรงแก่เปลือกสัตว์จำพวกกุ้ง หอย ปู และแมลง รวมทั้งยังเป็นองค์ประกอบของชิ้นส่วนขากรรไกร และกระดูกสันหลังของสัตว์จำพวกไส้เดือน เนื่องจากไคตินเป็นองค์ประกอบอินทรีย์ในโครงสร้างภายนอกที่สำคัญ เพราะเป็นตัวทำให้โครงสร้างยึดกันเป็นรูปและคงสภาพแข็งแรงพอที่จะใช้เป็นเครื่องป้องกันตัวจากการทำร้ายของสัตว์อื่น ๆ ไคตินไม่ละลายในตัวทำละลายเช่น น้ำ หรือ แอลกอฮอล์ และมักเกาะกับโปรตีนเกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนขนาดใหญ่ ไคตินของสัตว์ชนิดเดียวกันอาจมีลักษณะของโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น ความยาวของสายโซ่โมเลกุลรูปแบบของผลึก และจำนวนหมู่อะซิติล ไคตินจะมีลักษณะบางเบา จึงได้มีการนำมาใช้แทนสารส้มสำหรับการตกตะกอนได้เป็นอย่างดี แต่ไม่เป็นอันตรายต่อคนเหมือนสารส้ม สามารถสลายตัวได้เอง บางแห่งมีการนำมาใช้ในการจับตะกอนเงินและทอง เพราะเมื่อเผาทิ้งจะระเหยไป (ฉกามาศ, 2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของไคติน

ไคตินพบได้ตามผนังเซลล์ของพืชและสัตว์ โดยในพืชบางชนิดอาจมีไคติน แทนเซลลูโลสหรือเกิดร่วมกับเซลลูโลส ในสัตว์จะพบไคตินมากในเปลือกของสัตว์ในตระกูล Crustaceae เช่น กุ้ง ปู หอย ปลาหมึก แมลง (อุดมชัย, 2535; Austin และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราหลายชนิด โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของสปอร์ และเส้นใยของเชื้อราในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่ในสัตว์พบไคตินอยู่กับคิวติเคิ้ล (cuticle) ที่ผิวหนังของอิพิธีเลี่ยม (epithelium) ในยีสต์พบในส่วนที่กำลังแตกหน่อของยีสต์ที่ใช้ทำเบียร์และไวน์ (Cody และคณะ, 1990) ในสาหร่ายบางชนิด (Muzzurelli, 1977) นอกจากนี้ยังพบในเห็ดหลายชนิด (อุดมชัย, 2535)

ปัจจุบันแหล่งของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินที่มีราคาถูก คือ จากเปลือกกุ้งและปู ที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (วิสิฐ และลูกจันทร์, 2533) โดยกุ้งจะมีไคติน 14 - 27 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และปูมีไคติน 13 - 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Deshpande, 1986; Moiseeve, 1981) ในต่างประเทศจึงมีการผลิตไคตินจากเปลือกกุ้ง และปูที่เหลือทิ้งเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย

แหล่งสำคัญของไคตินจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลโดยเฉพาะในขบวนการแปรรูปกุ้ง (ฉกามาศ, 2529) และปูโดยของเสียที่เหลือจากขบวนการแปรรูปกุ้งส่วนใหญ่จะเป็นไคตินแคลเซี่ยมคาร์บอเนต และโปรตีน (Young และคณะ, 1985) นอกจากนี้ในเชื้อราบางชนิดพบไคติน 22 - 44 เปอร์เซ็นต์ บางชนิดอาจมีน้อยหรือมากกว่านี้ เช่น *Schizophyllum commune* มีไคติน 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Allomyces macrogynus* หรือ *Sclerotium rolfsii* พบถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ในสาหร่ายสีเขียวพบ 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน arthropods molluses coelenterates และ nematodes พบประมาณ 25 - 50 เปอร์เซ็นต์ของคิวติเคิ้ล (Deshpande, 1986)

ขั้นตอนการนำของเสียจากขบวนการแปรรูปกุ้งและปูในอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาผลิตเป็นไคตินและไคโตแซนคือ ขั้นแรกจะนำกากเหลือทิ้งมาบดให้ละเอียดผสมกับสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อสกัดเอาโปรตีนออก จากนั้นล้างน้ำ และสกัดแคลเซี่ยมคาร์บอเนตด้วยกรดเกลือที่เจือจางประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชะล้างเอาแคลเซี่ยมคาร์บอเนตออกไปในรูปของแคลเซี่ยมคลอไรด์ นำไปล้างน้ำและทำให้แห้งจะได้ไคตินออกมา จากนั้นนำไคตินที่ได้ดึงเอากลุ่มอะซิทิล (acetyl group) ออก หรือเรียกว่าขั้นตอน deacetylation โดยใช้สารละลายด่าง (40 - 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ร้อน จากนั้นล้างน้ำและทำให้แห้งจะได้ไคโตแซน ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซนได้สรุปไว้ในภาพที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซน

ที่มา : Knorr (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยไคติน

เนื่องจากไคตินเป็นสารที่มีอยู่และเกิดขึ้นในธรรมชาติเช่นเดียวกับเซลลูโลส ไคตินจึงเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะด้านสิ่งแวดล้อม เพราะไคตินจะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการในธรรมชาติกลายเป็นปุ๋ย และสารอินทรีย์ในพื้นดิน พื้นน้ำ วนเวียนอยู่เช่นนี้ ซึ่งจัดเป็นทั้งข้อดีและข้อได้เปรียบของไคตินในการจะนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

ไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนสได้ผลผลิตสุดท้ายคือ N-acetylglucosamine (NAG) (Jeuniaux, 1966) เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด Bernard (1991) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสเป็นส่วนสำคัญในการทนความร้อนและป้องกันการกระจายของเชื้อราที่เป็นโรคของหัวกล้วยไม้ ต่อมา Karrer และ Hofmann (1929) พบเอนไซม์นี้ในหอยทาก หลังจากนั้นจึงได้มีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนสมากขึ้น (Jeuniaux, 1966) เอนไซม์ไคติเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืช (Monreal และ Reese, 1969; Deshpande ,1986) สามารถพบเอนไซม์ไคติเนสได้ในเมล็ดถั่ว *Phaseolus vulgalis* และใน emulsin ของ sweet almonds นอกจากนี้ Poening และ Irzykiewicz (1965) ยังพบในกระหล่ำปลี ข้าวสาลี และ waratah

Monreal และ Reese (1969) และ Deshpande (1986) พบเอนไซม์ไคติเนสในส่วนต่าง ๆ ของสัตว์หลายชนิด เช่น ในหอยทาก ครัสเตเชียน (crustacean) แมลง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เช่น โปรโตซัว ซีเลนเตอเรต (coelenterates) หนอนตัวกลม หอย และปลาหมึก ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลากินแมลง สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลื้อยคลานพบว่า ไคติเนสจะหลั่งออกมาจากตับอ่อน เนื้อเยื่อชั้นในสุดของกระเพาะอาหาร (gastric mucosa) นอกจากนี้ยังพบไคติเนสในเนื้อเยื่อชั้นในสุดของกระเพาะอาหารของนกกินแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไคติเนสยังถูกหลั่งออกมาจากผิวหนังชั้นนอกของหนอนตัวกลมในระหว่างการฟักไข่ หรือออกมาจากผิวหนังชั้นนอกของกุ้ง ปูในระหว่างการลอกคราบ

ข้อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชและจุลินทรีย์

1. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชต้องใช้พื้นที่มาก ทำให้ไม่สะดวกต่อการควบคุมสภาวะแวดล้อม รวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ต่างจากการผลิตโดยจุลินทรีย์ซึ่งสามารควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย เสียค่าใช้จ่ายน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับ ฤดูกาล แต่การผลิตโดยใช้จุลินทรีย์จะให้ผลผลิตที่คงที่

3. การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่าจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ในจุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไคติเนสที่สำคัญ และได้พบเอนไซม์นี้ได้ในจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ จากรายงานของ Deshpande (1986) พบไคติเนสในแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Serrtia* sp. , *Pseudomonas* sp. , *Clostridium* sp. , *Aeromonas* sp. , *Klebsiella* sp. และพบ ไคติเนสในเชื้อรา เช่น *Trichoderma* sp. , *Penicillium* sp. , *Mucor* sp. ในยีสต์พบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Correa และคณะ, 1982)

Moreal และ Reese (1969) รายงานการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในจุลินทรีย์และพบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุด คือ *Serratia marcescens* QM B1466 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส (Ohtakara และคณะ ,1978) แสดงดังตารางที่2 และได้พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไคติเนสแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ยกเว้นจุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ไคติเนสอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) เช่น *Mucor mucedo* (Gooday และคณะ, 1986) และ *Saccharomyces cerevisiae* (Elango และคณะ, 1982) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ชนิดของจุลินทรีย์	สกุล
Scizomycetes	
Pseudomodales	*Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Photobacterium*
Eubacteriales	*Chromobacterium, Archromobacter, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Micrococcus, Clostridium, Corynebacterium, Arthrobater, Bacillus, Erwinia*
Actinomycetales	*Actinomyces, Streptomyces*
Myxomycetes	*Cytophaga*
Phycomycetes	*Chytriomyces, Phycomyces*
Ascomycetes	*Aspergillus*
Basidiomycetes	*Lycoperdon, Irpex, Trametes, Coprinus, Beauveria*
Fungi imperfecti	*Trichoderma*

ที่มา : Ohtakara และคณะ (1978)

ชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยไคติน

Shaikh และ Deshpande (1993) แบ่งเอนไซม์ที่ย่อยไคตินเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ endo-chitinase (EC 3.2.1.14) และ chitobiase หรือ N-acetyl glucosaminidase (EC 3.2.1.30) หรือ N-acetyl hexosaminidase (EC 3.2.1.52) แต่ Robbins และคณะ (1988) แบ่งเอนไซม์ย่อยไคตินออกเป็น 3 ชนิดคือ

1. endo-chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มได้ diacetylchitobiose และ triacetylchitotriose เป็นส่วนใหญ่
2. chitobiase จะย่อย dimer หรือ diacetylchitobiose หรือย่อยไคตินทีละหนึ่งหน่วยจากปลาย non reducing เป็น N-acetyl-glucosamine (NAG)
3. exo-chitinase จะย่อย diacetylchitobiose หรือไคตินจากปลาย non reducing ทีละหนึ่งหน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reid และ Ogrydziak (1981) รายงานว่าไคติเนสที่ได้จาก *Serratia marcescens* มีระบบการทำงานในการย่อยไคตินเป็น NAG 2 ขั้นตอน คือ endo-chitinase (poly-β-(1,4)-(2-acetamido-2-deoxy) – D - glucoside glycanhydrolase) (EC 3.1.1.14) จะย่อยไคตินได้สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และ N,N - diacetylchitobiose เป็นส่วนใหญ่ chitobiase acetylamido deoxyglucohydrolase (EC 3.2.1.29) จะย่อยสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำและไคโตไบโอสเป็น NAG

ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยไคติน

เอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่าง ๆ ได้มากมายดังนี้

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

ขั้นที่1 จะนำของเสียจากโรงงานมาผ่านกระบวนการเตรียมโดยการทำให้แห้ง และบดให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาสกัดเอาไคตินออกโดยใช้กระบวนการทางเคมี ทำการสกัดโปรตีนออกด้วยการต้มกับด่าง และกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกโดยต้มกับกรดเกลือ (HCl)

ขั้นที่2 นำไคตินที่ได้ไปเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ปริมาณมาก จากนั้นกรองแยกเอนไซม์ออก

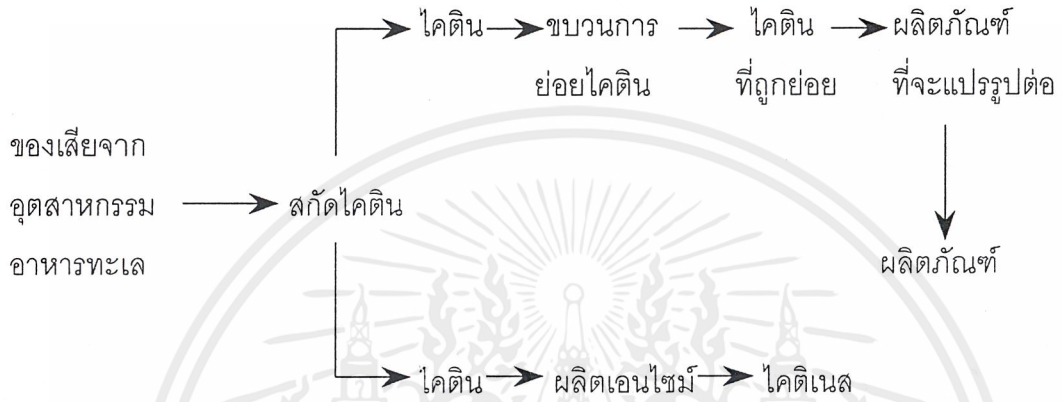
ขั้นที่3 นำเอนไซม์ที่ได้ย่อยไคตินที่เหลือจะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น NAG หรือ ไคโตไบโอส (dimer) กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกจากกากที่เหลือ นำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนสารต่าง ๆ เหล่านั้นให้เป็นของที่มีคุณค่า เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein) เป็นต้น

ขั้นที่4 นำส่วนน้ำมาเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ N-acetylglucosamine หรือไดเมอร์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารที่มีคุณค่ามากขึ้น เช่น โปรตีนเซลล์เดียวหรือเอทธานอล เป็นต้น

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถนำไปใช้ในการย่อยไคติน และได้ผลผลิตสุดท้าย คือ NAG ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทธานอล หรือโปรตีนเซลล์เดียวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ย่อยไคตินที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืช (Sivan และ Chet, 1989) และกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูพืช (Smith และ Grula, 1983) เช่น *Beauveria bassiana* ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น White fly colorado, Patato beatle และ Corn earworm (Heliothis zea) เป็นต้น รวมทั้งยังสามารถใช้ในการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อรา และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาทางเทคโนโลยีของรา (Smith และ Grula, 1983) ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราเพื่อทำ โปรโตพลาสต์ฟิวชั่น (Protoplast fusion) เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสเป็นไมโคเลส (Mycolase) ที่มีบทบาทสำคัญในการเจริญและการแบ่งเซลล์ของรา



ภาพที่ 3 แสดงการนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาใช้ประโยชน์

ที่มา : Carroad และ Tom (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุด

ก. แหล่งคาร์บอน

เอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ส่วนมากเป็นเอนไซม์ชักนำ (Inducible Enzyme) (Monreal และ Reese, 1969; Ohtakara และคณะ, 1979; Vyas และ Deshpande, 1989; Ueda และ Aria, 1992) บางชนิดเป็น Constitutive Enzyme เมื่อเติมไคตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น (Deshpande, 1986) ไคตินและอนุพันธ์ของไคตินหลายชนิดสามารถชักนำ (Induce) ให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น ไคตินใช้อยู่ในรูปสวอเลนไคตินหรือคลอไลดอลไคติน (Collidal chitin) (Monreal และ Reese, 1969; Ohtakara และคณะ, 1979; Vyas และ Deshpande, 1989; Uede และ Aria, 1992) Monreal และ Reese (1969) พบว่าไคโตไบโอสเป็นสับสเตรทที่กระตุ้นให้ *Serratis marcescens* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสแต่ NAG ไม่มีผลในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคติเนส สำหรับ N-acetylglucosamine และไคโตไบโอส สามารถกระตุ้นให้ *Beauveria bassiana* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดี (Smith และ Grula, 1983)

การศึกษาของ Monreal และ Reese (1969) พบว่าจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสจะผลิตเอนไซม์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของไคตินที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียและราคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถ้าเติมยีสต์สกัดลงในอาหารอีก 0.02 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การผลิตเอนไซม์สูงขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์คือ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 7 - 7.5 ค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของรา 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 ค่าความเป็นกรด - ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *S. marcescens* มีค่าเท่ากับ 7.5 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Ohtakara และคณะ (1979) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของแบคทีเรียแกรมลบ No.12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส เปปโตน ยีสต์สกัด โซเดียมคลอไรด์ และคลอไลดอลไคตินพบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อเจริญในอาหารที่มีคลอไลดอลไคติน 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

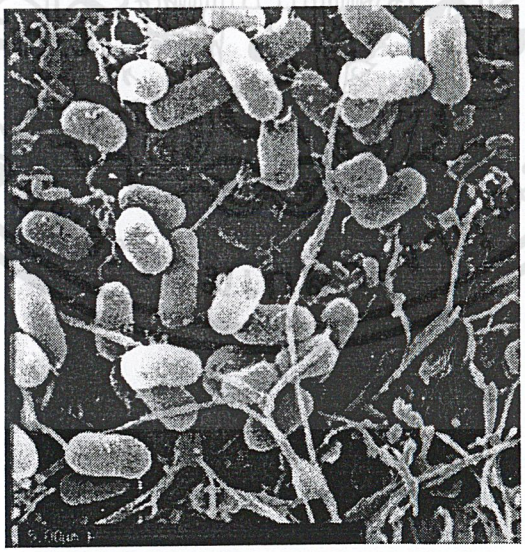
,1991;Takayanagi และคณะ, 1991; Ulhoa และ Peberdy, 1991) และมีแนวโน้มว่าถ้าเพิ่มความเป็นกรด – ด่างสูงขึ้นการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจะลดลง (Wang และคณะ, 1995)

เชื้อแบคทีเรียจีนัส Serratia

แบคทีเรียจีนัส Serratia ปกติพบในดินและในน้ำมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตสได้น้อยมาก ส่วนใหญ่จะสร้างรงควัตถุสีแดงชื่อ Prodigiosin ซึ่งเป็น tripyrd derivative สูตรโครงสร้าง prodigiosin ทางเคมี เป็นที่น่าสังเกตว่ามีส่วนประกอบที่เป็น pyrol ring เหมือนกับที่พบในรงควัตถุชนิดอื่นๆ เช่น Porphyrins และคลอโรฟิลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดพลังงานในสิ่งมีชีวิต แต่ก็ไม่มีหลักฐานว่ารงควัตถุชนิดนี้เกี่ยวข้องในกระบวนการส่งผ่านพลังงานแต่อย่างใด และยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอนของรงควัตถุชนิดนี้

แบคทีเรีย *Serratia marcescens* มีคุณสมบัติเป็น aerobe mesophilic เคลื่อนที่ด้วยแฟรกเจลลา (fragella) ที่อยู่รอบเซลล์ สามารถใช้ทั้งซิเตรดและอะซิเตรดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ สามารถ หมักน้ำตาล กลูโคส เซลโลไบโอส อินโนซิทอล ไกลซีน เป็นสาเหตุให้อาหารบางชนิดเสีย

S. marcescens รูปร่างเซลล์รูปแท่งมีแฟรกเจลลารอบเซลล์ บางสายพันธุ์สร้างแคปซูล เป็นแบคทีเรียแกรมลบทำการหมักกลีเซอรอลได้โดยไม่เกิดก๊าซได้ G-C ประมาณ 53-59 โมลเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 ลักษณะของแบคทีเรียจีนัส Serratia

ที่มา : Reid (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สกุล Serratia มี 7 สายพันธุ์

1. *S. marcescens*
2. *S. ficaria*
3. *S. fonticola*
4. *S. odorifera*
5. *S. phymothica*
6. *S. liquefaciens*
7. *S. rubidaea*

Serratia การหมักส่วนใหญ่เกิดน้ำตาล กลูโคสได้แก๊ส ส่วนใหญ่ไม่ใช้น้ำตาลแลคโตส บางสายพันธุ์ใช้น้ำตาลแลคโตสได้ช้าๆ และบางสายพันธุ์ของ *S. marcescens* สร้างรงควัตถุสีแดงสดได้ การสร้างรงควัตถุเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจนเท่านั้น ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Enterobacter* sp. โดยที่ Serratia มีอยู่ทั่วไปในดินบางครั้งทำให้เกิดโรคในคนได้ จัดเป็นประเภททำให้มีโอกาสเกิดโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โรคติดเชื้อของระบบทางเกิดปัสสาวะ โลหิตเป็นพิษ เป็นต้น (นันทนา, 2537)

คุณสมบัติของ *S.marcescens*

- Deoxyribonuclease ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- Lipase (corn oil)
- Gelatinase ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส
- Lysine decarboxylase – Moeller's
- Ornithine decarboxylase – Moeller's
- รงควัตถุสีแดง ชมพู หรือสีส้ม (26-74 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43960

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

จุลินทรีย์

Serratia marcescens TISTR 1354 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บ stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
2. หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
3. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร
4. ปิเปตต์ขนาด 1.0 , 5.0 และ 10 มิลลิลิตร
5. ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
6. บีกเกอร์ขนาด 50 , 100 , 500 และ 1000 มิลลิลิตร
7. กระบอกตวงขนาด 100 , 500 และ 1000 มิลลิลิตร
8. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
9. ลูปเขี่ยเชื้อ
10. หลอดเซนทริฟิวจ์
11. ขวดดูแรนขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
12. ขวดอาหาร
13. กรวยแก้ว
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. แท่งแก้วคน
16. หลอดหยด
17. ช้อนตักสาร
18. ทิป ขนาด 0.2 ,1.0 และ 5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. ลูกยาง

เครื่องมือ

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง
2. เครื่องชั่งละเอียด
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. ตู้บ่มเชื้อ
5. ตู้อบลมร้อน
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
7. ไมโครปิเปตต์
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง
10. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
12. เครื่องผสมสาร
13. เครื่องคนสาร

สารเคมี

1. ไคติน
2. สวอลเลน ไคติน
3. กรดฟอสฟอริกเข้มข้น
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์
5. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
6. แอมโมเนียมซัลเฟต
7. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
8. เฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต
9. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต
10. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทาไฮเดรต
11. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
12. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต
13. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส
14. แอมโมเนียมโมลิบเดต
15. กรดกำมะถัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. ไดโซเดียมอาร์ซิเนต
17. ยีสต์สกัด
18. ผงวุ้น
19. Nutrient Agar (NA)
20. Nutrient Broth (NB)
21. N – acetyl – D - glucosamine
22. ซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด - ด่าง 6.6)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน15 นาที จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อ *Serratia marcescens* จาก Nutrient Agar slant (NA slant) จำนวน 2 ลูปลงในอาหาร NB ที่เตรียมไว้ นำฟลาสก์ไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5) นำไปเติมลงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ เพื่อทำการทดลองต่อไป

2. การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ ไคติน และ สวอลเลน ไคติน เตรียมตามวิธีของ Monreal และ Reese, (1969)

ทำการเตรียมอาหารเหลวที่มีไคติน และ สวอลเลน ไคติน เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับความเป็นกรด - ด่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 8.5 ตามสูตรของ Ignacio และคณะ, 1982 (ภาคผนวก ก) ชนิดละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) โดยมีปริมาตรอาหารฟลาสก์ละ 95 มิลลิลิตร จากนั้นนำกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 เติมลงในฟลาสก์อาหารเหลวที่มีไคติน และสวอลเลน ไคติน ฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ (ภาคผนวก ค) ณ ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมงต่อมา จนครบ 66 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสตามวิธีของ Somogyi Nelson's, 1952 (ภาคผนวก ค) ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและการเจริญเติบโตที่วัดได้เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุด ซึ่งได้จากการทดลองในข้อที่ 2 มาทำการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 4, 6, 8 และ10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) ปรับความเป็นกรด - ด่างของอาหารเริ่มต้น 8.5 โดยมีปริมาตรอาหารฟลาสก์ละ 95 มิลลิลิตร ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 ฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ (ภาคผนวก ค) ณ ชั่วโมงที่ 0 และทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมงต่อมา จนครบ 66 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสตามวิธีของ Somogyi Nelson's, 1952 (ภาคผนวก ค) ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและการเจริญเติบโตที่วัดได้เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

4. การศึกษาค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเพาะเลี้ยง

นำสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุด ซึ่งได้จากการทดลองในข้อที่ 3 มาทำการแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นเป็น 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 ค่าละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) ใส่กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 ฟลาสก์ละ 5 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ (ภาคผนวก ค) ณ ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมงต่อมา จนครบ 66 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสตามวิธีของ Somogyi Nelson's, 1952 (ภาคผนวก ค) ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 66 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและการเจริญเติบโตที่วัดได้ว่าสูตรอาหารใดให้ค่าสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นไคติน และสวอลเลน ไคติน พบว่าเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 10.0 จะเห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังตารางที่ 7 (ภาคผนวก ง) โดยในอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคติน 6.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 66 คือ 0.199 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าในอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน และจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Moreal และ Reese (1969) ที่ทำการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสจาก *S. marcescens* QMB 1466 ในอาหารเหลวที่มีการแปรผันแหล่งคาร์บอนเป็นไคติน สวอลเลน ไคติน และ milled ไคติน พบว่าในอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และ Moreal และ Reese ยังทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น *Enterobacter liquefaciens* *Aspergillus fumugatus* *Steptomyces* sp. *Mucor substisisimum* *Penicillium lilainum* *Trichoderma viride* และ *Bacillus* sp. ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันแหล่งคาร์บอนเป็นสวอลเลน ไคติน และ milled ไคติน พบว่าในอาหารเหลวที่มี สวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าในทุก ๆ เชื้อ

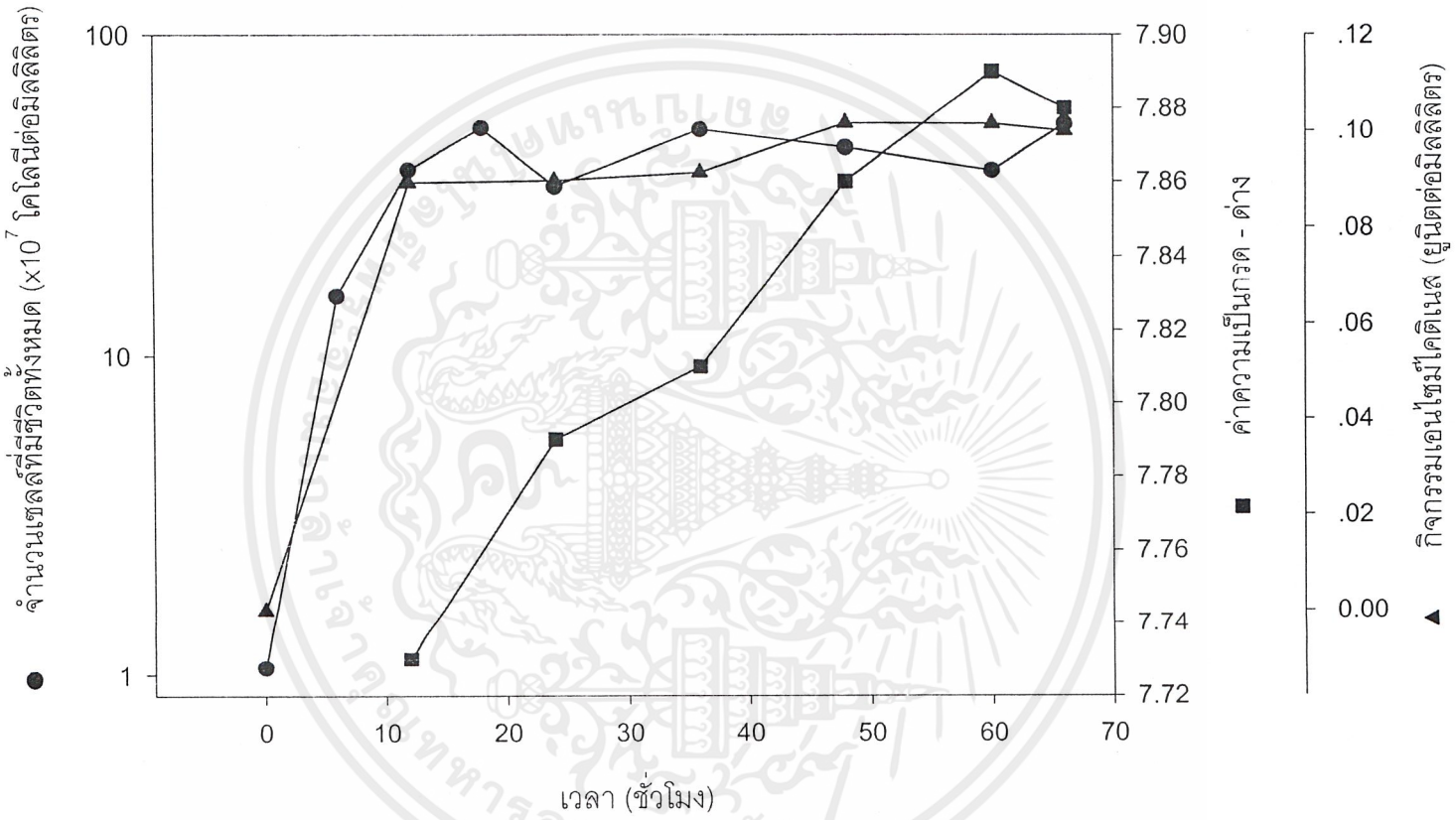
จากกราฟการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าในอาหารที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการเจริญเติบโตสูงกว่าโดยเทียบจาก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ในอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีค่า μ สูงกว่าคือ 0.2582 ส่วนในอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นค่า μ คือ 0.2091 ดังนั้นจึงใช้อาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาขั้นต่อไป

ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเหลวที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงจะอยู่ในช่วงประมาณ 7.40 – 7.60 และ 7.70 – 7.80 ในอาหารที่มีไคติน และสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่ง

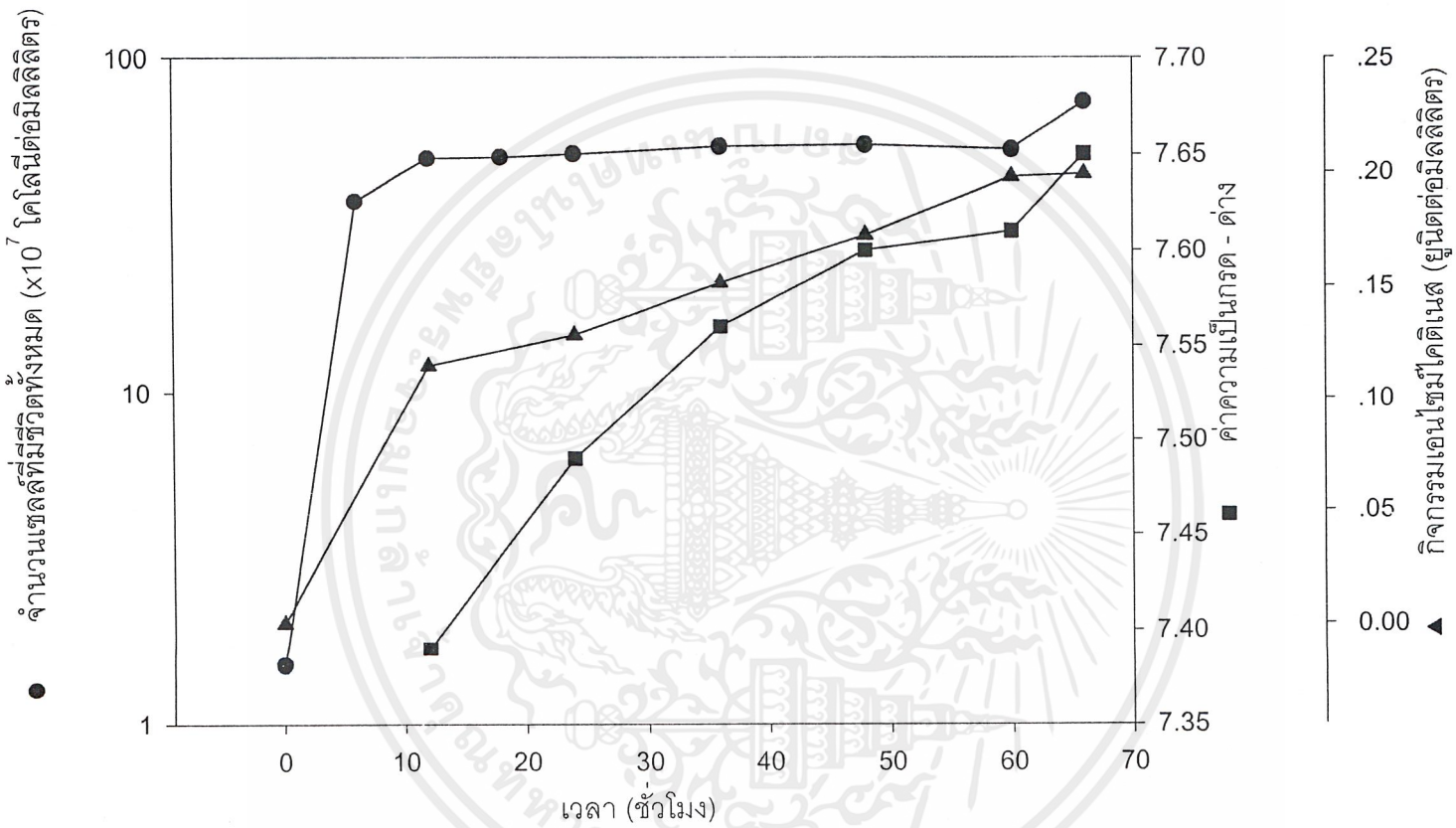
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนตามลำดับ เนื่องมาจากเป็นช่วงค่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสนั่นเอง

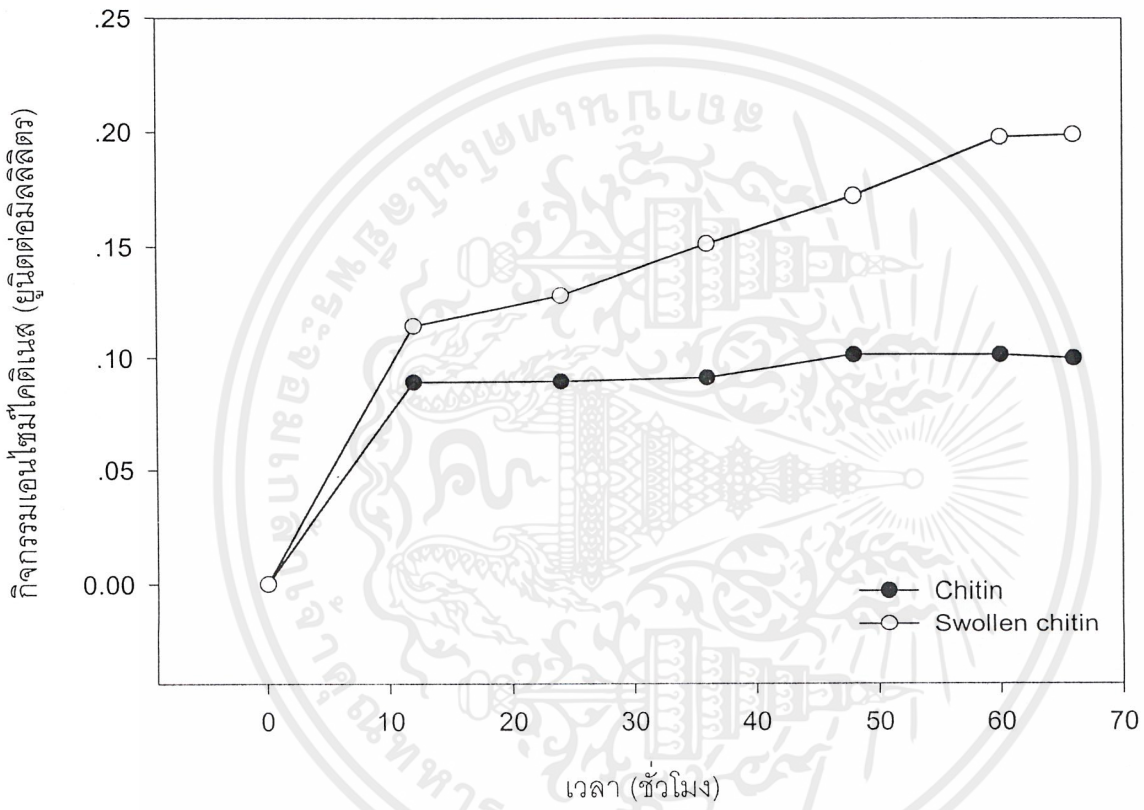
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด – ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีไคติน 6.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด – ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีสวอลเลนไคติน 6.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลวเมื่อมี ไคติน 6.0กรัมต่อลิตร และสวอลเลน ไคติน 6.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

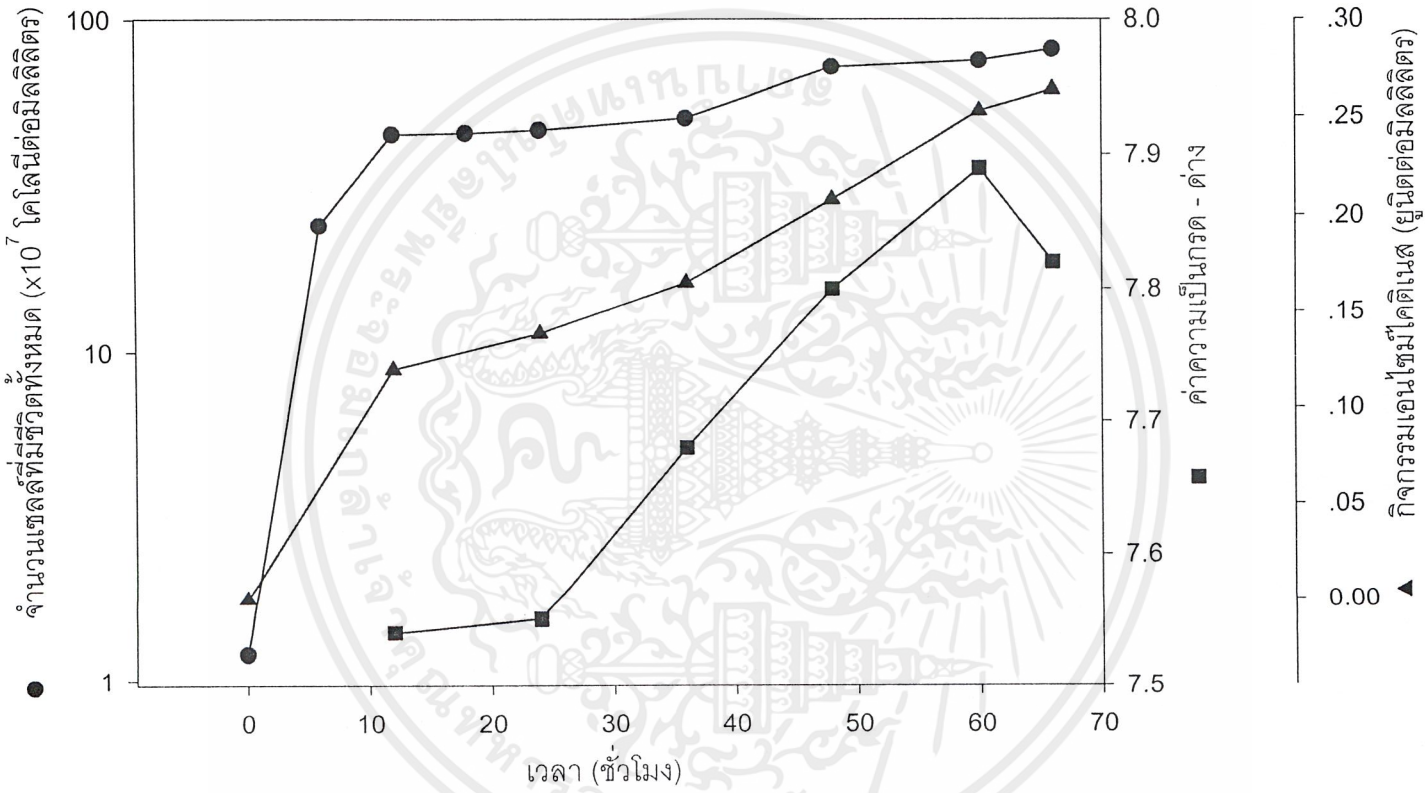
2. การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันปริมาณของสวอลเลน ไคตินเป็น 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 10.0 จะเห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากแหล่งอาหารที่มีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 10.0 กรัมต่อลิตร จะมีค่าสูงที่สุด คือ 0.437 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับอาหารที่มีปริมาณสวอลเลน ไคติน 4.0, 6.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 13 (ภาคผนวก ง) ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากอาหารที่มีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 4.0, 6.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตร นั้นจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และจากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Moreal และ Reese (1969) ที่กล่าวว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณสวอลเลน ไคตินเพิ่มขึ้น ซึ่งได้ทำการทดลองกับเชื้อ *Aspergillus fumigatus* และ *Enterobacter liquefaciens* โดยแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินเป็น 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และจากผลการทดลองของ Sherief และคณะ (1991) พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจาก *Aspergillus carneus* จะสูงที่สุดเมื่อใช้อาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินเป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์

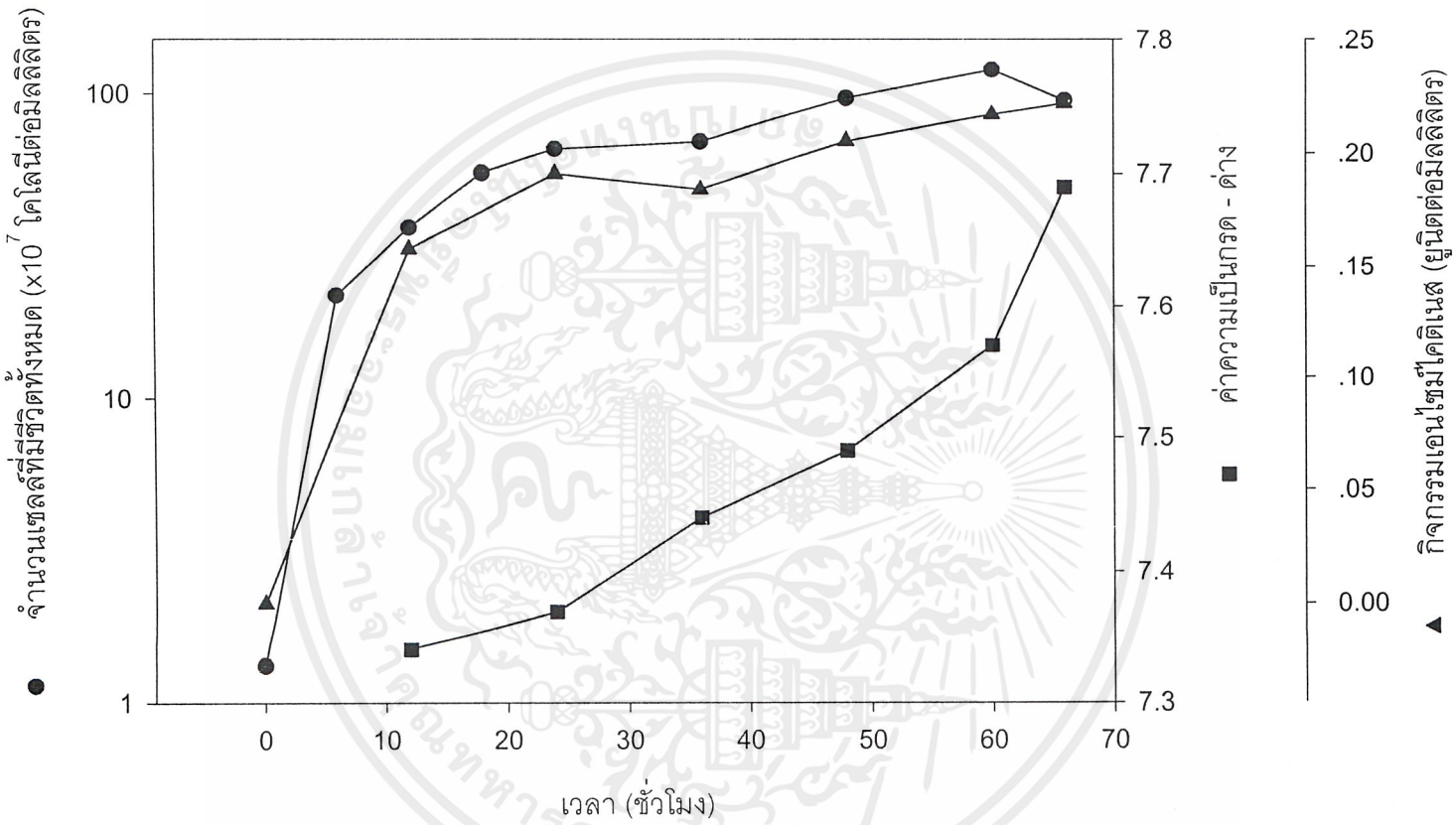
จากกราฟการเจริญของเซลล์ พบว่าที่มีปริมาณของสวอลเลน ไคตินเป็น 10.0 กรัมต่อลิตร นั้น มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูงที่สุด โดยเทียบจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) ในอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคติน 10.0 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงที่สุดคือ 0.2011 ส่วนในอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคติน 4.0, 6.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตรจะมีค่า μ เป็น 0.1926, 0.1950 และ 0.1983 ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้อาหารเหลวที่มีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 10.0 กรัมต่อลิตรในการผลิตขั้นต่อไป

ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเหลวที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงจะอยู่ในช่วงประมาณ 7.54 – 7.82 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน 4.0 กรัมต่อลิตร และ 7.40 – 7.65 สำหรับอาหารที่มีความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร เนื่องมาจากเป็นช่วงค่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสนั่นเอง

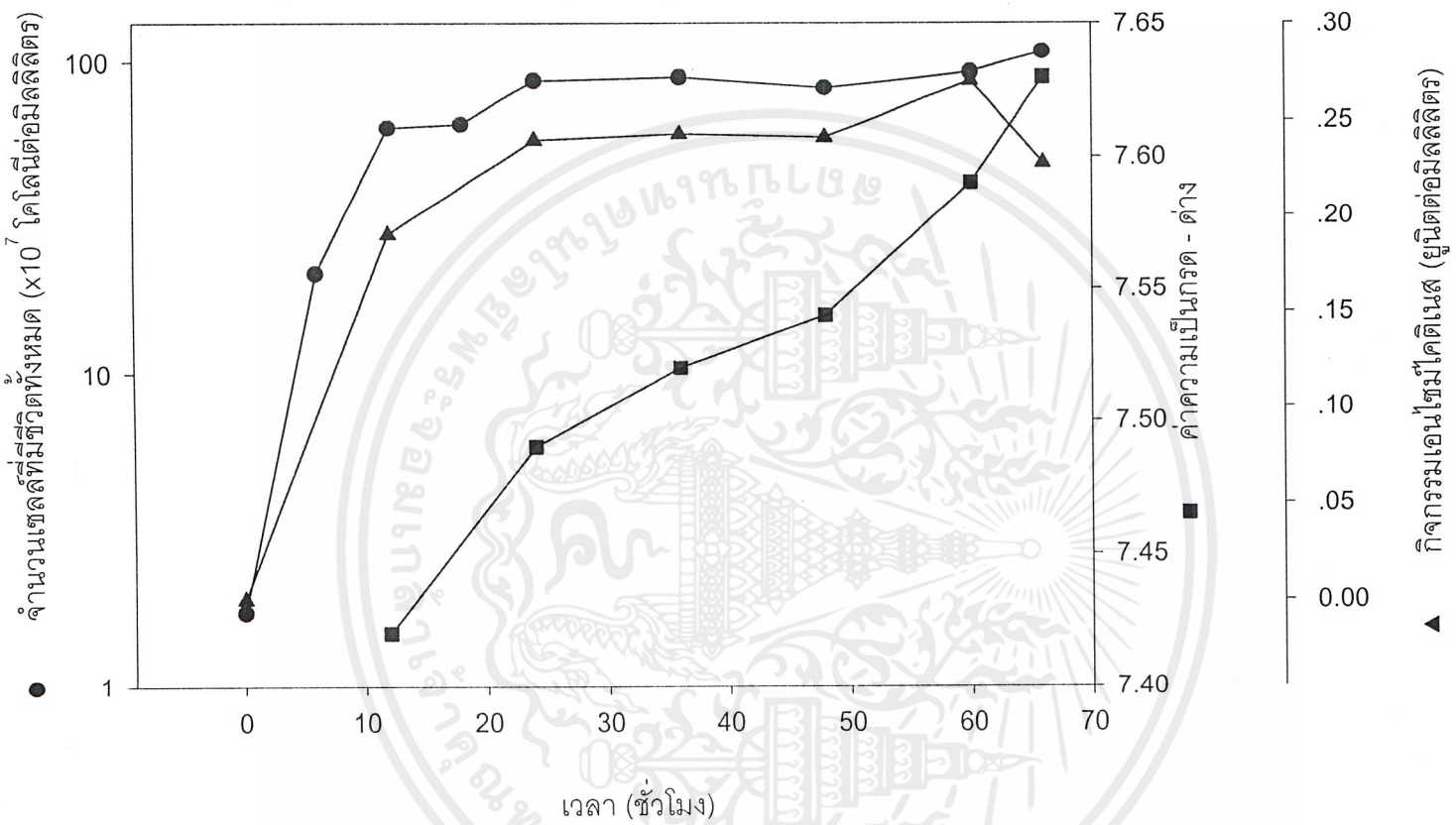
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



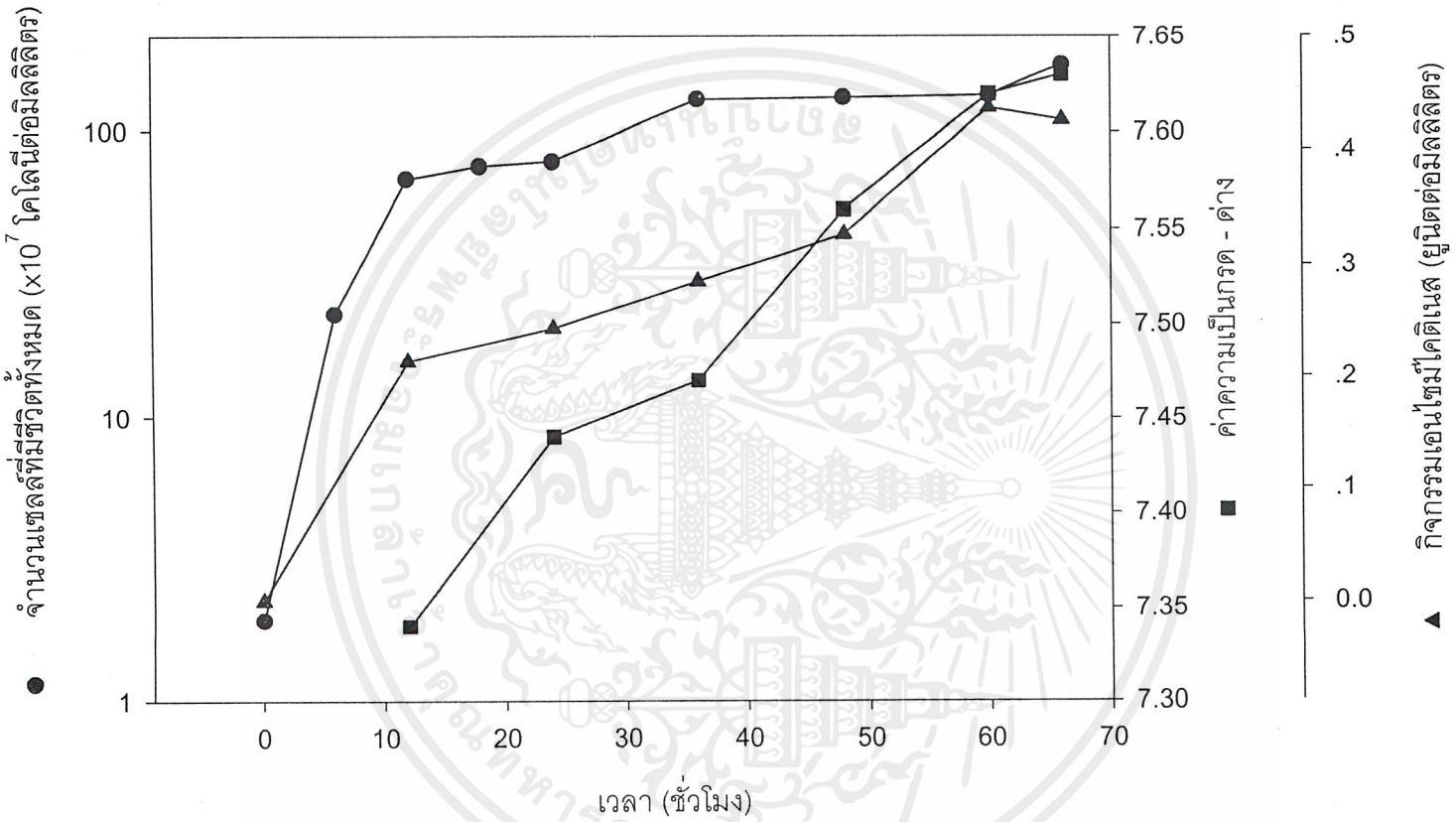
ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 4.0 กรัมต่อลิตร



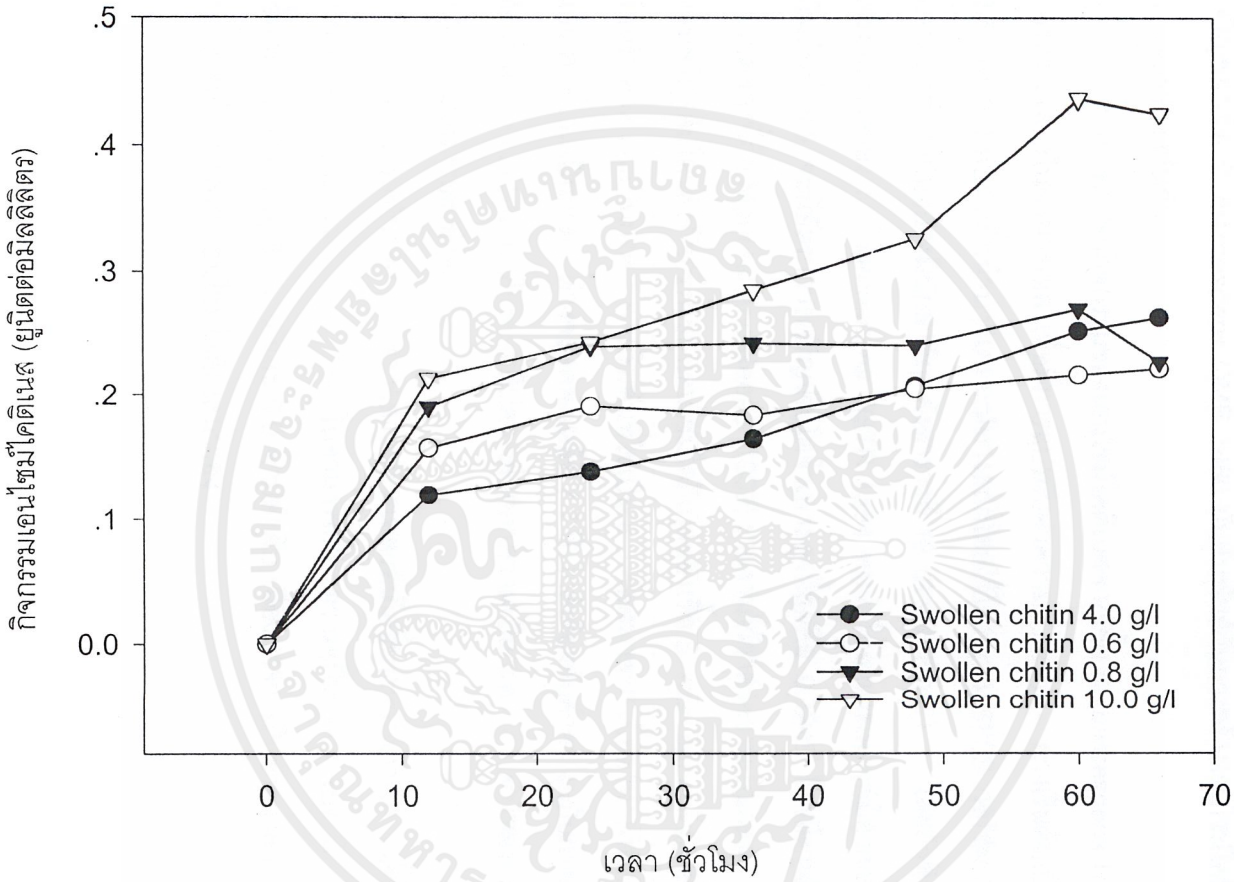
ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 6.0 กรัมต่อลิตร



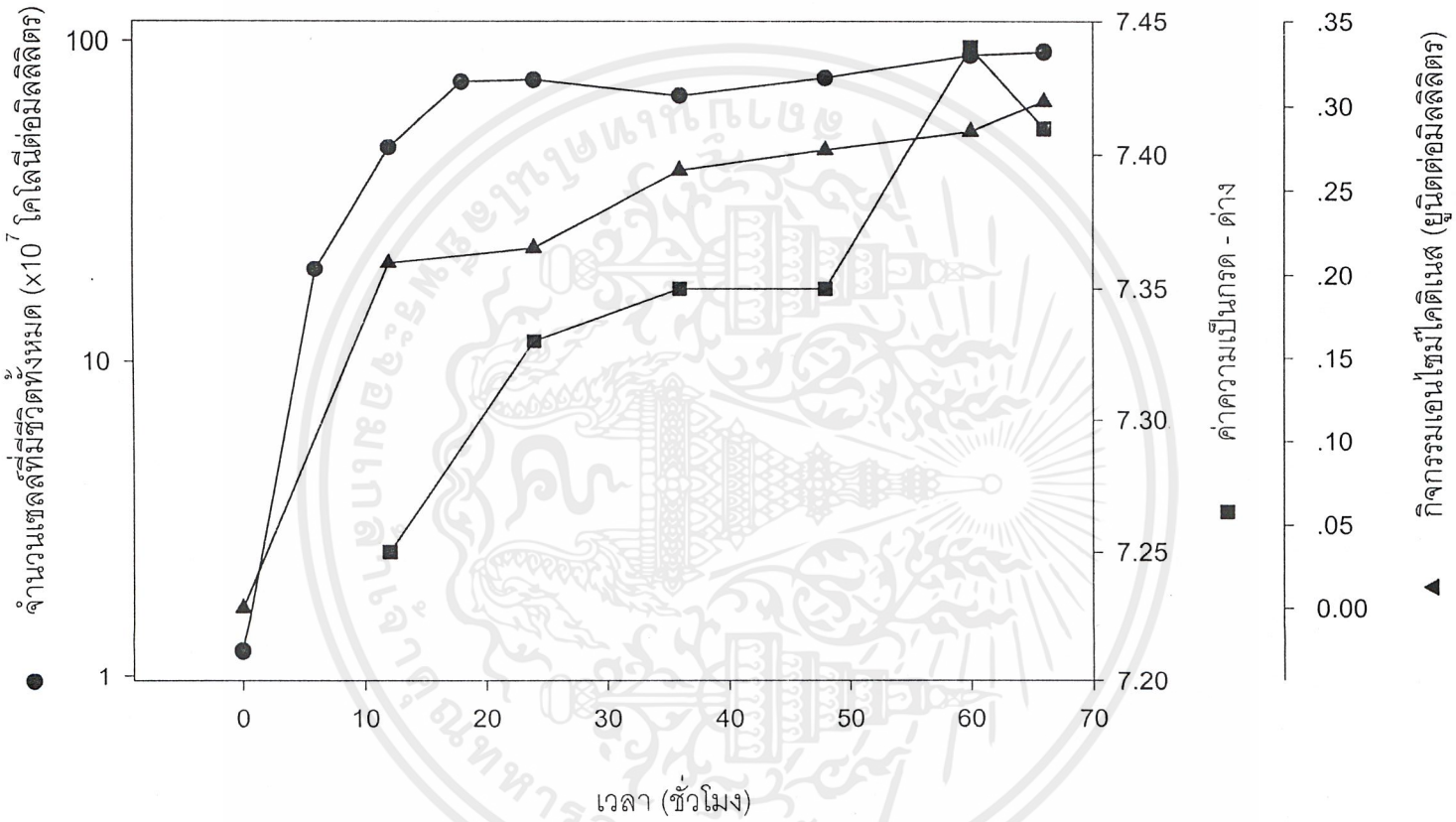
ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 8.0 กรัมต่อลิตร



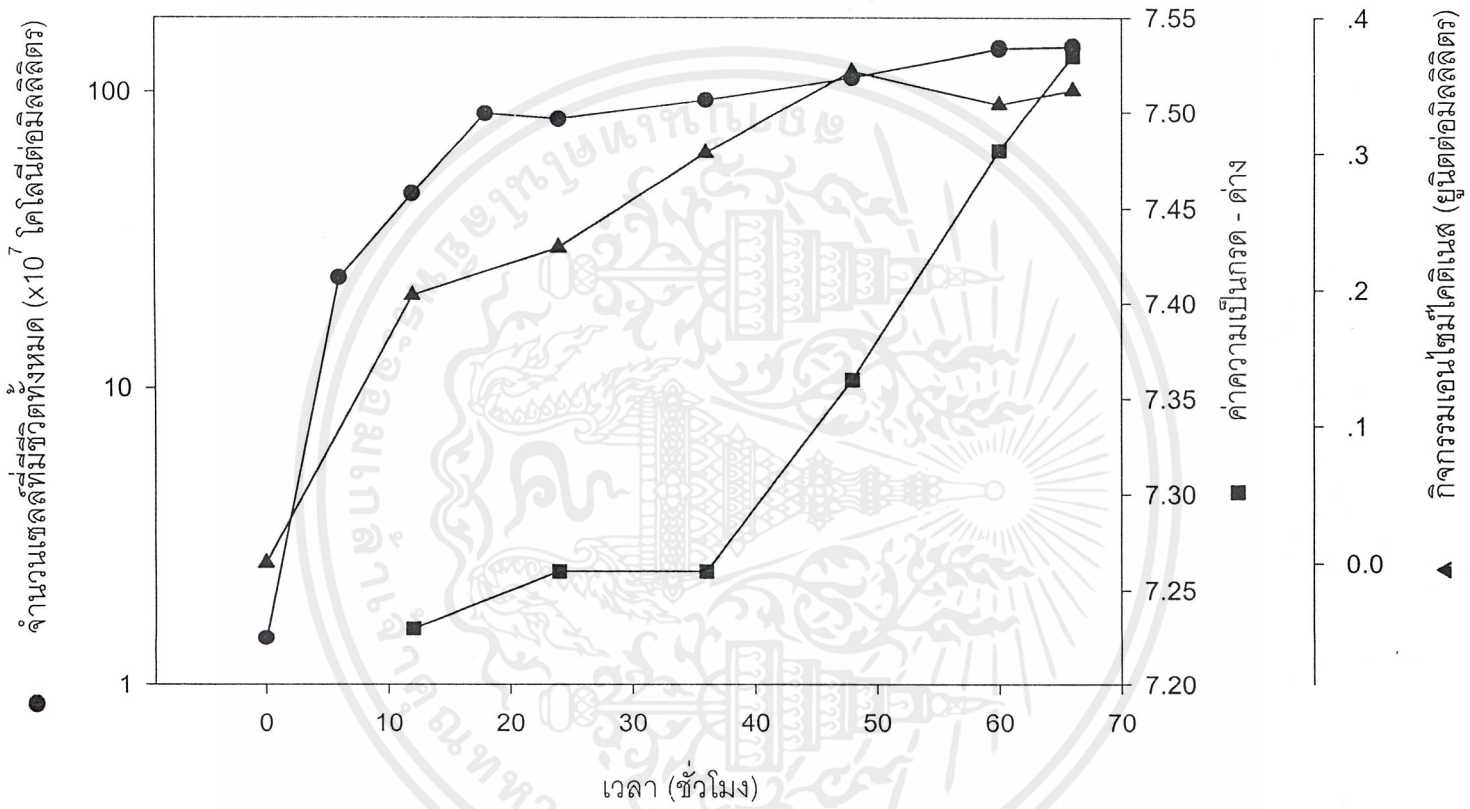
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีปริมาณสวอลเลน ไคตินเป็น 10.0 กรัมต่อลิตร



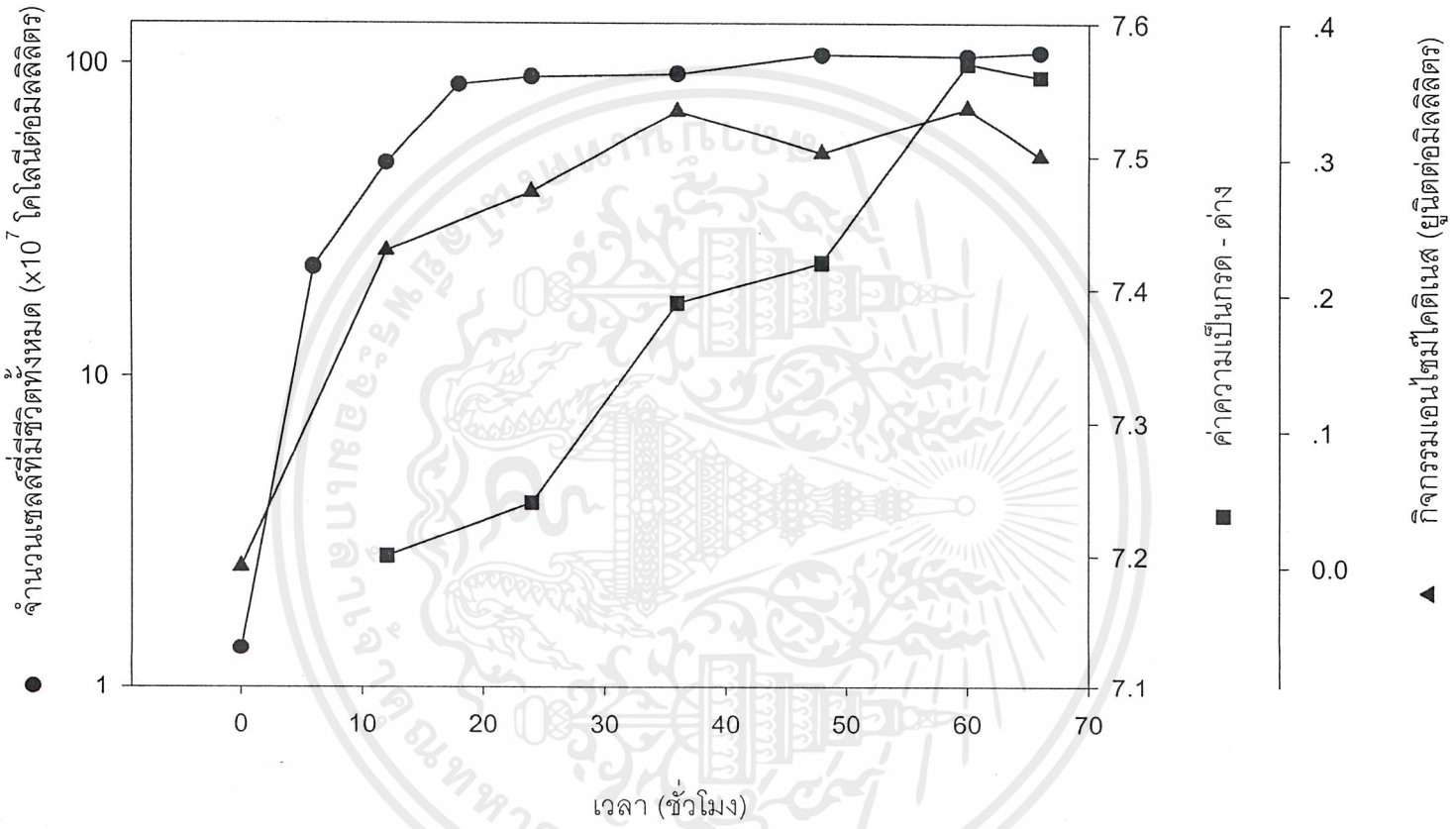
ภาพที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลว เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นสวอนเลน ไคตินเป็น 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร



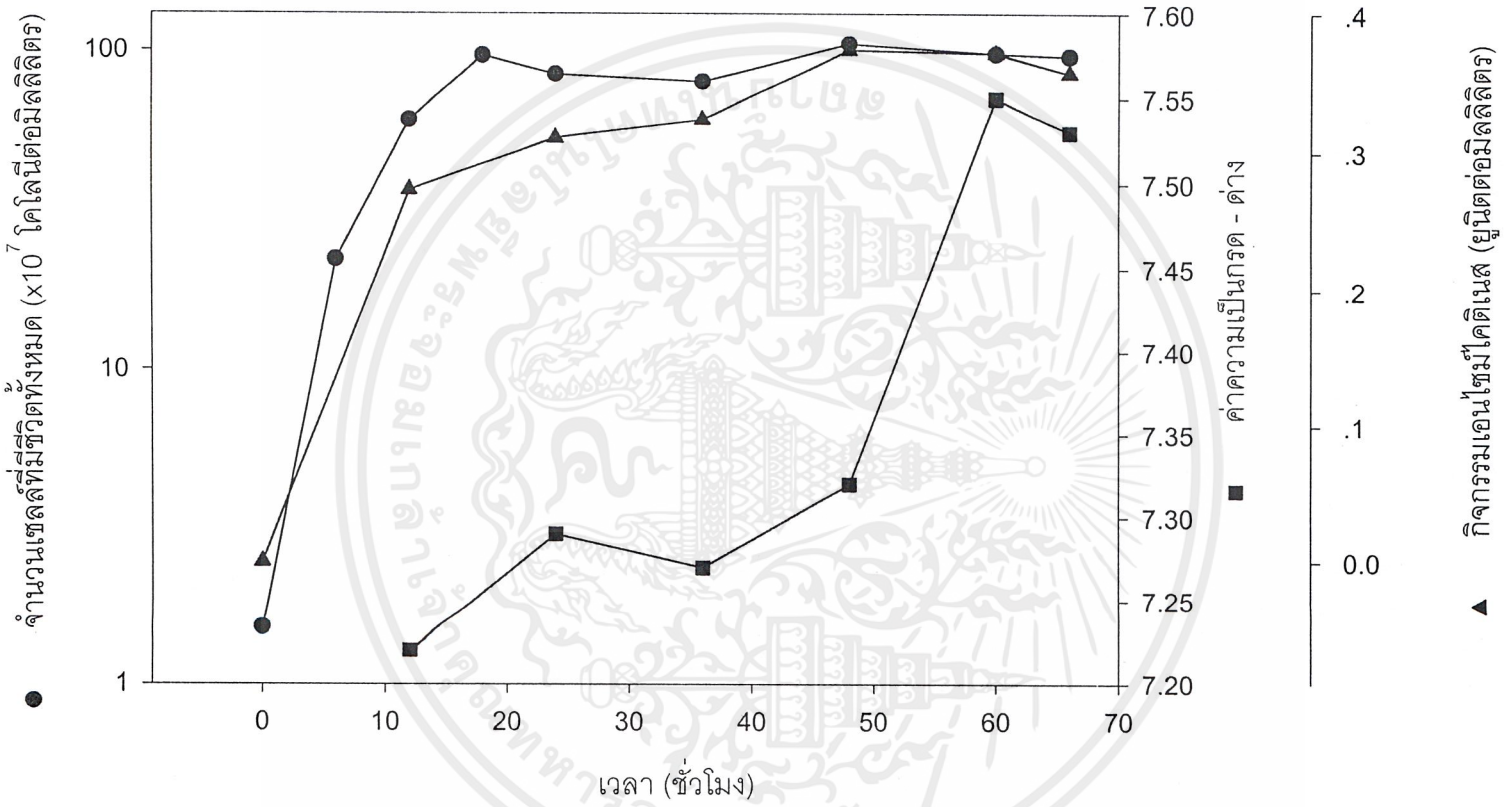
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 7.0



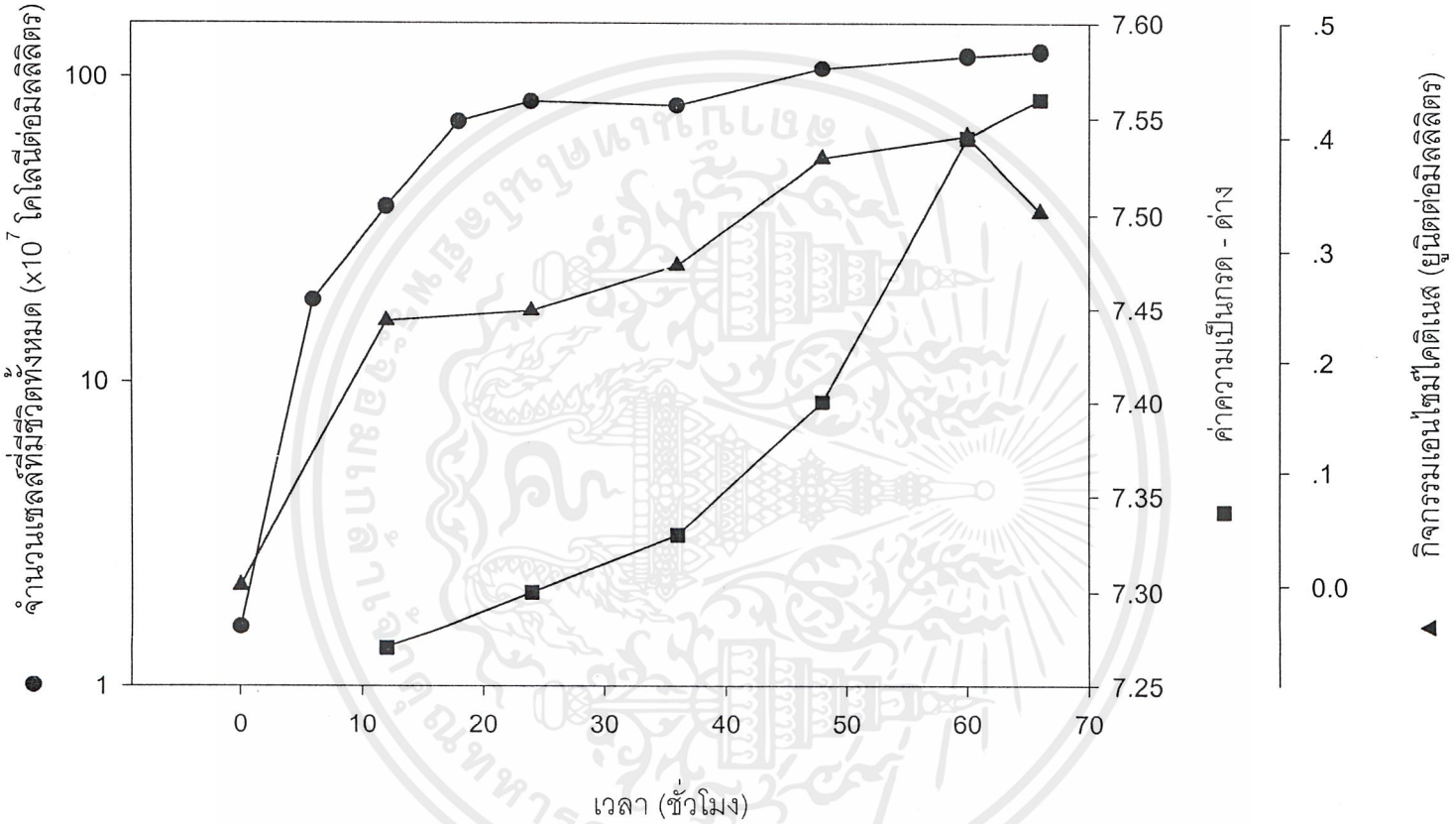
ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์โคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 7.5



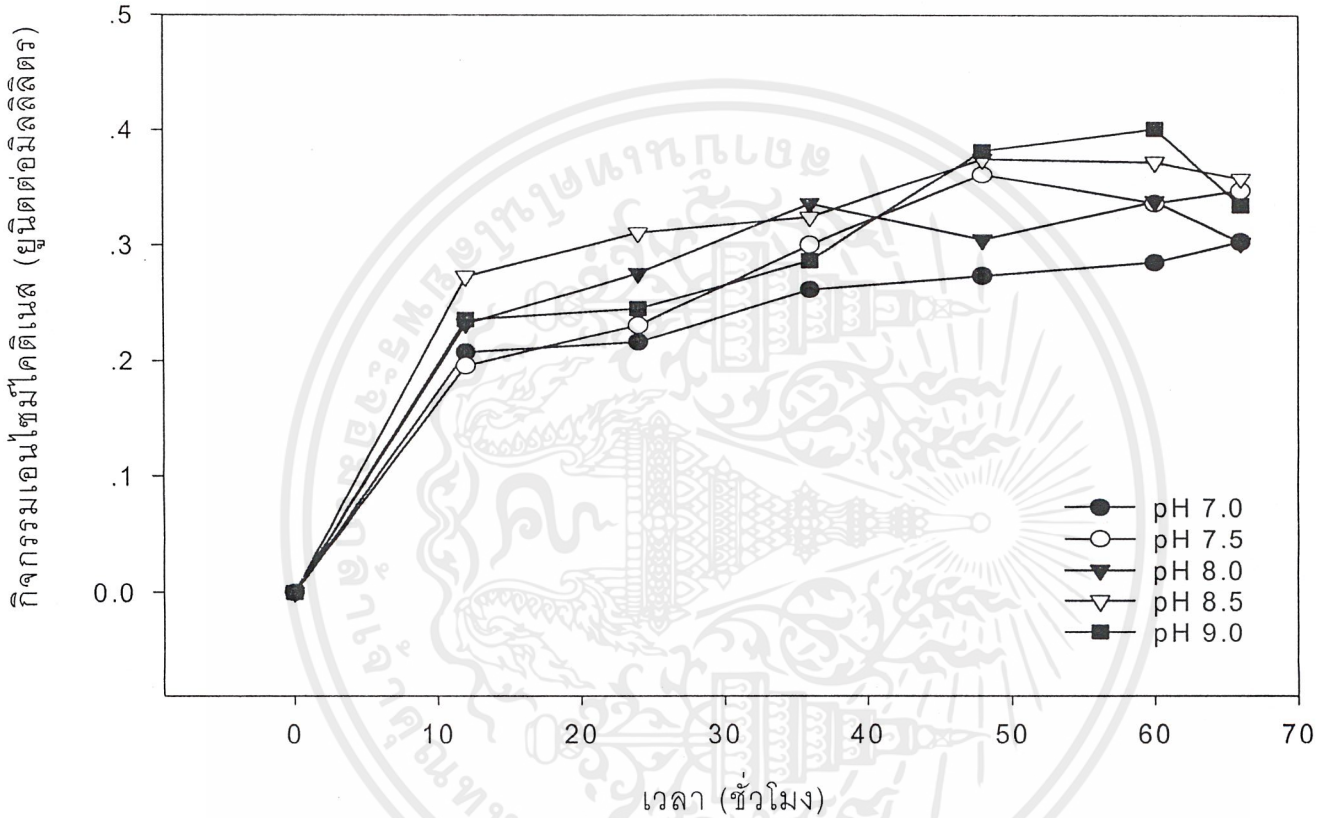
ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์โคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 8.0



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 8.5



ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และค่าความเป็นกรด - ด่าง ในอาหารเหลวเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวเป็น 9.0



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลว ซึ่งแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลาเป็น 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลวทุกชนิดพบว่ามีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่ว่า เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จะมีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มมากขึ้นเช่นกันหรือที่เรียกว่า growth associate

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือสวอลเลน ไคติน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดคือ 0.199 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเพียง 0.102 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำอาหารที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนมาแปรผันค่าความเข้มข้นของปริมาณสวอลเลน ไคตินพบว่าที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรนั้น ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 0.437 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวที่มีสวอลเลน ไคติน 10.0กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจะเห็นว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสมคือ 8.5 เพราะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ควรจะทำการศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. marcescens* และทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้เพิ่มมากขึ้นเช่น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง. 2529. การใช้ประโยชน์จากไคติน. อาหาร 16(4) : 219 - 221.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 43 หน้า.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์. พิมพ์ครั้งที่1. 411 หน้า.

วิสิฐ จะวะสิต และ ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2533. ไคโตแซน โพลิเมอร์ตัวใหม่จากของเหลือทิ้งอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร 1(1) : 4 – 8.

อุดมชัย จินะดิษฐ์. 2535. ผลิตภัณฑ์จากเปลือกกุ้งกับการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารสสท. ฉบับเทคโนโลยี 19(104) : 50 - 54.

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

Bernard, N. 1911. Sur la function fungicide des bulbes d'ophrydees. Cited by P. Flach, E. Pilet and p. Jolles. What's new in chitinase research? Exp. 48 : 701 - 716.

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

Cody, R.M., N.D. Davis, J.Lin and D. Shaw. 1990. Sceening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugar. Biomass. 21 : 285 - 295.

Correa, T.U., N. Elango, I.Polacheck and E. Cabib. 1982. Endochitinase, a mannan associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol.chem. 257 : 1392 - 1397.

Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degration of chitin and its biological application. J. Sci. Ind. Res. 45 : 273 - 281.

Elango, N., J.U. Correa and E. Cabib. 1982. Secretory nature of yeast chitinase. J. Bio. Chem. 257 : 1398 -1400.

Gooday, G.W., A.M. Humphreys and W.H. MCINTOSH. 1986. Role of chitinase in fungal growth, pp. 83 - 91. In R. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Goodays (eds.). Chitin in Nature and Technology. Plemum Press, New York.

Gooday, G.W. 1990. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegration 1 : 177-190.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ignacio, G.C., Robert, A.F. and Paul, A.C. 1982. Bioconversion of Shellfish Chitin Waste: Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design and Economic Analysis. J. of Food Science. 47 : 901 - 905

Jeuniaux, C. 1966. Chitinase. Method Enzymol. 8 : 645 - 650.

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

Mahadevan Brinda and D.L. Crawford. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces ludicus* WYEC108. Enzyme Microb. Technol. 20 : 489 - 496.

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

Moiseev, S.R. and A. Carroad. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. Biotechnol, Bioeng. 23 : 1067 -1078.

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

Ohtakara,A., M. Mitsutami and Y. Uchida. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. J. Fermentation Technol. 57: 169 – 173.

Ornum, J.U. 1992. Shrimp waste must it be waste ? INFOPTSH International 6: 48 - 52

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

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

Reid, j.D. and D.M. Ogrydziak. 1981. Chitinase overproducing mutant of *Serratia marcescens*. Appli. Microbiol. 41(3) : 664 - 669.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Smith, R.J. and E.A. Grula. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*, . Invertebr, Pathol. 42 : 319 - 326.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195 : 19 – 23.

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

Vyas, P.R. and M.V. Deshpande. 1989. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degration. J. Gen. Appl. Microbiol. 35 : 343 - 350.

Young, M.E., R.L. Bell and P.A. Carroad. 1985. Kinetics of chitinase production IT. Relationship between bacterial growth, chitin hydrolysis and enzyme synthesis, Biotechnol. Bioeng. 27 : 776 - 780.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. **การเตรียมสวอลเลน ไคติน** (Monreal และ Reese, 1969)

ชั่งผงไคติน 10 กรัม ผสมกับฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำตะกอนไคตินที่ได้จากการย่อยสลายมาล้างด้วยน้ำกรองที่ปราศจากอิออน 3 – 4 ครั้ง ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้เท่ากับ 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,600 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตะกอนที่ได้นี้จะเรียกว่าสวอลเลน ไคติน หรือ ไคตินของซิกมา

2. **อาหารเหลวสูตรที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ** (Ignacio และคณะ, 1982)

chitin	6	กรัมต่อลิตร
yeast extract	1	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.2	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$FeCl_3.6H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างสารละลายเกลือแร่ให้ได้ 8.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ฆ่าเชื้อแยกระหว่างผงไคตินและสารละลายเกลือแร่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเหลวสูตรที่มีสวอลเลน ไคตินเป็นองค์ประกอบ

swollen chitin	6	กรัมต่อลิตร
yeast extract	1	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.2	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$FeCl_3.6H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างสารละลายเกลือแร่ให้ได้ 8.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ฆ่าเชื้อแยกระหว่างผงสวอลเลน ไคตินและสารละลายเกลือแร่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. การเตรียมซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด - ด่าง 6.6) (นวลพรรณ, 2540)

stock สารละลาย A : 0.1 M citric acid

เตรียมโดยละลาย citric acid 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปเก็บในขวดทึบแสง

stock สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate

เตรียมโดยละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปเก็บในขวดทึบแสง

เมื่อต้องการใช้ ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 13.6 ต่อ 36.4 ปรับปริมาตรเป็น 100มิลลิลิตร และปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเป็น 6.6

2.การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method (Somogyi, 1952)

สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) ประกอบด้วย

A : 10 เปอร์เซนต์ $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตไฟไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

B : สารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต (Phosphate – tartrate solution) เตรียมโดยละลายโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม หรือ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate (tetrahydrate)) 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วย โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4 (Anhydrus)) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

ผสมสารละลาย A (100 มิลลิลิตร) และ B (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกันและนำไปเก็บในขวดทึบแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : ไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. วิธีการวัดการเจริญของเซลล์

ทำการเก็บตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อมา 0.1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้อยู่ระหว่างความเข้มข้น 10^{-3} – 10^{-7} และเลือกความเจือจางในระดับที่เหมาะสมมาทำการเพาะเลี้ยงลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA อยู่ ด้วยวิธี spread plate technique โดยทำความเจือจางละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 – 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ และบันทึกผลในหน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (Colony Forming Unit ; CFU)

2. วิธีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Somogyi Nelson's, 1952)

นำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์มา 1 มิลลิลิตร และเติม 1 มิลลิลิตรของสารละลาย ซิเตรต ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6.6) ที่มีสวอลเลน ไคติน ละลายอยู่ 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร และเติมคอปเปอร์ รีเอเจนต์ (Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดทดลองเพื่อลดการระเหยของน้ำ จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน น้ำตาล N–acetyl – D – glucosamine ทำหลอดคุม (control) เช่นเดียวกันแต่ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการต้มแล้ว 10 นาที และทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

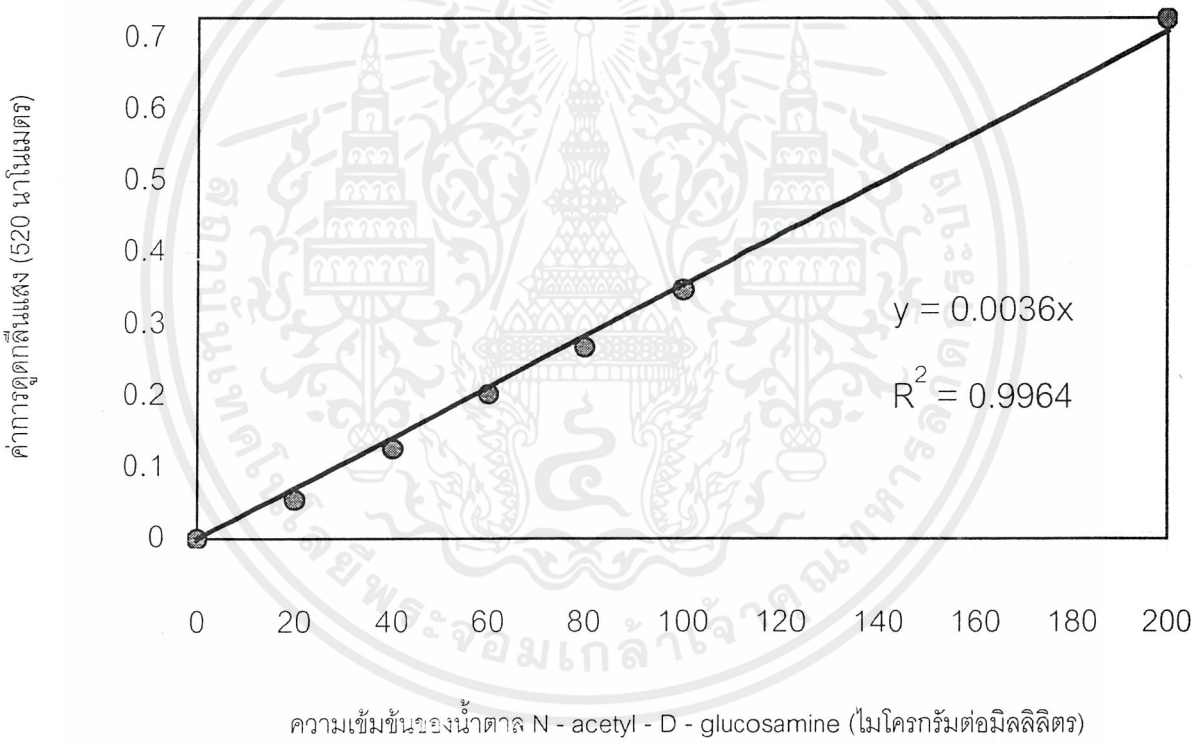
โดย 1 ยูนิต/มิลลิลิตร คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้สับเสตรทเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาล N – acetyl – D - glucosamine**

เตรียม Stock solution ของสารละลายน้ำตาล N – acetyl – D - glucosamine ให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.1 มา ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2

เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาล N – acetyl – D – glucosamine



ภาพที่ 19 กราฟมาตรฐานน้ำตาล N – acetyl – D – glucosamine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ตารางแสดงผลและการวิคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 3 **จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน**

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด X 10^7 (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	
	แหล่งอาหารคาร์บอน	
	ไคติน	สวอลเลน ไคติน
0	1.05	1.50
6	15.47	37.51
12	37.78	50.33
18	51.17	50.77
24	33.56	51.90
36	50.61	54.43
48	44.32	55.00
60	37.64	53.43
66	52.67	74.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 **ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน**

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด - ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง	
	แหล่งคาร์บอน	
	ไคติน	สวอลเลน ไคติน
12	7.73	7.39
24	7.77	7.49
36	7.81	7.56
48	7.86	7.60
60	7.89	7.61
66	7.88	7.65

ตารางที่ 5 **กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	แหล่งอาหาร	
	ไคติน	สวอลเลน ไคติน
0	0.00	0.00
12	0.09	0.11
24	0.09	0.13
36	0.09	0.15
48	0.10	0.17
60	0.10	0.20
66	0.10	0.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 **สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

	Treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Activity	chitin	6	9.544032E-02	6.123551E-03	2.499929E-03
	Swollen chitin	6	.1605152	3.543513E-02	1.446633E-02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
ACTIVITY	Equal variances assumed	14.544	0.003	-4.433	10	0.001	-6.5074845E-02	1.468075E-02	-9.7785593E-02	-3.2364097E-02
	Equal variances not assumed			-4.433	5.298	0.006	-6.5074845E-02	1.468075E-02	-0.1021826	-2.7967103E-02

การวิเคราะห์ความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสจะเห็นว่าค่า t = - 4.339 ซึ่งค่า t นี้คำนวณโดย Pooled varience t-test ถ้าพิจารณาค่า Significant (2-tailed) เท่ากับ 0.06 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสโดยแปรผันแหล่งคาร์บอนทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 **จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร**

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดX 10^7 (โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน (กรัมต่อลิตร)			
	4.0	6.0	8.0	10.0
0	1.20	1.33	1.72	1.93
6	24.33	21.97	21.00	23.08
12	45.36	36.72	61.78	68.05
18	45.78	55.22	63.39	75.22
24	46.67	66.00	87.44	77.89
36	50.45	69.66	89.67	128.33
48	72.00	96.56	82.83	130.33
60	75.34	119.55	92.83	132.67
66	81.33	94.78	108.00	169.83

ตารางที่ 9 **ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร**

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน (กรัมต่อลิตร)			
	4.0	6.0	8.0	10.0
12	7.54	7.34	7.42	7.34
24	7.55	7.37	7.49	7.44
36	7.68	7.44	7.52	7.47
48	7.80	7.49	7.54	7.56
60	7.89	7.57	7.59	7.62
66	7.82	7.69	7.63	7.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน (กรัมต่อลิตร)			
	4.0	6.0	8.0	10.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.12	0.16	0.19	0.21
24	0.14	0.19	0.24	0.24
36	0.17	0.18	0.24	0.29
48	0.21	0.21	0.24	0.33
60	0.25	0.22	0.27	0.44
66	0.26	0.22	0.23	0.43

ตารางที่ 11 สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันปริมาณของสวอลเลน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Mini	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	.1912493	5.971358E-02	2.437797E-02	.1285837	.2539149	.11972	.26358
2	6	.1960699	2.374104E-02	9.692238E-03	.1711552	.2209846	.15765	.22178
3	6	.2351728	2.619667E-02	1.069475E-02	.2076811	.2626646	.19031	.27058
4	6	.3217503	9.311226E-02	3.801292E-02	.2240350	.4194656	.21340	.43685
Total	24	.2360606	7.608132E-02	1.553003E-02	.2039343	.2681869	.11972	.43685

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันความเข้มข้นของสวอลลเน ไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.570E-02	3	2.190E-02	6.496	0.003
Within Groups	6.743E-02	20	3.371E-03		
Total	0.133	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อเมื่อแปรผันความเข้มข้นของสวอลเลน ไคติน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร

	(I) TRT	(J) TRT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-4.8206050E-03	3.352301E-02	0.887	-7.4748380E-02	6.510717E-02
		3	-4.3923524E-02	3.352301E-02	0.205	-0.1138513	2.600425E-02
		4	-0.1305010	3.352301E-02	0.001	-0.2004288	-6.0573214E-02
	2	1	4.820605E-03	3.352301E-02	0.887	-6.5107170E-02	7.474838E-02
		3	-3.9102919E-02	3.352301E-02	0.257	-0.1090307	3.082486E-02
		4	-0.1256804	3.352301E-02	0.001	-0.1956082	-5.5752609E-02
	3	1	4.392352E-02	3.352301E-02	0.205	-2.6004251E-02	0.1138513
		2	3.910292E-02	3.352301E-02	0.257	-3.0824856E-02	0.1090307
		4	-8.6577465E-02	3.352301E-02	0.018	-0.1565052	-1.6649690E-02
	4	1	0.1305010	3.352301E-02	0.001	6.057321E-02	0.2004288
		2	0.1256804	3.352301E-02	0.001	5.575261E-02	0.1956082
		3	8.657746E-02	3.352301E-02	0.018	1.664969E-02	0.1565052

* The mean difference is significant at the .05 level.

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าค่า F= 6.496 ค่า Significant of F = 0.003 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปฏิเสธ H_0 นั่นคือมีปริมาณสวอลเลน ไคตินอย่างน้อยหนึ่งความเข้มข้น ที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสแตกต่างจากกลุ่มอื่น

กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ถูกผลิตขึ้นในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของสวอลเลน ไคตินเท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตร แตกต่างจาก 4.0, 6.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตรโดยที่ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 4.0 กรัมต่อลิตรอยู่ 0.13 หน่วย ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 6.0 กรัมต่อลิตร อยู่ 0.126 หน่วย ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 8.0 กรัมต่อลิตรอยู่ 8.657 หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 **จำนวนเซลล์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0**

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่ที่มีชีวิตทั้งหมด X 10^7 (โคโลนี/มิลลิลิตร)				
	ค่าความเป็นกรด – ด่าง เริ่มต้น				
	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
0	1.20	1.44	1.34	1.50	1.58
6	19.62	23.65	22.40	22.37	18.78
12	46.78	45.33	48.22	60.67	38.11
18	75.00	84.00	86.11	96.56	71.39
24	76.00	80.56	91.33	84.22	83.33
36	67.89	93.78	93.11	80.00	80.89
48	77.11	111.59	106.67	105.00	107.00
60	90.78	140.44	105.44	97.67	117.28
66	93.00	142.00	108.33	96.00	121.00

ตารางที่ 15 **ความเป็นกรด – ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0**

เวลา	ความเป็นกรด – ด่างของอาหารเพาะเลี้ยง				
	ค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้น				
(ชั่วโมง)	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
12	7.25	7.23	7.20	7.22	7.27
24	7.33	7.26	7.24	7.29	7.30
36	7.35	7.26	7.39	7.27	7.33
48	7.36	7.36	7.42	7.32	7.40
60	7.45	7.48	7.57	7.55	7.54
66	7.51	7.52	7.56	7.53	7.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *S. marcescens* TISTR 1354 เมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0

เวลา	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)				
	ค่าความเป็นกรด – ด่างเริ่มต้น				
(ชั่วโมง)	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	0.21	0.20	0.23	0.27	0.24
24	0.22	0.23	0.28	0.31	0.24
36	0.26	0.30	0.34	0.32	0.29
48	0.27	0.36	0.30	0.37	0.38
60	0.29	0.34	0.34	0.37	0.40
66	0.30	0.35	0.30	0.36	0.33

ตารางที่ 17 สรุปสถิติพื้นฐานทั่วไปของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0

Treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	.2578587	3.817394E-02	1.558445E-02	.2177976	.2979198	.20744	.30273
2	6	.2949717	6.710765E-02	2.739658E-02	.2245466	.3653969	.19592	.36045
3	6	.2977596	3.955700E-02	1.614908E-02	.2562471	.3392722	.23215	.33729
4	6	.3349429	3.980610E-02	1.625077E-02	.2931690	.3767168	.27317	.37398
5	6	.3138168	6.923103E-02	2.826345E-02	.2411633	.3864703	.23592	.40076
Total	30	.2998700	5.534302E-02	1.010421E-02	.2792045	.3205354	.19592	.40076

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 **ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการแปรผันค่าความเป็นกรด - ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.931E-02	4	4.827E-03	1.736	0.174
Within Groups	6.951E-02	25	2.781E-03		
Total	8.882E-02	29			

จากตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าค่า F= 1.736 ค่า Significant of F = 0.174 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่ายอมรับ H_0 นั่นคือค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกค่าไม่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้