สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ เพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

T058546

นายชาย บุญกล่อมจิตร
นางสาวฐิติมา รุ่งรัศมีพัฒน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58546
วัน,เดือน,ปี 25 ส.ค. 2549

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

ม.ก.ล.ท.300
b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ เพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

นายชาย บุญกล่อมจิตร
นางสาวฐิติมา รุ่งรัศมีพัฒน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Selection of Fungi from Nature for Chitinase Production

Mr. Chai Boonklomjit

Miss Thitima Rungrutsameeput

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

นักศึกษา นายชาย บุญกล่อมจิตร

นางสาวฐิติมา รุ่งรัศมีพัฒน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการการตรวจสอบ			ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	.....
กรรมการ	ดร.สมชาย	ไกรรักษ์	.....
กรรมการ	ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ
เพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

นักศึกษา นายชาย บุญกล่อมจิตร
นางสาวฐิติมา รุ่งรัศมีพัฒน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากแหล่งดินและแหล่งน้ำต่างๆในธรรมชาติ โดยการนำตัวอย่างดินหรือน้ำมาทำการเจือจางในน้ำกลั่นและใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ spread plate ลงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงจากสูตรของวรรณวิไล (2537) โดยใช้ผงเปลือกปูเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อแยกเอาเฉพาะเชื้อราที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นผงเปลือกปูได้เท่านั้น พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งดินและแหล่งน้ำต่างๆในธรรมชาติได้ทั้งสิ้น 22 สายพันธุ์ แยกเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วทำการย้ายเชื้อราลงในหลอดทดลอง ศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์โดยการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากนั้นนำเชื้อราทั้งหมดไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ผลิตได้เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Trichoderma harzianum* ที่ใช้เป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 0.0801 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อราที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ P, Q, S, T และ U สามารถวิเคราะห์ค่าของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสได้ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* คือ 0.0780, 0.0598, 0.0778, 0.0798 และ 0.0660 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์อื่นพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Isolation and Selection of Fungi from Nature for Chitinase Production	
Name	Mr. Chai	Boonkomjit
	Miss Thitima	Rungrutsameeput
Department	Applied Biology	
Program	Biotechnology	
Academic Year	2003	
Special Project Advisor	Assist. Prof. Aree	Rittiboon

ABSTRACT

This special project was performed by selection of fungi from nature that was able to produce chitinase by taking soil or water samples from several places in Bangkok. The samples were diluted and cultured by spread plate method on the media with minor modification from the formula of Wanwilai (1998) in which crab shell powder was used as the carbon source. The results were that 22 strains of fungi had the ability to grown on this media. Physical characteristics of the fungi were investigated and pictures of their hyphae under microscope were taken. Finally, fungal chitinase activity were compared to that of the reference fungi *Trichoderma harzianum* (0.0801 mmol/ml). The results were that the fungal strains P, Q, S, T and U had chitinase activity nearly the same as that of *Trichoderma harzianum* (0.0780, 0.0598, 0.0778, 0.0798 and 0.0660 mmol/ml., respectively). The chitinase produced by other fungal strains were vary little comparing to that by *Trichoderma harzianum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาอย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการโครงงานพิเศษ รวมทั้งให้คำปรึกษาและช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ รวมทั้งทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษมาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

นายชาย บุญกล่อมจิตร

นางสาวฐิติมา รุ่งรัศมีพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	54
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากไคตินและอนุพันธ์ของไคติน 14

ตารางที่ 2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส 18

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่พบของเชื้อรา ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส 26

ตารางที่ 4 แสดงค่าพีเอชเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อราที่คัดเลือก ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว 51

ตารางที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราที่คัดเลือก ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว 53

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราแต่ละชนิดที่วัดจากอาหารเหลวที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3, 4 ,5 และ 6 วันตามลำดับที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 0.01 64

ตารางภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราแต่ละชนิดที่เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วันที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 0.01 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไคติน 6
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส 6
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของไคโตแซน 6
รูปที่ 4 ผงไคติน 9
รูปที่ 5 ผงไคโตแซน 10
รูปที่ 6 ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซน 11
รูปที่ 7 ไคโตแซนในรูปแบบแคปซูลอาหารเสริม 13
รูปที่ 8 เชื้อ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-22 ขณะกำลังทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช 21
รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ A 28
รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ B 29
รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ C 30
รูปที่ 12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ D 31
รูปที่ 13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ E 32
รูปที่ 14 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ F 33
รูปที่ 15 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ G 34
รูปที่ 16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ H 35
รูปที่ 17 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ I 36
รูปที่ 18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ J 37
รูปที่ 19 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ K 38
รูปที่ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ L 39
รูปที่ 21 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ M 40
รูปที่ 22 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ N 41
รูปที่ 23 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ O 42
รูปที่ 24 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ P 43
รูปที่ 25 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ Q 44
รูปที่ 26 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ R 45
รูปที่ 27 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ S 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 28 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ T 47
รูปที่ 29 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ U 48
รูปที่ 30 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ V 49
รูปที่ 31 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 50
รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ในอุตสาหกรรมการประมงมีการจับสัตว์น้ำหลายชนิดรวมถึงปูและกุ้ง ปูและกุ้งเป็นสินค้าประมงและเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นสินค้าออกที่ทำรายได้เข้าประเทศไทยปีละนับหมื่นล้านบาท และมีแนวโน้มการขยายตัวด้านอุตสาหกรรมสินค้าประมงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การเติบโตของอุตสาหกรรมเหล่านี้มากเพียงใดก็ย่อมส่งผลให้ปริมาณของเหลือใช้ที่เกิดจากกระบวนการผลิต เช่น หัวกุ้ง เปลือกกุ้ง เปลือกปู และเศษเนื้อเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากส่วนของเปลือกนี้ยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควรจึงทำให้ส่วนของเปลือกปูและกุ้งถูกทิ้งไปเป็นจำนวนมากเป็นการสูญเสียทรัพยากรโดยปล่าประโยชน์ และของเหลือทิ้งเหล่านี้ ถ้าทิ้งไปก็อาจจะสร้างปัญหามลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม การนำของเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ มักจะอยู่ในรูปการลดขนาดโดยการบดให้ป่น จากนั้นก็นำไปเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์หรือทำปุ๋ย เป็นต้น นอกจากนี้แล้วเปลือกกุ้งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัยได้โดยนำไปสกัดเอาสารที่เรียกว่า "ไคติน" และ "ไคโตแซน" ทั้งยังสามารถแปรรูปไคตินให้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่างๆหลายชนิด เช่น เป็นส่วนประกอบในอาหารเสริมเพื่อสะดวกในการบริโภค เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางและยาบางชนิด ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย การผลิตกระดาษ และการผลิตสิ่งทอ (Knorr, 1991) ซึ่งถือว่าเป็นอีกแนวทางหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งอย่างมีคุณค่า เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งเหล่านั้นได้อีกประการหนึ่ง

เปลือกกุ้งและปูประกอบด้วยไคติน, โปรตีน และสารอนินทรีย์ เช่นแคลเซียมคาร์บอเนต ไคตินและอนุพันธ์ของมันถือว่ามีค่าในทางเศรษฐกิจ เพราะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทางด้านชีววิทยาและทางด้านเคมี ปกติในการนำเปลือกปูไปใช้ประโยชน์จะใช้กระบวนการทางเคมี ซึ่งมีข้อจำกัดหลายอย่าง ทั้งกระบวนการผลิตมีภาวะค่อนข้างรุนแรงและอันตราย ต้องใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน สารละลายด่างและกรดที่ใช้มีความเข้มข้นสูง และการใช้สารเคมีดังกล่าวอาจทำให้ไคตินเกิดปฏิกิริยาการสลายหมู่อะเซทิลบางส่วน และเกิดการไฮโดรไลซิสของสายพอลิเมอร์ ทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ และยังเหลือปริมาณของด่างทิ้งในกระบวนการผลิตเป็นจำนวนมาก ซึ่งทำให้เกิดสารพิษและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Wang และ Chio, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้จึงเสนอทางเลือกในการนำเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาทำการย่อยสลายเปลือกปู ซึ่งเป็นวิธีกระบวนการทางชีวภาพ และเป็นการนำจุลินทรีย์ตามธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ สำหรับการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

2. วัตถุประสงค์

2.1 ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราจากสภาพธรรมชาติ ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส

2.2 ศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อราที่คัดเลือกได้

3. ขอบเขตของการวิจัย

3.1 ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราจากสภาพธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

3.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อราที่คัดเลือกจากสภาพธรรมชาติเปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง

3.3 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

4. ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

4.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา

นำเปลือกปูที่ทิ้งแล้ว แกะส่วนที่ไม่ใช่เปลือกออกให้หมด นำมาล้างให้สะอาด นำไปตากแดด เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh จะได้ผงเปลือกปู เก็บในขวดเก็บสาร นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 การเตรียมอาหารในการคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรรณวิไล (2537) มีส่วนประกอบดังนี้ ผงเปลือกปู 15 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 3 กรัม/ลิตร ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม/ลิตร และโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม/ลิตร จากนั้นปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 4.5 และเติมผงวุ้น 20 กรัม/ลิตร

เตรียมอาหารใส่ในขวดอาหารขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.3 การคัดเลือกและแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินมา 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ใส่น้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองให้ตัวอย่างกระจายอย่างทั่วถึง ปิเปตตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในข้อที่ 4.2 ทำการ spread plate เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารและแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เมื่อได้เชื้อราที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการเขี่ยเอาเส้นใยใส่ลงในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA (Redman และ Rodriguez, 2002) เก็บรักษาในตู้เย็น ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน

4.4 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อราผลิตขึ้นในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Jaunaiux, 1965) เป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อราที่คัดเลือกผลิตได้ เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิง โดยอาหารเหลวที่ใช้คือสูตรอาหารในข้อ 2

4.5 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไปทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ lactophenol cotton blue เป็นสีย้อม รวมทั้งทำการตรวจสอบลักษณะและสีของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่เจริญในหลอดทดลอง และทำการบันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 สามารถแยกเชื้อราจากสภาพทางธรรมชาติ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

5.2 เป็นการใช้ประโยชน์จากเปลือกปูและกุ้ง ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียทรัพยากรโดยเปล่าประโยชน์

5.3 สามารถนำเชื้อราที่คัดเลือกไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

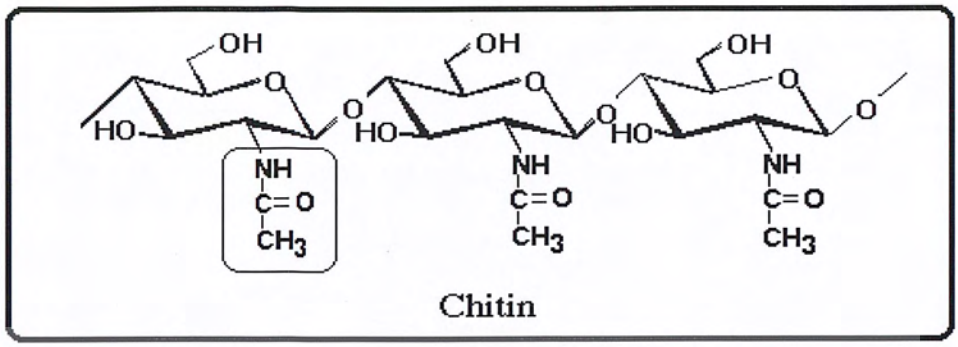
1. ไคตินและไคโตแซน

1.1 ไคติน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์พอลิเมอร์จำพวกพอลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแกนที่มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะเซทิลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล เรียงต่อกันไปเป็นสายยาวด้วยพันธะ 1,4 -เบตาไกลโคซิดิก (1,4-β-glycosidic) มีชื่อทางเคมีว่า พอลิ-เบตา-(1,4) -อะเซทะมิโด-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (poly-β-(1,4)-acetamido-2-deoxy-D-glucose) แต่ละหน่วยของโมเลกุลของกลูโคสที่มีหมู่อะมิโนกับหมู่อะเซทิลเกาะกันเป็นกลุ่มของ เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) หรือเรียกว่า พอลีเมอร์ของ เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน สูตรทั่วไปคือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ซึ่งมีคาร์บอนร้อยละ 47.29 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.45 ไนโตรเจนร้อยละ 6.89 และออกซิเจนร้อยละ 39.37 สูตรโครงสร้างของไคตินโดยทั่วไปคล้ายกับสูตรโครงสร้างของเซลลูโลส แสดงดังรูปที่ 1 และ 2 พอลิเมอร์ทั้งสองต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองโดยในเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล และในไคตินจะเป็นหมู่อะเซทะมิโน สายพอลิเมอร์ของไคตินจะมีเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีนนับพันหน่วยเกาะกันด้วยพันธะ 1,4 เบตาไกลโคซิดิก แต่ในบางหน่วยของไคตินธรรมชาติอาจจะไม่มีหมู่อะเซทิลเกาะในที่ๆควรจะมี (Deshpande, 1986)

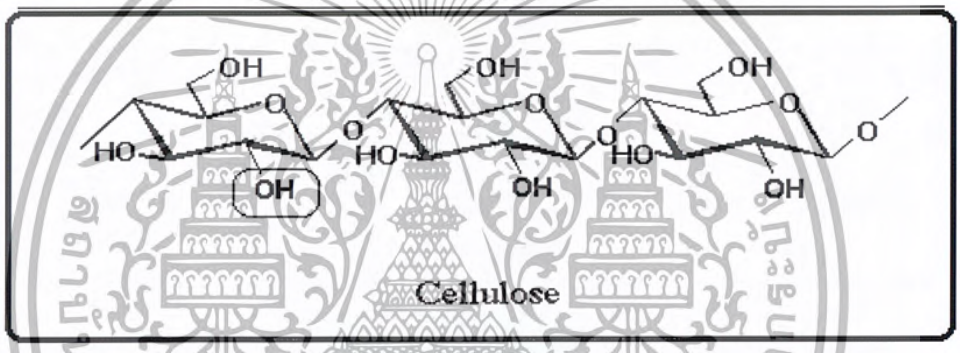
ไคตินมีสมบัติเป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ กรดเจือจาง ด่างเจือจาง และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์แก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟุริก และกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก ความเข้มข้นร้อยละ 78-79 และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ ต่อมาได้ค้นพบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับไคติน ได้แก่ เอ็น,เอ็น-ไดเมทธิลอะเซทาไมด์ (N-N-dimethylacetamide) และ เอ็น-เมทิลไพโรลิโดน (N-methylpyrolydone) ร่วมกับลิเทียมคลอไรด์ (Lithiumchloride)ในปริมาณเล็กน้อย (Austin และคณะ, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไคติน

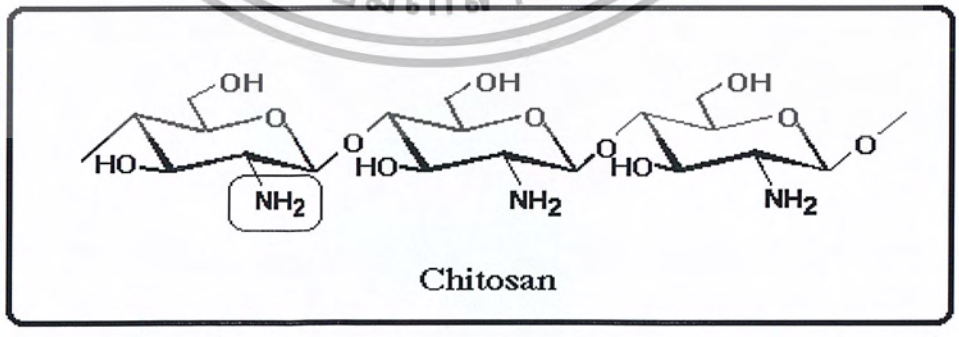
ที่มา : Muzzarelli (1977)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : Muzzarelli (1977)

1.2 <u>ไคโตแซน</u>



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของไคโตแซน

ที่มา : Muzzarelli (1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการไฮโดรไลส์เอาหมู่อะเซทิลออกจากพอลิเมอร์ของไคติน การนำเอากลุ่มอะเซทิลออกมากหรือน้อย จะคิดเป็นร้อยละของการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) สูตรโครงสร้างของไคโตแซน แสดงดังรูปที่ 3

หมู่อะเซทิลของไคตินจะถูกตัดออกเหลือหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยทั่วไปหมู่อะเซทิลถูกไฮโดรไลส์หรือหลุดไปประมาณร้อยละ 60 จะเรียกว่า ไคโตแซน ถ้าหมู่อะเซทิลถูกไฮโดรไลส์หรือหลุดไปประมาณร้อยละ 90 - 100 จะเรียกไคโตแซนชนิดนี้ว่า fully deacetylated chitosan

ไคโตแซนมีชื่อทางเคมีว่าพอลิ-เบตา-(1,4)-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคส (poly-β-(1,4)-2-deoxy-D-glucose) สมบัติที่แตกต่างจากพอลีแซคคาไรด์อื่นๆ คือไคโตแซนมีประจุลบ เนื่องจากไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอิสระที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ไคโตแซนสามารถละลายได้ดีในกรดอินทรีย์ต่างๆ ตัวทำละลายที่ดีของไคโตแซน คือกรดฟอร์มิก ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.2-100 โดยปริมาตร นอกจากนี้ไคโตแซนสามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโรคลอริกและกรดไนตริกที่เจือจางและละลายได้เล็กน้อยในกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร โดยส่วนใหญ่เมื่อจะนำไคโตแซนไปใช้ประโยชน์มักจะละลายในกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติก ไคโตแซนมีสมบัติไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง ไม่ละลายน้ำที่มีพีเอชสูงกว่า 6.5 แต่ถ้านำไคโตแซนมาบดแห้งกับกรดอินทรีย์จะได้ไคโตแซนที่สามารถละลายน้ำได้ จากสมบัติดังกล่าว จึงทำให้มีการนำไคโตแซนไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางมากกว่าที่จะใช้ในรูปของไคติน

ไคโตแซนเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดและย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ และไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไคโตแซนสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิดแล้วเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้ สารละลายไคโตแซนมีความเหนียว (viscous) มีความใสและสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเจล เม็ดและเส้นใยได้ ไคโตแซนมีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งสามารถจะทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อที่จะเปลี่ยนให้เป็นสารอนุพันธ์ (derivatives) อื่นๆ ได้หลายชนิด เช่น เอ็น-คาร์บอกซีบิวทิล ไคโตซาน (N-carboxybutyl chitosan) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้ และใช้ทำเป็นฟิล์มหรือเป็นแผ่นกรองสารละลายช่วยในการตกตะกอนของโลหะหนักและไกลคอลไคติน ซึ่งมีสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้น เป็นต้น (Muzzarelli, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 **แหล่งของไคตินและไคโตแซน**

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ทางชีวภาพที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ ไคตินเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใยยึดสารต่างๆให้เป็นแผ่นและเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะและสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ พบไคตินได้ทั่วๆไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสัตว์จำพวกมีปล้อง เช่น กุ้ง ปู กั้ง แมลงชนิดต่างๆ หอยเปลือกแข็ง หอยมุก กระดองปลาหมึก (อุดมชัย, 2535) รวมไปถึงผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ (Cody และคณะ, 1990) อีกทั้งในสาหร่ายบางชนิด (Muzzurelli, 1977) ในธรรมชาติจะพบแหล่งไคโตแซนน้อยกว่าไคติน

ในสัตว์น้ำจำพวกมีเปลือกหุ้มตัว เช่น กุ้งและปู พบว่ามีสารพอลิเมอร์ที่เรียกว่า ไคติน คิดเป็นสัดส่วนดังต่อไปนี้ คือ ในเปลือกกุ้ง จะมีไคตินประมาณร้อยละ 14 - 27 (โดยเทียบกับน้ำหนักแห้ง) และในกระดองปู ขา กรรเชียง จะมีไคตินประมาณร้อยละ 13 -15 (โดยเทียบกับน้ำหนักแห้ง) (อุดมชัย, 2535)

1.4 **การผลิตไคตินและไคโตแซน**

1.4.1 การเตรียมไคติน

นำเปลือกกุ้งที่ได้มาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง และทำการแยกเอาเนื้อ ส่วนหัว ส่วนหาง และขากุ้งออกไป หลังจากนั้นนำเปลือกกุ้งไปตากแดดให้แห้ง แล้วบดให้มีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำมาบรรจุในถุงพลาสติกและเก็บในถังพลาสติกที่แห้ง สะอาด และมีฝาปิดมิดชิด ส่วนประกอบโดยน้ำหนักแห้งของเปลือกกุ้งจะประกอบด้วยไคตินร้อยละ 15-20 โปรตีนร้อยละ 25-40 และแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 40-55 ดังนั้นการเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งจะทำการแยกเอาโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนตออกและจะได้ส่วนที่เหลือเป็นไคติน เปลือกกุ้งที่เตรียมไว้จะถูกนำมาผ่านขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแคลเซียมคาร์บอเนต โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในอัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน กรองเอาสารละลายกรดออก และทำการทดลองในทำนองเดียวกันซ้ำอีกครั้ง หลังจากนั้นนำเปลือกกุ้งมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้งจนเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช กรอง และอบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเปลือกกุ้งมาผ่านขั้นตอนการกำจัดโปรตีน โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในอัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายด่าง 1:20 คนให้เข้ากัน ต้มที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมากรองล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้งจนเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช นำเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีนและแคลเซียมคาร์บอเนตออกแล้วมาผ่านขั้นตอนการ กำจัดสี และไขมัน โดยการล้างด้วยเอทานอล อัตราส่วนของเปลือกกุ้งต่อเอทานอลที่ใช้คือ 1: 10 ผสมให้เข้ากัน และแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมากรอง และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนดังกล่าว คือ ไคติน (Knorr, 1984) ดังภาพประกอบใน รูปที่ 4

รูปที่ 4 ผงไคติน
ที่มา : http://www.biomarinex.com/ images/chitin.jpg

1.4.2 <u>การเตรียมไคโตแซน</u>

ไคโตแซนจะถูกเตรียมจากไคตินโดยการทำปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชั่นด้วยสารละลายด่างเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง อัตราส่วนของสารต่างๆ ที่ใช้มีดังนี้ คือ ไคติน 10 กรัม โซเดียมโบโรไฮดรายด์ (sodium borohydride) 0.5 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 - 50 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งจนเป็นกลางเมื่อทดสอบด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ไคโตแซน (Knorr, 1984) ดังภาพประกอบในรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 ผงไคโตแซน

ที่มา : http://www.biomarinex.com/ images/chitosan.jpg

ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซน ดังแสดงในรูปที่ 6

1.4.3 การเตรียมคอลลอยดอลไคติน

การเตรียมคอลลอยดอล ไคติน (colloidal chitin) โดยวิธีของ Roberts และ Selitrennikoff (1998) เตรียมได้โดยนำผงไคติน 5 กรัม เติมลงไปในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 60 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน โดยมีการกวนตลอดเวลา นำส่วนผสมที่ได้เติมลงไปในเอทานอล เข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 2 ลิตร แล้วคนอย่างรวดเร็ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปทำให้ตกตะกอน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปล้างด้วย น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนกระทั่งได้คอลลอยดอล ไคติน เป็นกลาง (พีเอช 7.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 ขั้นตอนการผลิตไคตินและไคโตแซน

ที่มา : Knorr (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 การใช้ประโยชน์ไคติน

1.5.1 อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

กระดาษที่ผลิตได้จากการเพิ่มไคตินเข้าไปในกระบวนการผลิตจะมีประสิทธิภาพเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มไคตินเพียงร้อยละ 1 โดยน้ำหนักลงในเยื่อกระดาษ จะเพิ่มความทนทานของกระดาษและเร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ และเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่เหลือเมื่อทำเป็นแผ่นกระดาษแล้ว ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ รวมทั้งยังประหยัดพลังงานที่ใช้ตีเยื่อกระดาษได้มากถึงร้อยละ 90 กระดาษที่ผสมไคตินจะมีความแข็งแรงขณะเปียกดีขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับการทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงชอปปิ้ง และกระดาษเช็ดมือ (Deshpande, 1986)

1.5.2 ทางการแพทย์

แผ่นเส้นใยพ่องน้ำและด้ายเย็บแผลที่ทำมาจากไคตินจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจากกระดูกอ่อนเมื่อใช้ในการเร่งการรักษาบาดแผล การใช้ผลิตภัณฑ์ไคโตแซนที่มีประสิทธิภาพเพิ่มความรวดเร็วในการรักษาแผลผ่าตัดและไฟไหม้ ซึ่งมีรูปแบบต่างๆหลายรูปแบบ เช่น เป็นผง สารข้นเหนียว สารละลายฟิล์ม เส้นใยผลิตภัณฑ์แต่งแผล ทำน้ำยาทารักษาแผล ด้ายเย็บแผล เป็นต้น (Deshpande, 1986)

1.5.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

Muzzarelli (1977) ได้กล่าวถึงประโยชน์ของไคโตแซนในด้านเครื่องสำอาง โดยการนำไคโตแซนมาเป็นส่วนผสมในแชมพูสระผม ครีมนวดผมและครีมปรับสภาพผม เนื่องจากสารละลายไคโตแซนมีความหนืด เก็บความชุ่มชื้นได้ดีและมีคุณสมบัติในการเคลือบผมให้เงางาม สามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ที่ใช้แต่งหน้าเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น ความเรียบ ให้กับการแต่งหน้าได้นานๆ และใช้ทำโลชั่นรักษาผิว ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ป้องกันไม่ให้ผิวแห้ง เพิ่มความนุ่มเนียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.4 อุตสาหกรรรมอาหาร

ใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ เพราะไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอิสระซึ่งสามารถที่จะจับกับไขมันได้ดี ทำให้เอนไซม์ในกระเพาะไม่สามารถย่อยไขมันได้ และไคโตแซนเองไม่ถูกละลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้สามารถที่จะขับถ่ายออกมาได้ โดยอาจอยู่ในรูปของแคปซูลอาหารเสริม เพื่อสะดวกในการบริโภค (Knorr, 1991) ดังแสดงในรูปที่ 7

รูปที่ 7 ไคโตแซนในรูปแบบแคปซูลอาหารเสริม
ที่มา : http://www.aicello.co.jp/eg/product/e-chitsn.htm

1.5.5 ด้านการบำบัดน้ำเสีย

นำไคโตแซนมาเป็นตัวตกตะกอน (flocculant) เพื่อการบำบัดน้ำเสีย ใช้กำจัดสารปรอทในน้ำให้มีระดับต่ำกว่าระดับที่อนุญาติให้มีในน้ำดื่ม และเพื่อกำจัดอนุภาคของโลหะหนัก (metal ion) เช่น Zn^{2+} ,Cd^{2+} ,Cu^{2+} และ Ni^{2+} ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Muzzarelli, 1977)

1.5.6 ทางด้านการเกษตร

ใช้ผงไคโตแซนโปรยบริเวณรากของพืช ทำให้เกิดการแพร่กระจายอากาศได้ดี ทำให้รากสามารถเจริญเติบโต ซอนไชได้ดีขึ้น และใช้เป็นปุ๋ยซึ่งทำให้แอกติโนมัยซิส (Actinomyces) มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่มีผลยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช เช่น *Fusarium oxysporum* และ *F. solani* อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ เช่น alfalfa mosaic virus เป็นต้น (Muzzarelli, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.7 ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ

ไคตินสามารถเร่งการเจริญเติบโตในไก่กระทง โดยผสมไคตินปริมาณร้อยละ 0.57 ลงในอาหารของไก่กระทง จะทำให้ไก่มีน้ำหนักหลังการฆ่าเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 12 เมื่อเทียบกับการเลี้ยงไก่ด้วยอาหารธรรมดาที่ไม่ผสมไคติน ผลที่ได้คือผู้เลี้ยงไก่ได้กำไรเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 70 การใช้ไคตินในอาหารไก่เพื่อเร่งการเจริญเติบโตนี้ เป็นการใช้ของเสียจากการผลิตผลิตภัณฑ์จากกุ้ง เช่น ในประเทศอินเดียมีปริมาณถึง 66,000 ตันต่อปี จะสามารถผลิตไคตินได้ถึง 2,000 ตัน เมื่อคิดเป็นเนื้อไก่ก็จะเพิ่มขึ้นประมาณ 20,000 ตันต่อปี (ฉกามาศ, 2529)

การใช้ประโยชน์จากไคตินและอนุพันธ์ของไคตินในด้านอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การใช้ประโยชน์จากไคตินและอนุพันธ์ของไคติน

อุตสาหกรรม	การใช้งาน
1. สิ่งทอและแผ่นฟิล์ม	เส้นใย
2. กระดาษและเยื่อกระดาษ	เมมเบรน
3. โลหะ	การนำอิออนของโลหะ และอโลหะกลับมาใช้ใหม่
4. โพลิเมอร์กึ่งสังเคราะห์	Copolymers of glucosamine Optically active polymers
5. สารฆ่าเชื้อรา	ใช้กับดินและพืช
6. ชีวเคมี	สารยับยั้งการเกิดโคเลสเตอรอล อุตสาหกรรมอาหารและเอนไซม์ สารยับยั้งการแข็งตัวของเลือด ช่วยรักษาบาดแผลให้หายเร็วขึ้น รักษาโรคผิวหนัง
7. ศัลยกรรม	N-acetyl-D-glucosamine
8. ยา	glucosamine

ที่มา : Deshpande (1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เอนไซม์ย่อยไคติน

2.1 ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์ย่อยไคติน

Shaikh และ Deshpande (1993) แบ่งเอนไซม์ที่ย่อยไคตินออกเป็น 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

2.1.1 endo – chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มได้ ไดอะเซทิลไคโตไบโอส (diacetylchitobiose) และไตรอะเซทิลไตรโอไบโอส (triacetyltriobiose) เป็นส่วนใหญ่

2.1.2 chitobiase จะย่อย dimer หรือไดอะเซทิลไคโตไบโอส หรือย่อยไคตินทีละหนึ่งหน่วยจากปลายด้าน non – reducing เป็น เอ็น-อะเซทิล-กลูโคซามีน (N – acetyl – glucosamine, NAG)

2.1.3. exo – chitinase จะย่อยไดอะเซทิลไคโตไบโอส หรือไคตินจากปลายด้าน non – reducing ทีละหนึ่งหน่วย

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

2.2 แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยไคติน

เนื่องจากไคตินเป็นสารที่มีอยู่และเกิดขึ้นในธรรมชาติเช่นเดียวกับเซลลูโลส ไคตินจึงเป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม เพราะไคตินจะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการในธรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชาติกลายเป็นปุ๋ยและสารอินทรีย์ในพื้นดิน พื้นน้ำ วนเวียนอยู่เช่นนี้ ซึ่งจัดเป็นข้อดีและข้อได้เปรียบของไคตินที่จะนำมาประยุกต์ใช้ (เกรียงไกร และคณะ, 2540)

ไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนสได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น N-acetylglucosamine (NAG) เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในพืชพบในเมล็ดถั่ว เมล็ดข้าวโพด สำหรับในสัตว์พบในพวก Protozoans, Coelenterates, Nematodes, Mollusca, Arthropod และจุลินทรีย์แหล่งเอนไซม์ที่น่าสนใจนำมาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกแบคทีเรียและรา (เกรียงไกร และคณะ, 2540) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Streptomyces* sp. (Skujins และคณะ, 1970) เชื้อราที่พบว่าผลิตเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Saccharomyces* sp., *Beauveria bassiana*, *Mycrothecium verucaria* เป็นต้น (Suresh และ Chandrasekaran, 1999)

2.3 <u>ข้อเปรียบเทียบของการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชและจุลินทรีย์</u> (เกรียงไกร และคณะ, 2540)

2.3.1 การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชต้องใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกพืชชนิดนั้นๆ มาก ทำให้ไม่สะดวกต่อการควบคุมสภาวะแวดล้อม รวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ต่างจากการผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อยและเสียค่าใช้ จ่ายน้อย

2.3.2 การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชได้ผลผลิตที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับฤดูกาล แต่การผลิตโดยใช้จุลินทรีย์จะให้ผลผลิตคงที่

2.3.3 การผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากพืชให้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่น้อยกว่าการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4 ประโยชน์ของเอนไซม์ย่อยไคติน

เอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่างๆได้มากมายดังนี้

Carroad และ Tom (1978) ได้เสนอขั้นตอนการนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล คือ เปลือกกุ้งและปู มาเปลี่ยนเป็นสารที่มีประโยชน์หรือมีราคาแพง ซึ่งเป็นวิธีการนำของเสียกลับมาใช้เป็นประโยชน์ได้อีก การนำของเสียมาใช้ประโยชน์แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1 จะนำของเสียจากโรงงานมาผ่านกระบวนการเตรียมโดยการทำให้แห้งและบดให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาสกัดเอาไคตินออกโดยใช้กระบวนการทางเคมี ทำการสกัดโปรตีนออกด้วยการต้มกับด่าง และกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกโดยการต้มกับกรดเกลือ (HCl)

ขั้นที่ 2 นำไคตินที่ได้ไปเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ปริมาณมากจากนั้นกรองแยกเอนไซม์ออก

ขั้นที่ 3 นำเอนไซม์ที่ได้ย่อยไคตินที่เหลือจะได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น NAG หรือ Chitobiose (dimer) กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกจากกากที่เหลือ นำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนสารต่างๆเหล่านั้นให้เป็นของที่มีคุณค่าเช่น โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) เป็นต้น

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถนำไปใช้ในการย่อยไคตินและได้ผลผลิตสุดท้ายคือ เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทานอลหรือโปรตีนเซลล์เดียวได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่ย่อยไคตินที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชและกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูพืช (Smith และ Grula, 1983) เช่น *Beauveria bassiana* ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชเช่น White fly colorado, Potato beatle และ Corn earworm (*Heliothis zea*) เป็นต้น รวมทั้งยังสามารถใช้ในการศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อราและการศึกษาทางเทคโนโลยีของรา (Smith และ Grula, 1983) ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราเพื่อทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น (protoplast fusion) เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสเป็นไมโคเลส (mycolase) ที่มีบทบาทสำคัญในการเจริญและการแบ่งเซลล์ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58546

3. จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

จุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไคติเนสที่สำคัญ และพบเอนไซม์นี้ได้ในจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ จากรายงานของ Deshpande (1986) พบไคติเนสในแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Serratia sp., Pseudomonas sp., Clostridium sp., Aeromonas sp., Klebsiella sp.* และพบ ไคติเนสในเชื้อราเช่น *Trichoderma sp., Penicillium sp., Mucor sp.* ในยีสต์พบใน *Saccharomyces cerevisiae* (Correa และคณะ, 1982) ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ชนิดของจุลินทรีย์	สกุล
Schizomycetes	
Pseudomodales	Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Photobacterium
Eubacteriales	Chromobacterium, Archromobacter, Flavobacterium, Klebsiella, Serratia, Micrococcus, Clostridium, Corynebacterium, Arthrobacter, Bacillus, Erwinia
Actiomycetales	Actinomyces, Streptomyces
Myxomycetes	Cytophaga
Phytomycetes	Chitriomyces, Phycomyces
Ascomycetes	Aspergillus
Basidiomycetes	Lycoperdon, Irpex, Trametes, Coprinus, Beauveria
Fungi Imperfecti	Trichoderma

ที่มา : Ohtakara และคณะ (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในประเทศแถบซีกโลกตะวันตกการผลิตเอนไซม์ในทางการค้าจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งจะมีการอนุญาตให้มีการควบคุมทางด้านสิ่งแวดล้อมเช่นอุณหภูมิและพีเอช ปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) (Hessentine, 1987) ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็งนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดคือเชื้อรา เพราะมีลักษณะแตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆเนื่องจากความสามารถในการเจริญได้อย่างอิสระในสับสเตรทที่เป็นของแข็ง ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งจึงได้ประโยชน์มากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว และข้อดีของการใช้เชื้อราคือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไม่ซับซ้อน และใช้ความชื้นต่ำจึงป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย (Hessentine, 1987) นอกจากนั้นยังใช้สารละลายในการสกัดเอนไซม์ออกมาในปริมาณต่ำ ซึ่งเป็นการลดพลังงานและไม่สร้างปัญหามลพิษอีกด้วย ประโยชน์ของการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งจึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในประเทศโลกที่สาม (Carrizales และ Jaffe, 1986) อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการเหมาะสมกับการผลิตขนาดเล็ก จึงเหมาะกับผู้ที่มีต้นทุนต่ำและมีแรงงานสูง (Battaglino และคณะ, 1991)

3.1 *Trichoderma harzianum*

จากการทดลองของ Correa และคณะ (1982) และ Deshpande (1986) พบว่า จุลินทรีย์ในจำพวกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงที่สุดคือ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในถังหมักของ Felse และ Panda (1999)

3.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Harman, 1998)

เชื้อราในสกุล *Trichoderma spp.* ส่วนมากจะใช้การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ การแบ่งหมวดหมู่โดยพื้นฐานของเชื้อราในสกุลนี้จะแบ่งตามลักษณะโครงสร้างของเชื้อราและลักษณะของการสร้างสปอร์ ซึ่งปัจจุบันนี้มีการค้นพบเชื้อราในสกุลนี้แล้วถึง 33 สายพันธุ์ สายพันธุ์ส่วนใหญ่นั้นจะมีการปรับตัวให้วงจรชีวิตเป็นแบบไม่ใช้เพศ เช่น วงจรชีวิตของเชื้อ *Trichoderma harzianum* พบว่าวงจรชีวิตจะเริ่มต้นจากมีการเจริญเป็นเส้นใย (hypha) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร การสร้างสปอร์ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะเกิดเป็นลักษณะเซลล์เดี่ยว ซึ่งโดยปกติแล้วจะมีสีเขียว และจะมีการสร้าง conidia อย่างมากมาย เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ในระยะพักตัวจะสร้าง chlamydospores ซึ่งมีลักษณะเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เดี่ยวเช่นกัน และในบางครั้งจะเกิดการรวมตัวกันของ chlamydospores 2 อัน ส่วนใหญ่เชื้อราในสกุลนี้จะนำไปใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ โดยมีการผลิตเป็นทางการค้าและทางด้านเกษตรกรรมเป็นส่วนมาก

3.1.2 การใช้ประโยชน์จาก *Trichoderma harzianum*

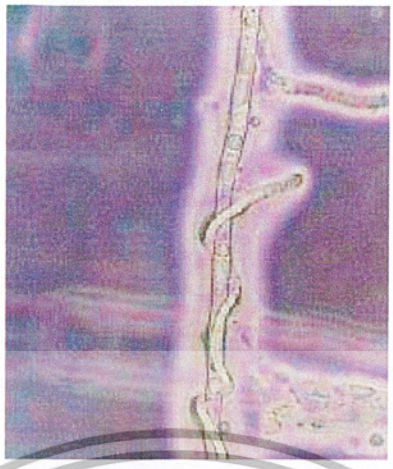
3.1.2.1 อาหารและสิ่งทอ

Trichoderma harzianum เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เป็นอย่างมาก มีการนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อยสลายสารประกอบเชิงซ้อนพวกพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมการผลิตอาหารบางชนิด ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* นำไปใช้ใน "biostoning" ในการผลิตผ้าฝ้ายเพื่อให้มีความนุ่มขึ้น หรืออาจนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเป็ด ไก่ เพื่อช่วยในการย่อยเฮมิเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบในข้าวบาร์เลย์หรือพืชชนิดอื่นๆที่เป็ด ไก่ กินเข้าไป เป็นต้น

3.1.2.2 Biocontrol agents

โดยส่วนใหญ่แล้วจะมีการนำเชื้อราในสกุลนี้ไปใช้ในการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-22 สามารถป้องกันโรคพืชได้หลายชนิด โดยการการเจริญเติบโตอยู่บริเวณรากของพืช (rhizosphere) ซึ่งจะเป็นการป้องกันรากของพืชนั้นๆจากโรคพืชชนิดที่ติดต่อทางรากพืชได้ เชื้อรานี้จะสามารถเจริญเติบโตไปตามการแผ่ขยายของรากพืชโดยอาศัยของเสียที่พืชขับถ่ายออกมาเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งของเสียเหล่านี้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชด้วย ดังนั้นเมื่อเชื้อ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-22 นี้สามารถใช้แหล่งอาหารนี้ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช จึงเท่ากับว่าสามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้นได้ด้วย และเชื้อ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-22 นี้ยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสซึ่งเป็น hydrolytic enzyme ทำให้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืชส่วนใหญ่ได้อีกด้วย (Hayes, 1998) ดังแสดงในรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 เชื้อ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-22 ขณะกำลังทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพืช

ที่มา : Hayes (1998)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ธนาคารเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ
2. หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
3. ปิเปตต์ขนาด 1.0 และ 5.0 มิลลิลิตร
4. ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์ขนาด100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวงขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
7. เข็มเขี่ยเชื้อ
8. ลูปเขี่ยเชื้อ
9. ที่วางหลอดทดลอง
10. แท่งแก้วรูปตัวแอล
11. ขวดเซนตริฟิวจ์ขนาด 500 มิลลิลิตร
12. คิวเวต (cuvett)

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เชื้อรา *Trichoderma harzianum*
2. เชื้อราที่มีความสารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่ได้รับการคัดเลือกจากแหล่งต่างๆในสภาพธรรมชาติ จำนวน 22 สายพันธุ์

3. เครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ
2. ตู้บ่มเชื้อ
3. ตู้อบลมร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ
5. เครื่องชั่งสาร
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
8. กล้องจุลทรรศน์
9. กล้องถ่ายรูปจุลทรรศน์

4. สารเคมี

1. ผงเปลือกปู
2. คอลลอยดอล ไคติน
3. อาหาร PDA
4. ผงวุ้น
5. แอมโมเนียมคลอไรด์
6. ยีสต์สกัด
7. แมกนีเซียมซัลเฟต
8. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
9. โซเดียมฟอสเฟต
10. N-acetyl-D-glucosamine (NAG)
11. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
12. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
13. สีย้อม lactophenol cotton blue

5. วิธีการทดลอง

5.1 การเตรียมแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อรา

นำเปลือกปูที่ทิ้งแล้ว แกะส่วนที่ไม่ใช่เปลือกออกให้หมด นำมาล้างให้สะอาด นำไปตากแดด เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender) แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh จะได้ผงเปลือกปู เก็บในขวดเก็บสาร นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การเตรียมอาหารในการคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ดัดแปลงจากสูตรอาหารของวรรณวิไล (2537) มีส่วนประกอบดังนี้ ผงเปลือกปู 15 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 3 กรัม/ลิตร ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม/ลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม/ลิตร และโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัม/ลิตร จากนั้นปรับพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 4.5 และเติมผงวุ้น 20 กรัม/ลิตร

เตรียมอาหารใส่ในขวดอาหารขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.3 การคัดเลือกและแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินมา 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ใส่น้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองให้ตัวอย่างกระจายอย่างทั่วถึง ปิเปตตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารสำหรับคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสในข้อที่ 5.2 ทำการ spread plate เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารและแยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เมื่อได้เชื้อราที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการเขี่ยเอาเส้นใยใส่ลงในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA (Redman และRodriguez, 2002) เก็บรักษาในตู้เย็น ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 เดือน

5.4 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อราผลิตขึ้นในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลว

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Jaunaiux, 1965) เป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อราที่คัดเลือกผลิตได้ และเปรียบเทียบกับเชื้อราที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง โดยอาหารเหลวที่ใช้คือสูตรอาหารในข้อ 3.5.2

5.5 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ไปทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ lactophenol cotton blue เป็นสีย้อม รวมทั้งทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบลักษณะและสีของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่เจริญในหลอดทดลอง และทำการบันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ลักษณะทางกายภาพและแหล่งที่พบของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส

ลักษณะทางกายภาพรวมทั้งแหล่งที่มาของเชื้อรา และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ทำการแยกได้จากธรรมชาติแสดงดังตารางที่ 3 และ ในรูปที่ 9 – 31 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพและแหล่งที่พบของเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส

เชื้อรา	ลักษณะทางกายภาพ	แหล่งที่พบเชื้อรา
A	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีขาว	ดิน จากหมู่บ้านเฟื่องฟ้า เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ
B	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีดำ	ดิน จากตลาดแฮปปี้แลนด์ เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ
C	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอ่อน	น้ำ จากตลาดแฮปปี้แลนด์ เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ
D	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีขาว	ดิน จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียว	ดิน จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
F	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีดำ	ดิน จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
G	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวเหลือง	ดิน จากหมู่บ้านนักกีฬา เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ
H	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม	น้ำ จากหมู่บ้านนักกีฬา เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ
I	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวเข้ม	ดิน จากถนนสุขุมวิท 101 เขตพระโขนง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา	ลักษณะทางกายภาพ	แหล่งที่พบเชื้อรา
J	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวเข้ม	ดิน จากถนนเจริญกรุง เขตบางรัก กรุงเทพฯ
K	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอ่อน	น้ำ จากตลาดสดบางรัก เขตบางรัก กรุงเทพฯ
L	เส้นใยมีสีเทา สปอร์มีสีขาว	ดิน จากสะพานปลากรุงเทพฯ เขตยานนาวา กรุงเทพฯ
M	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีขาว	ดิน จากสะพานปลากรุงเทพฯ เขตยานนาวา กรุงเทพฯ
N	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวขี้ม้า	น้ำ จากสะพานปลากรุงเทพฯ เขตยานนาวา กรุงเทพฯ
O	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีขาว	ดิน จากอำเภอมวกเหล็ก จังหวัด สระบุรี
P	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีขาว	ดิน จากอำเภอบ้านโป่ง จังหวัด ราชบุรี
Q	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวเข้ม	ดิน จากเกาะเสม็ด จังหวัด ระยอง
R	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีน้ำตาลเหลือง	น้ำ จากเกาะเสม็ด จังหวัด ระยอง
S	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม	ดิน จากสวนลุมพินี เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ
T	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีดำ	ดิน จากสวนลุมพินี เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ
U	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียว	ดิน จากสวนลุมพินี เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ
V	เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีดำ	น้ำ จากสวนลุมพินี เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ A

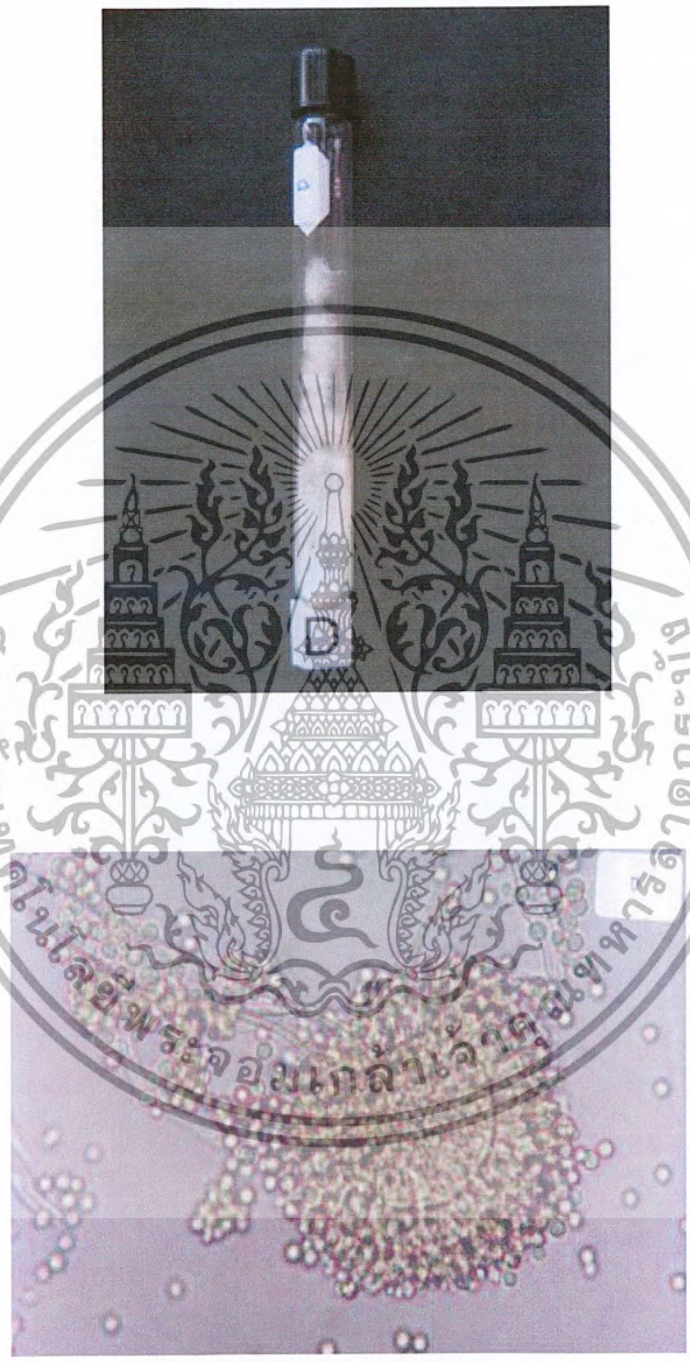
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 13 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ E

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 14 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 15 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 16 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 17 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ J

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 19 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ M

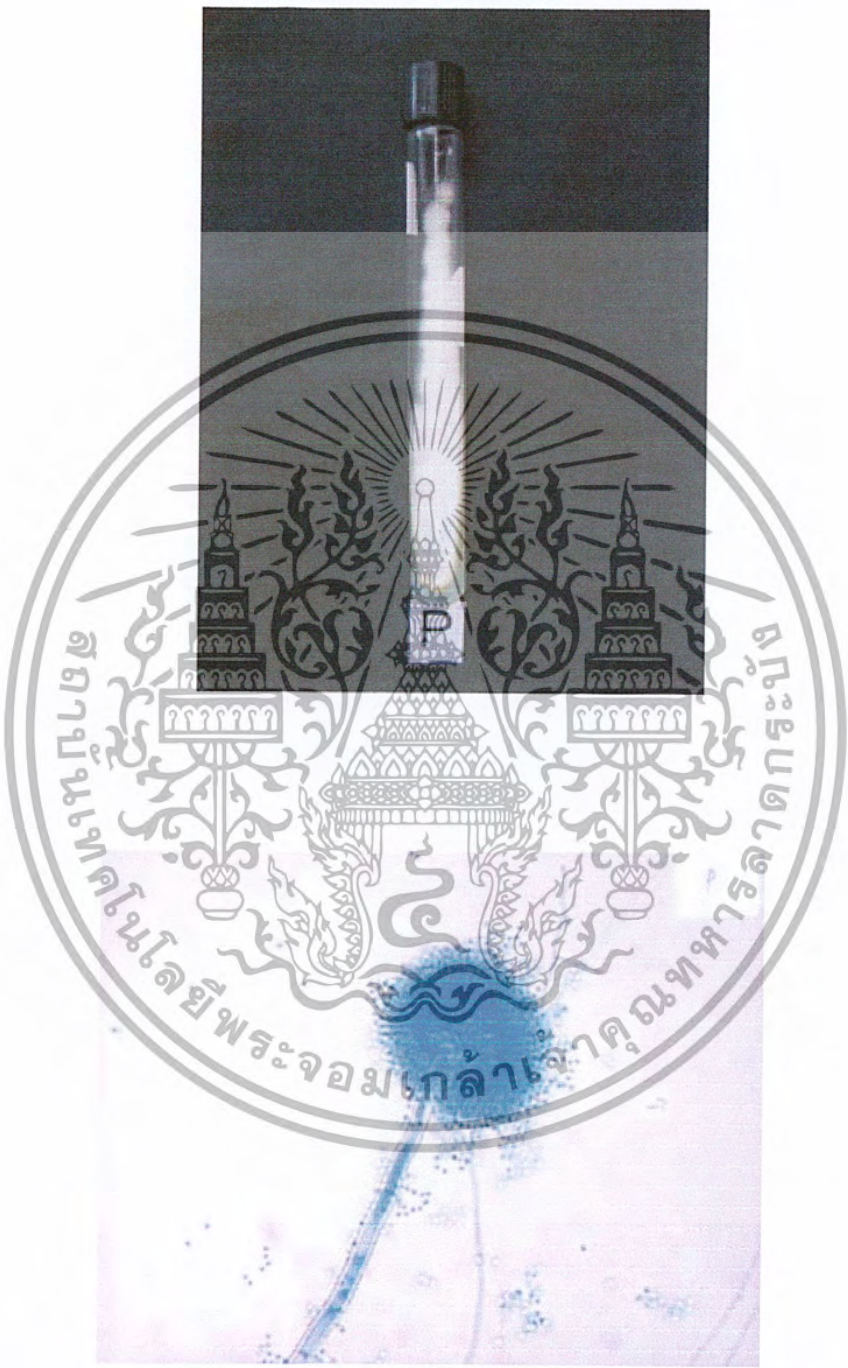
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 22 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ N

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 23 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

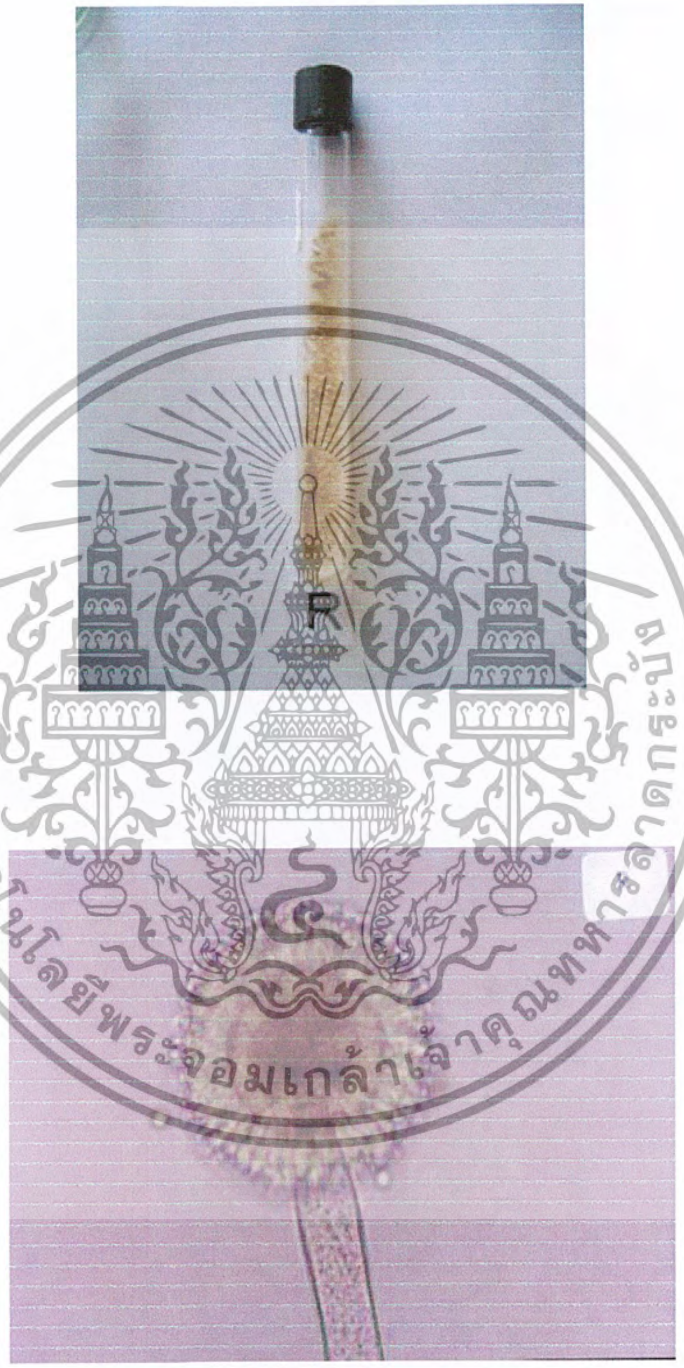


รูปที่ 24 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ P

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

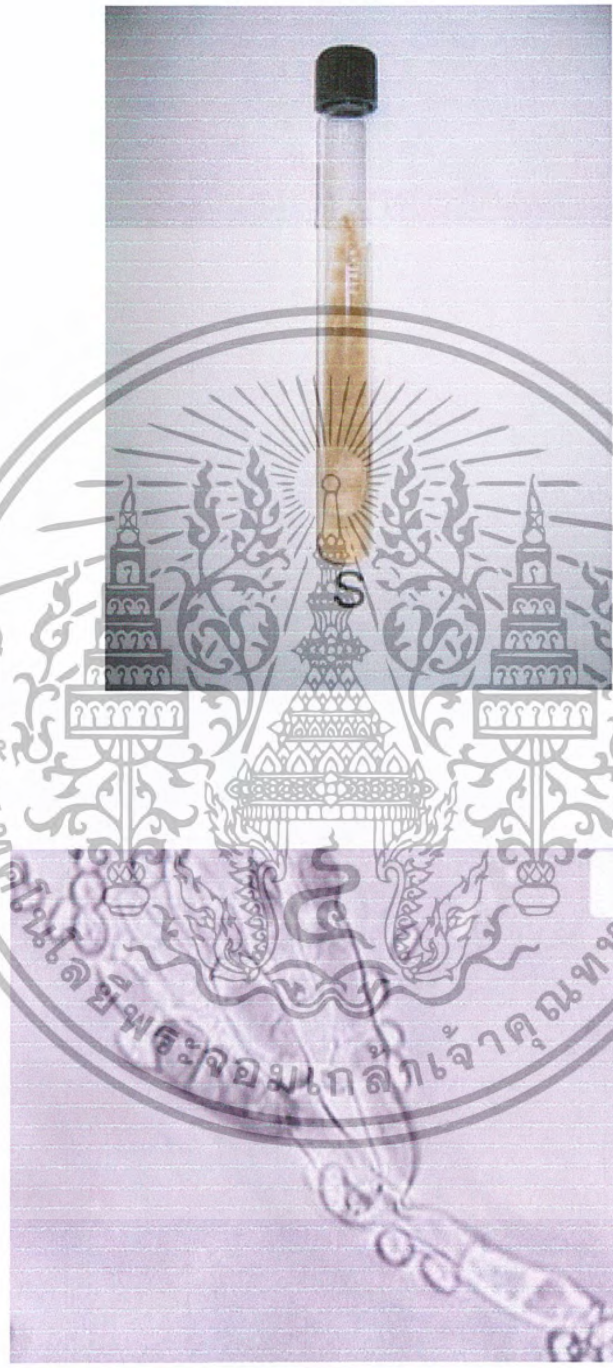
รูปที่ 25 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ Q

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 27 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ S

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 28 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 29 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ U

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 30 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ V

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 31 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อราที่ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 22 สายพันธุ์ในสภาวะอาหารเหลว โดยทำการสุ่มตัวอย่าง 4 วัน (วันที่ 3, 4, 5, 6 และ7) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที นำเอาส่วนใสที่เป็นสารละลายเอนไซม์ไปทำการวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส พบว่า ค่าพีเอชของเชื้อราทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ C จะมีแนวโน้มลดลงทั้งหมดรวมถึงเชื้อ *Trichoderma harzianum* ซึ่งใช้เป็นเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิงด้วย แต่เชื้อราสายพันธุ์ C จะมีค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 และค่าพีเอชค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 6 ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราทั้งหมดจากการทดลอง 2 ซ้ำแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าพีเอชเฉลี่ยของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกและเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว

เชื้อรา สายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง			
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
A	7.764	7.665	7.640	7.647
B	7.740	7.701	7.641	7.488
C	7.694	7.855	7.725	7.547
D	7.824	7.725	7.677	7.646
E	7.881	7.800	7.738	7.669
F	7.715	7.604	7.484	7.435
G	7.786	7.750	7.710	7.580
H	7.778	7.700	7.690	7.631
I	7.782	7.740	7.722	7.643
J	7.825	7.739	7.721	7.675
K	7.788	7.630	7.611	7.590
L	7.905	7.844	7.821	7.793
M	7.884	7.725	7.690	7.622
N	7.816	7.657	7.634	7.601
O	7.791	7.654	7.602	7.555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา สายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง			
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
P	7.802	7.734	7.701	7.665
Q	7.776	7.656	7.603	7.574
R	7.718	7.706	7.695	7.563
S	7.822	7.729	7.598	7.516
T	7.824	7.805	7.748	7.677
U	7.777	7.716	7.625	7.478
V	7.833	7.781	7.716	7.654
Trichoderma harzianum	7.890	7.853	7.847	7.798

เมื่อวัดค่าพีเอชแล้วนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ P, Q, S, T และ U สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้ใกล้เคียงกับเชื้อราสายพันธุ์อ้างอิงคือ *Trichoderma harzianum* โดยเชื้อราสายพันธุ์ P, Q, S และ U จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดในวันที่ 3 คือ 0.0780, 0.0598, 0.0778 และ 0.0660 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ T และ *Trichoderma harzianum* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดในวันที่ 4 คือ 0.0798 และ 0.0801 ไมโครโมล/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่วัดได้ต่ำนั้นอาจเป็นเพราะในการทดลองนี้ใช้ผงเปลือกปูที่ได้ทำการเตรียมขึ้นเองเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งแตกต่างจากผลการทดลอง Deane และคณะ (1998) ซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากการเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma harzianum* ในอาหารเหลวได้ 0.86 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยใช้ไคตินจากผงเปลือกปู (Crab Shell Chitin) จากบริษัท Sigma (UK) เป็นแหล่งคาร์บอน ผงเปลือกปูที่ทำการเตรียมขึ้นเองนั้นไม่มีการกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยไคติน (Knorr, 1984) ทำให้ได้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้น้อยลง ส่วนเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆนั้นพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสน้อยมากอย่างมีนัยสำคัญ กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราทั้งหมดจากการทดลอง 2 ซ้ำแสดงในตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราที่คัดเลือกและเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เชื้อรา สายพันธุ์	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ไมโครโมล/มิลลิลิตร)			
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
A	0.0040 [a]	0.0022 [a]	0.0017 [a]	0.0016 [a]
B	0.0030 [a]	0.0034 [a]	0.0030 [a]	0.0007 [a]
C	0.0026 [a]	0.0017 [a]	0.0015 [a]	0.0008 [a]
D	0.0029 [a]	0.0029 [a]	0.0029 [a]	0.0031 [a]
E	0.0032 [a]	0.0031	0.0047	0.0035
F	0.0031 [a]	0.0033 [a]	0.0031 [a]	0.0019 [a]
G	0.0038 [a]	0.0024 [a]	0.0021 [a]	0.0021 [a]
H	0.0016 [a]	0.0036 [a]	0.0021 [a]	0.0024 [a]
I	0.0045 [a]	0.0046 [a]	0.0038 [a]	0.0051 [a]
J	0.0052 [a]	0.0026 [a]	0.0023 [a]	0.0022 [a]
K	0.0025 [a]	0.0012 [a]	0.0014 [a]	0.0019 [a]
L	0.0009 [a]	0.0008 [a]	0.0004 [a]	0.0004 [a]
M	0.0061 [a]	0.0036 [a]	0.0027 [a]	0.0019 [a]
N	0.0029	0.0022	0.0024	0.0025 [a]
O	0.0076 [a]	0.0044 [a]	0.0033 [a]	0.0011 [a]
P	0.0780 [d]	0.0765 [d]	0.0712 [d]	0.0528 [bcd]
Q	0.0598 [bcd]	0.0274 [bcd]	0.0036	0.0013
R	0.0074	0.0024	0.0022	0.0020
S	0.0778 [d]	0.0770 [d]	0.0561 [bcd]	0.0552 [bcd]
T	0.0783 [d]	0.0798 [d]	0.0706 [d]	0.0643 [cd]
U	0.0660 [cd]	0.0351 [bcd]	0.0050 [a]	0.0024 [a]
V	0.0034 [a]	0.0031 [a]	0.0030 [a]	0.0027 [a]
Trichoderma harzianum	0.0792 [d]	0.0801 [d]	0.0718 [d]	0.0672 [d]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกและแยกเชื้อราจากสภาพธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้ผงเปลือกปูเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราได้ทั้งสิ้นจำนวน 22 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตรเดียวกันเพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราอ้างอิง คือ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* พบว่ามีเชื้อราเพียง 6 สายพันธุ์ ที่สามารถวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ส่วนเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามการทดลองในขั้นนี้ก็ยังไม่สามารถกล่าวได้อย่างชัดเจนว่ามีเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีค่ากิจกรรมสูงได้เพียง 6 สายพันธุ์นี้เท่านั้น เพราะการเก็บตัวอย่างในการทดลองนี้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั่วถึงและมากเพียงพอ จึงอาจยังมีเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีประสิทธิภาพสูงมากกว่านี้แต่ยังไม่ถูกค้นพบก็เป็นได้ งานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นการทดลองขั้นต้นเพื่อนำเสนอวิธีการค้นหาและคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่มีประสิทธิภาพ เพื่อประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกรียงไกร พรวิลาศสิริ, ฉัตรชัย เจริญชุษณะ, นพพล บรรลือเขตร์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน. โครงงานวิจัยพิเศษ(เทคโนโลยีชีวภาพ). สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

วรรณวิไล เกษนรา. 2537. การศึกษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคของมะเขือเทศและข้าวบาร์เลย์ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต(โรคพืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า13-15.

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

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

Battaglino, R.A., Huergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B. 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. 35: 292-296.

Carrizales, V., and Jaffe, W. 1986. Solid state fermentation : an appropriate biotechnology for developing countries. Intersciencia 11: 9-15.

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

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

Correa, T.U., Elango, N., Polacheck, I. and Cabib, E. 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.

Deane, E.E., Lynch, J.M., Perberdy, J.F. and Whipps, J.M. 1998. The purification and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. Biochimica et Biophysica Acta 1383. 101-110.

Felse, P.A. and Panda, T. 1999. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. Process Biochem. 34: 563-566.

Harman, G.E. 1998. *Trichoderma spp.*, including *T. harzianum, T. Viride, T. Koningii, T. hamatum* and other spp. Biological Control. Cornell University.

Hayes, C. 1998. Utilization of chitinase from *Trichoderma harzianum* strain T-22. Entomology 5(4): 123-148.

Hessentine, C.W. 1987. Solid state fermentation and overview, Int.biodeterior. 23: 79-89.

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

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

Ohtakara, A., Mitsutami, M. and Uchida, Y. 1978. Purification and some properrties of Chitinase from *Vibrio* sp. J. Fermentation Technol. 57: 169-173.

Redman, S. and Rodriguez, J. 2002. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato phatogen *Colletrotrichum coccodes* and it's role in pathogenicity. Department of Botany, University of Washington, Seattle, USA. pp. 1427-1434.

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

Roberts, W.K. and Selitrennikoff, C.P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 1998, 134: 169-176.

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

Skujins, J.J., Pukits, A. and McLaren. 1970. Chitinase of *Streptomyces sp.*: Purification and properties. Enzymologia. 39: 353-370.

Suresh, P.V. and Chandrasekaren, M. 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 14: 655-660.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Wang, S.L. and Chio, S.H. 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Enzym. Microb. Technol. 22: 629-633.

http://www.biomarinex.com/ images/chitin.jpg

http://www.biomarinex.com/ images/chitosan.jpg

http://www.aicello.co.jp/eg/product/e-chitsn.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมคอลลอยดอลไคติน (Roberts และคณะ, 1998)

การเตรียมคอลลอยดอลไคตินในการวิจัยดัดแปลงจากวิธีการเตรียมคอลลอยดอลไคติน ของ Robertsและคณะ (1998)

1. ชั่งผงเปลือกปู (Crab Shell Powder) 10 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (37% W/V) โดยที่ภาชนะที่ใส่กรดต้องมีการกวนตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เทสารละลายลงในแอลกอฮอล์ 95% ที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส กวนผสมตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเทของเหลวออกเติมน้ำกลั่นลงไป จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีก ทำประมาณ 5-6 ซ้ำจนไม่มีกรดเหลืออยู่ในส่วนของของแข็ง
4. นำไปวัดพีเอชจนได้พีเอช 7 นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จะได้คอลลอยดอลไคตินพีเอช 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไคตินของ Jeuniaux (1965)

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

1. สารละลายคอลลอยดอลไคติน 0.7 เปอร์เซ็นต์

ชั่งคอลลอยดอลไคติน 0.7 กรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในที่เย็น

2. สารละลายมาตรฐาน N-acetyl-D-glucosamine (NAG) เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง NAG 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

3. 0.1 M โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 3.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 7.17 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำสารทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน $NaH_2PO_4.2H_2O$ ต่อ $Na_2HPO_4.12H_2O$ เท่ากับ 87.7 มิลลิลิตร ต่อ 12.3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

4. สารเคมีของวิธี Alkaline copper sulphate ที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

รีเอเจนต์-1

ชั่ง โซเดียมคาร์บอเนต (ปราศจากน้ำ) 25 กรัม ผสมกับ โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เรต 25 กรัม กับโซเดียมไบคาร์บอเนต 20 กรัม และโซเดียมซัลเฟต (ปราศจากน้ำ) 200 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

รีเอเจนต์-2

ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วหยดกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 4 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีเอเจนต์-3

ชั่ง แอมโมเนียมโมลิปเดรต 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปอีก 21 มิลลิลิตร จากนั้นละลายโซเดียมอาร์ซิเนต 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรแล้วจึงค่อยเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซิเนตลงในสารละลายแอมโมเนียมโมลิปเดรต ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ในที่เย็น

รีเอเจนต์-4

ผสม รีเอเจนต์-2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน รีเอเจนต์-1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เตรียมไว้ก่อนทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

2. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

1. นำตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรมาเติมใน โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6) 1 มิลลิลิตรและสารละลายคอลลอยดอลไคติน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปต้มในน้ำเดือดทิ้งไว้ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้คอลลอยดอลไคตินตกตะกอน
4. ดูดเอาส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสด้วยวิธี Alkaline copper sulphate โดยใช้สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสดังนี้
   - 4.1 ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ในรีเอเจนต์-4 1 มิลลิลิตร
   - 4.2 ทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
   - 4.3 เติม เรเอเจนต์-3 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าจนกระทั่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หมด แล้วปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที
   - 4.4 เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

1. เตรียม stock solution ของ NAG ให้มีความเข้มข้น 100, 200, 400, 600 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 6) 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

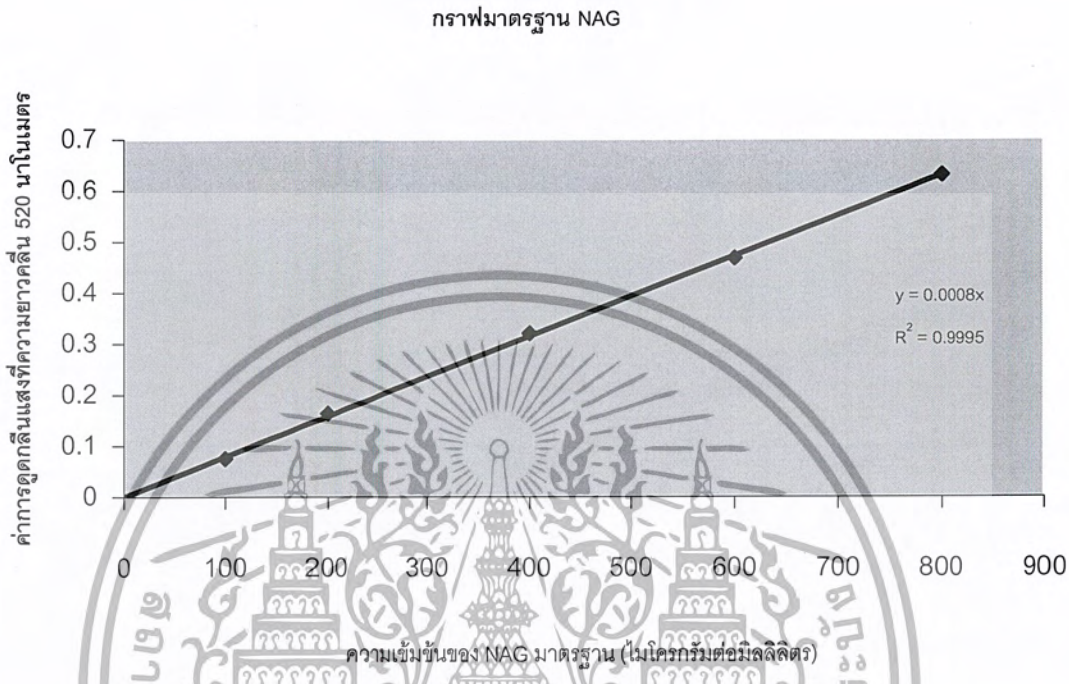
3. นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Alkaline copper sulphate ในข้อ 2

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร แล้วนำมาเขียนได้กราฟเส้นตรง ความชันเท่ากับ 0.0008

4. การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสคำนวณจากสูตร

$$\text{ยูนิต/มิลลิลิตร} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจาง} \times \text{ปริมาตรสารตัวอย่าง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระยะเวลาในการบ่ม}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ N-acetyl-D-glucosamine (NAG)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณทางสถิติ

1. การคำนวณทางสถิติของค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราแต่ละชนิด

กำหนดให้

1.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ A
2.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ B
3.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ C
4.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ D
5.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ E
6.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ F
7.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ G
8.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ H
9.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ I
10.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ J
11.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ K
12.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ L
13.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ M
14.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ N
15.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ O
16.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ P
17.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ Q
18.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ R
19.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ S
20.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ T
21.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ U
22.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราสายพันธุ์ V
23.00	=	ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าพีเอชเฉลี่ยของเชื้อราแต่ละชนิดที่วัดจากอาหารเหลวที่ใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3, 4 ,5 และ 6 วัน ตามลำดับที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 0.01

เชื้อรา	N	Subset for Alpha = .01							
		1	2	3	4	5	6	7	8
3.00	2	7.6933							
1.00	2	7.7267	7.7267						
19.00	2	7.7433	7.7433	7.7433					
21.00	2	7.7467	7.7467	7.7467					
18.00	2	7.7467	7.7467	7.7467					
7.00	2	7.7567	7.7567	7.7567	7.7567				
9.00	2	7.7633	7.7633	7.7633	7.7633	7.7633			
8.00	2	7.7667	7.7667	7.7667	7.7667	7.7667			
17.00	2		7.7800	7.7800	7.7800	7.7800			
6.00	2		7.7800	7.7800	7.7800	7.7800			
16.00	2		7.7867	7.7867	7.7867	7.7867	7.7867		
2.00	2		7.7867	7.7867	7.7867	7.7867	7.7867		
11.00	2		7.7967	7.7967	7.7967	7.7967	7.7967	7.7967	
14.00	2		7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	
10.00	2		7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	7.8033	
20.00	2		7.8133	7.8133	7.8133	7.8133	7.8133	7.8133	
22.00	2			7.8200	7.8200	7.8200	7.8200	7.8200	
15.00	2			7.8300	7.8300	7.8300	7.8300	7.8300	
4.00	2				7.8367	7.8367	7.8367	7.8367	7.8367
5.00	2					7.8500	7.8500	7.8500	7.8500
13.00	2						7.8700	7.8700	7.8700
12.00	2							7.8800	7.8800
23.00	2								7.9167
Sig.		.025	.011	.011	.019	.011	.013	.012	.011

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคำนวณทางสถิติของกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

กำหนดให้

1.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ A

2.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ B

3.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ C

4.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ D

5.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ E

6.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ F

7.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ G

8.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ H

9.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ I

10.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ J

11.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ K

12.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ L

13.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ M

14.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ N

15.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ O

16.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ P

17.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ Q

18.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ R

19.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ S

2000. = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ T

21.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ U

22.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสายพันธุ์ V

23.00 = กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

ตารางภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราแต่ละชนิดที่เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6วันที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 0.01

เชื้อรา	N	Subset for Alpha = .01			
		1	2	3	4
12.00	2	.0013			
2.00	2	.0027			
8.00	2	.0028			
3.00	2	.0028			
14.00	2	.0029			
4.00	2	.0029			
7.00	2	.0030			
5.00	2	.0031			
6.00	2	.0032			
11.00	2	.0032			
22.00	2	.0034			
9.00	2	.0045			
1.00	2	.0050			
10.00	2	.0052			
13.00	2	.0055			
15.00	2	.0066			
18.00	2	.0070			
17.00	2		.0516		
21.00	2			.0639	
19.00	2				.0795
16.00	2				.0815
20.00	2				.0822
23.00	2				.0830
Sig.		.029	1.000	1.000	.145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้