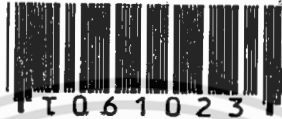


สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active Cells
และ Resting Cells

CHITIN OLIGOMER PRODUCTION BY BACTERIAL ACTIVE CELLS AND
RESTING CELLS



ธีระพันธ์ เจริญสาคร

THEERAPAN CHAROENSAKORN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

61023

- 7 ก.ค. 2549

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-1634-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

b. 11 553916
i.....

CHITIN OLIGOMER PRODUCTION BY BACTERIAL ACTIVE CELLS AND
RESTING CELLS



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2005

ISBN 974-15-1634-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2005

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active Cells และ Resting Cells
นักศึกษา	นายธีระพันธ์ เจริญสาคร
รหัสประจำตัว	43065201
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ซึ่งเจริญในสภาพ Active cells และ Resting cells พบว่าการย่อยสลายไคตินโดยแบคทีเรีย 6.0 ที่เจริญสภาพ Active cells ในอาหารไคตินมีเดียม (Chitin medium) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยมีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้การสะสมเอช-อะซีทิลกลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) และไคตินโอลิโกเมอร์ (Chitin oligomer) สูงสุด สภาวะการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรีย 6.1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไคตินคล้ายกับแบคทีเรีย 6.0 แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย 6.0 และ 6.1 ในสภาพ Active cells พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu / ml) เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยที่การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารไคตินมีเดียมเริ่มต้น 7.0 เป็น 9.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และให้การย่อยสลายไคตินมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์

การย่อยสลายไคตินโดยแบคทีเรีย 6.0 และ 6.1 ที่สภาวะ Resting cells ในสารละลายไคติน (Chitin suspension) พบการสะสมไคตินโอลิโกเมอร์ ได้แก่ ไคโตไตรโอส (Chitotriose) ไคโตเตโตรส (Chitotetrose) ไคโตเพนโตส (Chitopentose) และไคโตเฮกโซส (Chitohexose) เพียงเล็กน้อย โดยให้การเจริญเพิ่มขึ้นจาก 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชเริ่มต้นจาก 7.0 เป็น 8.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยพบประสิทธิภาพการย่อยสลายไคตินประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย 6.0 และ 6.1 ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและใช้ชุดทดสอบ GNI+ พบว่าอยู่ในจีนัส *Sphingobacterium* และจีนัส *Brevundimonas* ตามลำดับ

Thesis Title	Chitin Oligomer Production by Bacterial Active Cells and Resting Cells
Student	Mr. Theerapan Charoensakorn
Student ID	43065201
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2005
Thesis Advisor	Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

The comparison of chitin oligomers production between bacterial isolates No. 6.0 and 6.1 in active cells state and resting cells state was studied. It was found that the chitin digestion by bacterial isolate 6.0, in active cell state, which cultivated in 150 ml of chitin medium (supplemented with 0.5 % peptone as nitrogen source) on 200 rpm of rotary shaker at 25 °C was the optimal condition showed the maximum accumulate concentration of N-acetyl glucosamine and chitin oligomers. Bacterial isolate No. 6.1 gave the optimal condition as same as isolate No. 6.0 but the optimal temperature was shifted to 30 °C. Cells numbers and pH of both isolates increased from 10^7 to 10^{10} cfu / ml and from 7.0 to 9.0, respectively. More than 85 % of Chitin were degraded by isolates No. 6.0 and No. 6.1.

The chitin digestion by resting cells state was performed in chitin suspension, presented the small accumulation of chitin oligomers (chitotriose, chitotetrose, chito-pentose and chitohexose). In this state, cell numbers of isolate No. 6.0 and No. 6.1 were grown from 10^7 to 10^8 cfu/ml and pH shifted from 7.0 to 8.0. The chitin degradations of both isolates were about 10 %.

Identification of isolate No. 6.0 and 6.1 was performed by biochemical test and GNI+ test kit. It was indicated that isolate No. 6.0 and 6.1 was identified as bacteria in Genus *Sphingobacterium* and Genus *Brevundimonas*, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ และมีค่าอย่างยิ่ง ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ซึ่งเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยเหลือในการทำวิจัยในด้านการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

กราบขอบคุณ บริษัท bioMérieux (Thailand) Ltd. ที่กรุณาให้ความรู้ และสนับสนุนชุดทดสอบการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณ คุณวิภาวี แบบประเสริฐ คุณวิชุดา เกตุใหม่ คุณอำพร อุดมศักดิ์สกุล รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้อง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา

และที่สำคัญ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรักให้กำลังใจ และเข้าใจผู้วิจัยตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ธีระพันธ์ เจริญสาคร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของโคตินและโคโตซาน.....	3
2.1.1 โครงสร้างของโคตินและโคโตซาน.....	3
2.1.2 การจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์.....	4
2.1.3 คุณสมบัติการละลาย.....	4
2.2 การย่อยสลายโคตินและโคโตซาน.....	5
2.2.1 การย่อยสลายโดยกรด.....	5
2.2.2 การย่อยสลายโดยใช้ความร้อน.....	5
2.2.3 การย่อยสลายโดยใช้รังสี.....	6
2.2.4 การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	6
2.3 เอนไซม์ย่อยสลายโคติน.....	7
2.4 Active cells และ Resting cells.....	8
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	10
3.1.1 อุปกรณ์.....	10
3.1.2 เคมีภัณฑ์.....	11
3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	11
3.1.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการจำแนกชนิดแบคทีเรีย.....	12
3.1.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์.....	12
3.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	12
3.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารไคตินมีเดีย.....	13
3.2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายไคติน.....	13
3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์.....	13
3.3.1 ศึกษาแบคทีเรียในระยะ Active cells.....	13
3.3.1.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อ การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells.....	13
3.3.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells.....	14
3.3.1.3 ศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อ การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells.....	14
3.3.1.4 ศึกษาปริมาณของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต ไคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1.5	ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	15
3.3.2	ศึกษาแบคทีเรียในระยะ Resting cells.....	15
3.3.2.1	ศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อ การผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	15
3.3.2.2	ศึกษาปริมาณของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	15
3.3.2.3	ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	16
3.4	การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย	16
3.4.1	การจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมี.....	16
3.4.2	การจำแนกด้วยชุดทดสอบของบริษัท bioMérieux	16
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	17
4.1	ผลการศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1	17
4.1.1	ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมาตรฐาน.....	17
4.1.2	ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน	19
4.2	ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์.....	20
4.2.1	ผลการศึกษาแบคทีเรียในระยะ Active cells	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อ การผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	20
4.2.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	23
4.2.1.3 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม ต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	27
4.2.1.4 ผลการศึกษาปริมาตรของอาหารที่เหมาะสมต่อ การผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	31
4.2.1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Active cells	36
4.2.2 ผลการศึกษาแบคทีเรียในระยะ Resting cells	39
4.2.2.1 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อ การผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	39
4.2.2.2 ผลการศึกษาปริมาตรของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	42
4.2.2.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต โคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรีย ในระยะ Resting cells	45
4.3 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย.....	48
4.3.1 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การคัดลอกหรือการนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยรณัผลการทดลอง.....	55
บทที่ 6 สรูลผลการทดลอง.....	67
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	92



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แสดงผลได้ของเอน-อะซิติกกลูโคซามีนต่อความเข้มข้นแปปโดนที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมและเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	25
4.2 แสดงปริมาณเอน-อะซิติกกลูโคซามีนทั้งหมดในฟลาสก์ จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีแปปโดน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	34
4.3 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เปรียบเทียบกับแบคทีเรียจิ้นส์ต่างๆ	51
(ต่อ).....	52
4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ด้วยชุดทดสอบ GNI+	53
(ต่อ).....	54
5.1 เปรียบเทียบการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์สูงสุด โดยแบคทีเรียรหัส 6.0 ในระยะ Active cells ที่สภาวะต่างๆ	59
(ต่อ).....	60
5.2 เปรียบเทียบการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์สูงสุด โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในระยะ Active cells ที่สภาวะต่างๆ.....	61
(ต่อ).....	62
5.3 เปรียบเทียบการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์สูงสุด โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในระยะ Resting cells ที่สภาวะต่างๆ.....	63
(ต่อ).....	64
5.4 เปรียบเทียบการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์สูงสุด โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในระยะ Resting cells ที่สภาวะต่างๆ.....	65
(ต่อ).....	66
ข.1 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารโคตินมีเดียมที่มีแปปโดน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงโครงสร้างของโคตินและโคโตซาน.....	3
2.2 แสดงการจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์โคติน แบบแอลฟา แบบเบตา และแบบแกมมา.....	4
4.1 แสดงการเจริญ การสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมาตรฐาน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	17
4.2 แสดงปริมาณโคตินในอาหารโคตินมีเดียมาตรฐาน และสารละลายโคติน ที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	18
4.3 แสดงการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารเหลวโคตินมีเดียมาตรฐาน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	18
4.4 แสดงการเจริญ การสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	19
4.5 แสดงการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน จากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	21
4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	21
4.7 แสดงการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	23
4.9 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	24
4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโต ความเข้มข้นต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	24
4.11 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์เมื่อ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	26
4.12 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	27
4.13 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าที่ค่าต่างๆ.....	28
4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.15 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลลิโกเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโติน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	30
4.16 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	31
4.17 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	32
4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน	33
4.19 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	35
4.20 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	35
4.21 แสดงการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.22 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน	37
4.23 แสดงการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์ ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	38
4.24 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	39
4.25 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายไคติน โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	40
4.26 แสดงการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายไคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	41
4.27 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	42
4.28 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายไคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน	43
4.29 แสดงการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์ เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายไคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.30 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
4.31 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน	46
4.32 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์ ในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยบ่มเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47
4.33 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	48
4.34 แสดงการย้อมติดสีแกรมและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า.....	49
4.35 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารแข็ง คออลอยด์คอลโคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	50
ข.1 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร กับปริมาณเซลล์.....	83
ข.2 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ระหว่างปริมาณเซลล์ กับน้ำหนักเซลล์แห้ง	83
ข.3 กราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนระหว่างความเข้มข้นกับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร.....	84
ข.4 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน (5.022 นาที) ไคโตไบโอส (5.882 นาที) ไคโตไตรโอส (7.199 นาที) ไคโตเตตระโอส (9.076 นาที) ไคโตเพนโตส (11.632 นาที)	

เอกสารนี้โคโตเฮกซะโอส (15.082 นาที) สิ่งพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์ฉบับนี้นั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ขออนุญาต 86

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข.5 แสดงกราฟมาตรฐานของเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนและโคตินโอลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่โดยวิธี HPLC.....	87
ข.6 แสดงกราฟระหว่าง ln ของปริมาณเซลล์กับเวลา	91



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไคตินเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides) ที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายเซลลูโลส (Cellulose) ประกอบด้วยเอน-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) มาต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 กลูโคซิดิก (β -1,4 glucosidic) (Muzzarelli. 1977) ในธรรมชาติไคตินเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างภายนอกของสัตว์พวกครัสเตเชีย (Crustaceans) เช่น แมลง (Insects) หอย (Mollusca) และไส้เดือน (Nematodes) (Tjoelker *et al.*, 2000) รวมทั้งผนังเซลล์ (Cell walls) ของแบคทีเรีย (Bacteria) เชื้อรา (Fungi) และสาหร่าย (Algae) (Nishi *et al.*, 1979 ; Tsigos and Bouriotis. 1995)

ในปัจจุบันการผลิตไคตินในเชิงพาณิชย์ได้จากเปลือกกุ้ง กระจดองปูและกระจดองหมึก แต่การนำไคตินไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง โดยทั่วไปอยู่ที่ระดับ 7×10^5 ถึง 1×10^6 ดาลตัน (รัตนารุจิรวนิช. 2544) จึงยากต่อการพัฒนาและปรับแต่งผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการลดขนาดโครงสร้างโมเลกุลของไคตินให้เล็กลงในระดับโพลิโเมอร์ช่วยแก้ปัญหาหรือนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยถึงคุณสมบัติและการประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ ของไคตินโพลิโเมอร์ ทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัช การเกษตร การบำบัดน้ำเสียและสิ่งแวดล้อม และด้านวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ทำให้ความต้องการไคตินโพลิโเมอร์เพิ่มขึ้นในอนาคต

วิธีการย่อยไคตินให้มีขนาดเล็กลงสามารถทำได้ทั้งกระบวนการทางกายภาพ เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง การฉายรังสี กระบวนการทางเคมี เช่น การใช้กรด และกระบวนการทางชีวภาพ เช่นการใช้เอนไซม์ การย่อยไคตินโดยกระบวนการทางกายภาพและเคมีจำเป็นต้องใช้สภาวะที่รุนแรง ทำให้ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ยาก แต่การย่อยโดยกระบวนการทางชีวภาพใช้สภาวะรุนแรงน้อยกว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และความสม่ำเสมอมากกว่า การย่อยไคตินโดยกระบวนการทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้เอนไซม์พบข้อจำกัดบางประการ เช่น ขั้นตอนซับซ้อน เอนไซม์มีราคาแพง และสูญเสียกิจกรรมได้รวดเร็ว อีกแนวทางหนึ่งของการย่อยไคตินด้วยวิธีทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้เซลล์จุลินทรีย์ซึ่งให้การย่อยสลายได้รวดเร็วกว่าการใช้เอนไซม์อีกทั้งขั้นตอนไม่ซับซ้อน แต่จุลินทรีย์มีการเจริญระหว่างกระบวนการย่อยสลาย อาจนำผลิตภัณฑ์ไคตินโพลิโเมอร์มาใช้ในการเจริญ ทำให้ผลผลิตลดลง ดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยยับยั้งการใช้ผลิตภัณฑ์โดยควบคุมการเจริญ หรือใช้จุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะปิดตัวมาใช้อย่อยสลายไคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่สามารถย่อยไคตินได้

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียให้เป็นไคตินโอลิโกเมอร์ได้สูงสุด

1.2.3 เปรียบเทียบสภาวะในการย่อยไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียในระยะ Active cells และ Resting cells

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาคุณลักษณะและจำแนกชนิดของแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากเปลือกกุ้งที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานกุ้งแช่แข็ง ศึกษาและเปรียบเทียบการย่อยไคตินให้เป็นไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells และ Resting cells ในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ความเร็วในการเขย่า ปริมาตรของน้ำหมักและอุณหภูมิ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคตินและสภาวะที่ใช้ในย่อยสลายไคตินให้เป็นไคตินโอลิโกเมอร์ได้สูงสุดโดยแบคทีเรียในระยะ Active cells และ Resting cells นอกจากนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อเนื่องและการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

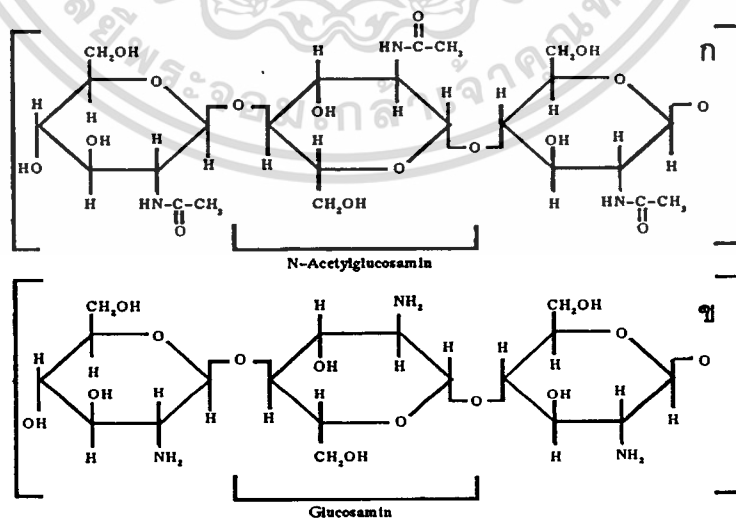
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน

2.1.1 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน

ไคตินและไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพ พบในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์จำพวกครัสเตเชียและแมลง ผนังเซลล์ของเชื้อรา แบคทีเรียและแพลงก์ตอน (Muzzarelli, 1977) ในธรรมชาติพบในรูปสารผสม (Composite material) กับสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน และสารอินทรีย์ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส (สุบุญ จิราญชัย และคณะ, 2544)

ในธรรมชาติพบไคตินอยู่ร่วมกับไคโตซาน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินในลักษณะผสมเป็นโคพอลิเมอร์ (Copolymer) โครงสร้างทางเคมีของไคตินประกอบด้วยหน่วยย่อยของ เอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีน (β -1,4-acetamide-2-deoxy-D-glucose หรือ N-acetylglucosamine) หน่วยย่อยต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic bond) (ภาพที่ 2.1 ก) ไคโตซานประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคซามีน (β -1,4-amino-2-deoxy-D-glucose หรือ Glucosamine) หน่วยย่อยทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยเอ็น-อะซีทิลกลูโคซามีนมีหมู่อะซิทามิโด (Acetamido group ; $-\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CH}_3$) มาเกาะ แต่กลูโคซามีนมีหมู่อมิโน (Amino group ; $-\text{NH}_2$) มาเกาะแทน (ภาพที่ 2.1 ข)



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของไคติน (ก) และไคโตซาน (ข)

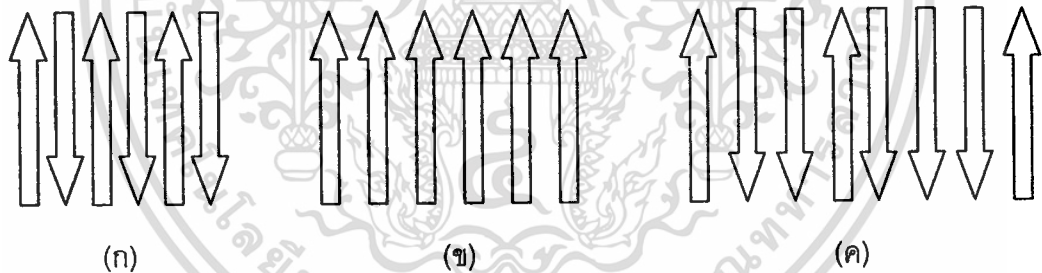
ที่มา :ดัดแปลงจาก Anonymous. (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีที่สายพอลิเมอร์ประกอบด้วยเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมากกว่ากลูโคซามีน เรียกว่าพอลิเมอร์นั้นว่าไคติน แต่ถ้ากลูโคซามีนน้อยกว่าเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน เรียกว่าพอลิเมอร์นั้นว่าไคโตซาน (รัตนารุจิรวนิช. 2544)

1.1.2 การจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์

ไคตินมีการจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์เป็นโครงสร้างผลึก (Crystalline form) ที่แข็งแรง (ภาพที่ 2.2) โครงสร้างนี้มีความแตกต่างกันตามแหล่งที่พบ ได้แก่ แบบอัลฟา (Alpha chitin ; α -chitin) ซึ่งพบในเปลือกกุ้งและปู สายพอลิเมอร์จัดเรียงตัวกลับไปมาสวนทิศทางการ (Anti parallel) มีความแข็งแรงสูงสุด แบบเบต้า (Beta chitin ; β -chitin) พบในแกนปลาหมึก (Squid pen) สายพอลิเมอร์เรียงตัวในทิศทางเดียวกัน (Parallel) และแบบแกมมา (Gamma chitin ; γ -chitin) พบในเส้นใยของรังไหมไซ (Cocoon fibers) ของแมลงปีกแข็ง (Beetle) สายพอลิเมอร์เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีทั้งทิศทางเดียวกัน และกลับทิศกัน (รัฐ พิษณุางกูร. 2544 ; Muzzarelli. 1977 ; Ruiz-Herrera and Martinez-Espinoza. 1999) Rudall and Kenchington. (1973) รายงานว่าเบต้าไคตินสามารถเปลี่ยนเป็นอัลฟาไคตินได้โดยทำปฏิกิริยากับลิเทียมไรโอไซยาเนต (Lithium thiocyanate)



ภาพที่ 2.2 แสดงการจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคตินแบบอัลฟา (ก) แบบเบต้า (ข) และแบบแกมมา (ค)

ที่มา : ดัดแปลงจาก รัฐ พิษณุางกูร. 2544

2.1.3 คุณสมบัติการละลาย

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ต่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์แก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก และกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิกเข้มข้น และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ (ปิยะบุตร วิณิชพงษ์พันธ์. 2544) เนื่องจากกรดชนิดดังกล่าวมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอที่ทำให้ประจุของหมู่อะซิทามิโดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในโมเลกุลของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนเป็นบวก และเกิดพันธะไอออนิก (Ionic bond) กับไอออนลบของตัวละลายกรดนั้นไปใช้ (สุวบุญ จิระกาญจชัย) ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ. 2544) นอกจากนี้ไคตินยังละลายได้ในสารละลายเกลือในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารละลายลิเทียมคลอไรด์ (Lithium chloride) ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (N,N-dimethylformamide) และเมธิลไพโรลิโดน (N-methyl pyrrolidone) (Austin and Zikakis. 1981) ซึ่งเกลือในตัวทำละลายสร้างพันธะไฮออนิกแทนพันธะไฮโดรเจน ทำให้ไคตินละลายได้ดีขึ้น

ไคโตซานไม่ละลายในน้ำ กรดเข้มข้น ต่าง แอลกอฮอล์ และอะซิโตน แต่ละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก กรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริกเจือจาง และละลายได้เล็กน้อยในกรดฟอสฟอริกเจือจาง ความสามารถในการละลายของไคโตซานเกี่ยวข้องกับการแตกตัวของหมู่เอมิโนกลายเป็นไอออนบวก และสร้างพันธะไฮออนิกกับสารละลายต่างๆได้ (สุวรรณ จิราญชัย และคณะ. 2544) ไคโตซานสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกรด ความสามารถในการละลายลดลงเมื่อพีเอชสูงขึ้น ไคโตซานในทางการค้าจะตกตะกอนที่ช่วงพีเอช 6 ถึง 8 แต่ความสามารถในการละลายจะสูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายสายพอลิเมอร์ (Degree of depolymerization) ลดลง (Strand *et al.*, 2003)

2.2 การย่อยสลายไคตินและไคโตซาน (Chitin and chitosan degradation)

2.2.1 การย่อยสลายโดยกรด (Acid degradation)

Chang *et al.* (2000) ศึกษาการย่อยสลายไคตินโดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 นอร์มอล และ 7 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส ในเวลา 300 นาที พบว่าการใช้อุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกสูงในเวลาอันสั้น เป็นสภาวะที่เหมาะสมในย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกเมอร์

Vårum *et al.* (2001) พบว่ากรดไฮโดรคลอริกสามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล และพันธะระหว่างโมเลกุลของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนกับโมเลกุลกลูโคซามีน ได้เร็วกว่าพันธะที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคซามีน 2 โมเลกุล

Novikov. (2003) รายงานว่าการย่อยสลายสายพอลิเมอร์ไคตินและไคโตซานด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 80 องศาเซลเซียส มีอัตราการลดลงเมื่อพอลิเมอร์มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (Deacetylation) สูงขึ้น

2.2.2 การย่อยสลายโดยใช้ความร้อน (Thermal degradation)

Vårum *et al.* (2001) พบว่าไคตินและไคโตซานสามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิสูงในสภาวะที่มีอากาศ โดยสายพอลิเมอร์มีการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง 100 ถึง 120 องศาเซลเซียส ซึ่งการย่อยสลายสายพอลิเมอร์สามารถเกิดขึ้นได้ในกระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sato *et al.* (2003) พบว่าสภาวะอุณหภูมิ (120 ถึง 180 องศาเซลเซียส) และ ความชื้นสูง โดยไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถย่อยสลายไคตินและไคโตซานที่ไม่อยู่ในรูปผลึกแข็ง (Amorphous chitin และ Amorphous chitosan) แต่ไม่สามารถย่อยสลายไคตินผงและไคโตซาน ผงในรูปผลึกได้

2.2.3 การย่อยสลายโดยใช้รังสี

การย่อยสลายไคตินและไคโตซานโดยรังสีแกมมา เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถย่อย สลายไคโตซานได้ในปริมาณมากด้วยวิธีการที่ง่ายและสะดวก (Chirachanchi and Yoksan. 2002)

Choi *et al.* (2002) ศึกษาการย่อยสลายสารละลายไคตินและไคโตซานเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความหนืด (Viscosity) 20 ถึง 100 เซนติ-พอยต์ (centipoint) ด้วยรังสีแกมมาจากธาตุโคบอลต์-60 (Co-60) เข้มข้น 2 ถึง 200 กิโลเกย์ (KGy) พบว่าเมื่อใช้ไคโตซานที่มีความหนืด 100 เซนติพอยต์ และความเข้มของรังสี 100 กิโลเกย์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตซานต่อกัน 2 โมเลกุล (Dimer) และ 3 โมเลกุลต่อกัน (Trimer) ปริมาณ สูงสุด แต่เมื่อความเข้มของรังสีสูงกว่า 100 กิโลเกย์ พบว่าผลิตภัณฑ์เกิดปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาล (Browning reaction)

Siri-Upathum. (2002) ทำการศึกษาการย่อยสลายแผ่นไคโตซาน (Chitosan flake) 10 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรังสีแกมมาเข้มข้น 100 กิโลเกย์ สามารถแยกไคโตซานโพลิโกลูโคไซด์ที่มีมวลโมเลกุล 60 ถึง 100 กิโลดาลตัน โดยมีระดับ การกำจัดหมู่อะเซทิลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และระดับการย่อยสลายสายพอลิเมอร์ 8 ถึง 10

2.2.4 การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological degradation)

การย่อยด้วยวิธีทางชีวภาพส่วนมากเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติใน การย่อยสลายไคตินและไคโตซาน ซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบทุก ชนิด ในแมลงและครัสตาเซียน เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ช่วยในการลอกคราบหรือแบ่งเซลล์เพื่อการ เจริญ ในจุลินทรีย์เอนไซม์ทำหน้าที่ในการย่อยไคตินเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งพลังงาน ในพืชเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เป็นส่วนหนึ่งในการป้องกันศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Koga *et al.*, 1999 ; Eijsink *et al.*, 2003) ส่วนสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีไคตินและไคโตซานเป็นองค์ประกอบบาง ชนิด เอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่ต่างออกไป เช่น การย่อยอาหาร ทำลายหรือป้องกันการรุกราน จากศัตรู (รัฐ พิชญางกูร. 2544)

2.3 เอนไซม์ย่อยสลายไคติน (Chitinolytic enzyme)

สามารถแบ่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไคตินออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามความแตกต่างด้านคุณสมบัติและการทำงาน ได้แก่ ไคติเนส (Chitinase) เฮกโซซามินิเดส (Hexosaminidase) และไคโตซานเนส (Chitosanase) (รัฐ พิษณุบางกูร. 2544)

กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไคติเนส มีชื่อตามระบบ (Systematic name) คือ poly [1,4 (N-acetyl- β -D-glucosamidine)] glucanohydrolase (EC 3.2.1.14) เอนไซม์ไคติเนสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก ภายในสายพอลิเมอร์ของไคติน (Endochitinase) พบเอนไซม์ไคติเนสได้ในจุลินทรีย์ พืชและแมลง สามารถแบ่งเอนไซม์ไคติเนสออกเป็น 2 แฟมิลี (Family) ตามความแตกต่างของโครงสร้างโมเลกุลและกลไกในการย่อย (Mechanism) ได้แก่ แฟมิลี 18 และแฟมิลี 19 (Brameld and Goddard III. 1998) เอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคตินให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส (Chitobiose) และไคตินสายสั้นๆ (Chitooligomer)

กลุ่มที่ 2 เฮกโซซามินิเดส (Hexosaminidase) มีชื่อตามระบบคือ β -N-acetyl-D-hexaminide N-acetylhexosaminohydrolase (EC 3.2.1.52) ในปัจจุบันเอนไซม์เฮกโซซามินิเดสได้รวมเอนไซม์ไคโตไบโอส (Chitobiase ; EC 3.2.1.29) และเอนไซม์กลูโคซามินิเดส (N-acetyl- β -D-glucosaminidase ; EC 3.2.1.30) เข้าไว้ด้วยกัน (Horsch *et al.*, 1997) เอนไซม์เฮกโซซามินิเดสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิกของสายพอลิเมอร์ด้านปลายนอนรีดิวซิง ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน สามารถพบเอนไซม์เฮกโซซามินิเดสได้ทั่วไปทั้งในสัตว์ พืชชั้นสูงและจุลินทรีย์

กลุ่มที่ 3 ไคโตซานเนส (Chitosanase) มีชื่อตามระบบคือ Chitosan N-acetylglucosaminohydrolase (EC 3.2.1.32) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิกภายในสายพอลิเมอร์ โดยตัดพันธะระหว่างไคโตซาน 2 โมเลกุล เอนไซม์นี้ทำงานได้บนสายพอลิเมอร์ที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 30-60 ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคซามีนหรือโมเลกุลคู่ของกลูโคซามีน

นอกจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดแล้วพบว่าเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme ; EC 3.2.1.17) (Cottaz *et al.* 2000) เอนไซม์เพคตินเนส (Pectinase ; EC 3.2.1.15) เอนไซม์เปปซิน (Pepsin) เอนไซม์ปาเปน (Papain) เอนไซม์โปรเนส (Pronase) (Vishu and Tharanathan. 2004) เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulose) เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) (Sukwattanasinit *et al.*, 2002) สามารถย่อยสลายไคตินและไคโตซานได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ไคติเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการย่อยสลายทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์นั้น นอกจากเอนไซม์ที่สกัดออกมาจากเซลล์ (Cell free enzyme) เซลล์ในระยะที่มีการเจริญและเซลล์ในระยะพักตัวหรือไม่มีการเจริญ สามารถใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ได้ (Michael *et al.*, 1977)

2.4 Active cells และ Resting cells

Active cells คือเซลล์ที่เจริญในอาหารที่มีความสมบูรณ์ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนตามปกติ เซลล์ในระยะนี้สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดในการย่อยสลายสับสเตรต ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีแตกต่างกันไป แต่สามารถทำงานร่วมกันได้ (Michael *et al.*, 1977) ดังนั้นจึงเกิดสารตัวกลาง (Intermediate) และผลิตภัณฑ์หลายชนิด จึงแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการยาก

Resting cells คือเซลล์จุลินทรีย์ระยะพักตัวหรือระยะที่เซลล์ไม่เจริญ ซึ่งเซลล์ในระยะนี้มีการทำงานของเอนไซม์เหมือนเซลล์ในระยะที่มีการเจริญ (Michels and Rosazza. 1999) เซลล์ในระยะนี้สามารถคงมีชีวิตต่อไปได้ แต่มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (Physiology) และปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ทำให้ไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้ในอัตราต่ำ (Weikert *et al.*, 1998) สามารถควบคุมเซลล์จุลินทรีย์ให้อยู่ในระยะนี้ได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิด สารพันธุกรรมและผนังเซลล์ หรือควบคุมชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดอาหาร (Starvation)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bassler *et al.* (1991) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio furnisii* ที่ผ่านการปรับสภาพผนังเซลล์ให้มีคุณสมบัติของการเลือกผ่านดีซัน (Permeabilization cells) โดยโทลูอีนซิงบัฟเฟอร์ (Toluenizing buffer) สามารถย่อยสลายไคโตเตโตรส (Chitotetrose) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอโนอะซิทธิลกลูโคซามีน ไคโตไบโอสและไคโตไตรโอส (Chitotriose)

Svitil *et al.* (1997) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเบต้าไคตินเป็นองค์ประกอบได้สูงกว่า 5.5 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์ไคติเนสมากกว่า 6 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัลฟาไคตินเป็นองค์ประกอบ โดยที่สามารถย่อยสลายเบต้าไคตินได้สูงกว่าอัลฟาไคติน 9 เท่า

Cheng and Li. (2000) ศึกษาการย่อยไคโตซานโดยเอนไซม์ไคโตซานเนสจากเชื้อ *Aspergillus sp.* เป็นเวลา 68 ชั่วโมง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไตรเมอร์ 28 เปอร์เซ็นต์ เตตระเมอร์ 30 เปอร์เซ็นต์ เพนตะเมอร์ 22 เปอร์เซ็นต์ และเฮกซะเมอร์ 7 เปอร์เซ็นต์

Krairak and Budda. (2002) ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไคตินได้ ในบริเวณโรงงานกุ้งแช่แข็งในจังหวัดชลบุรี พบว่า 4 จาก 20 ไอโซเลท (Isolate) สามารถย่อยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบได้สูงสุด โดยสามารถย่อยผลิตภัณฑ์เป็นไคโตไทรโอสและไคโตเตโตรส ในเวลา 7 วัน

Pichyangkura *et al.* (2002) ศึกษาการย่อยอัลฟาไคตินและเบต้าไคติน พบว่าครูดเอนไซม์ (Crude enzyme) ไคตินเนสจาก *Burkholderia cepacia* TU09 สามารถย่อยสลายเบต้าไคติน (ในเวลา 1 วัน) และอัลฟาไคติน (ในเวลา 7 วัน) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ครูดเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* SK-1 สามารถย่อยเบต้าไคตินได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 75 เปอร์เซ็นต์และไคโตไบโอส 20 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถย่อยสลายอัลฟาไคตินได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนเพียง 41 เปอร์เซ็นต์

Sukwattanasinitt *et al.* (2002) ศึกษาการย่อยเบต้าไคตินโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus cellulosicus* ผสมกับเอนไซม์เซลลูเลส เปรียบเทียบกับ การใช้เอนไซม์เอมิเซลลูเลสผสมกับเอนไซม์เพคตินเนสในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 และการใช้เอนไซม์ไลเปสผสมกับเอนไซม์เพคตินเนส *A. niger* ในอัตราส่วน 19 ต่อ 1 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

Aiba *et al.* (2003) ศึกษาการย่อยอัลฟาไคตินโดยใช้ครูดเอนไซม์จาก *Aeromonas hydrophila* H-2330 และ *Trichoderma viride* พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 50 เปอร์เซ็นต์

Sashiwa *et al.* (2003) ศึกษาการย่อยอัลฟาไคตินโดยครูดเอนไซม์จาก *Aeromonas hydrophila* H-2330 เป็นเวลา 10 วัน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 77 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) Hirayama ; Hiclave HV-50, Japan

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle ; Z383K, Germany

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) Astec Microflow ; ABS 1200, UK

เครื่องบ่มเชื้อ (incubator) Binder ; BD 240, Germany

เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) Gallenkamp ; T490188, UK

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu ; UV 1201 V, Japan

เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo ; PG 803 และ AG 204 ตามลำดับ, Switzerland

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Cyberscan ; 2000, Singapore

ตู้อบความร้อน (hot air oven) Memmert ; 600, Germany

คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA

เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

Shimadzu ; Japan ประกอบด้วย

ส่วนควบคุมอัตราไหลของเฟตเคลื่อนที่ ; LC-10 AD VP

ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-10 A VP

ส่วนประมวลผลและบันทึกผล ; C-R7Ae plus

เครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader) Labsystems ;

IEMS Reader, Finland

ชุดทดสอบแบคทีเรีย (kit) bioMerieux, USA

Vitek Gram-positive identification card (GPI)

Vitek Gram-negative identification + card (GNI+)

เมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร Gelmen Sciences Inc. ; Supor-450, USA

กระดาษกรอง เบอร์ 1 Whatman International Ltd., UK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 เคมีภัณฑ์

3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

อาหารไคตินมีเดียม (Chitin medium)

อาหารสารละลายไคติน (Chitin suspension)

อาหารเหลวฟรุกโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล
(Fructose yeast extract brom cresol purple broth ;
FruYB broth)

อาหารเหลวกาแลคโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล
Galactose yeast extract brom cresol purple broth ;
GalYB broth)

อาหารเหลวกลูโคส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล
Glucose yeast extract brom cresol purple broth ;
GluYB broth)

อาหารเหลวแลคโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล
Lactose yeast extract brom cresol purple broth ;
LacYB broth)

อาหารเหลวซูโครส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล
Sucrose yeast extract brom cresol purple broth ;
SucYB broth)

อาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี (Methyl red-Voges Proskauer medium ;
MR-VP)

อาหารเหลวไนเตรต (Nitrate broth)

อาหารเหลวนิวเตรียนต์ (Nutrient broth ; NB)

อาหารแข็งนิวเตรียนต์ (Nutrient agar ; NA)

อาหารนิวเตรียนต์เจลาติน (Nutrient gelatin)

อาหารแข็งทริปเปิลซูการ์ไอรอน (Triple sugar iron agar ; TSI)

อาหารเหลวทริปโตน (Tryptone broth)

3.1.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการจำแนกชนิดแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

เมธิลเรด (Methyl red)

ซาฟรานิน-โอ (Safranin-O)

แกรมส์ ไอโอดีน (Gram's iodine)

คริสตัล ไวโอเล็ต (Crystal violet)

มาลาไคท์ กรีน (Malachite green)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (3% Hydrogen peroxide)

ผงสังกะสี (Zinc powder)

กรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid)

สีย้อมคาร์บอล ฟุคซิน (Carbol fuchsin)

แบร์ริตรีเอเจนต์ (Barritt's reagent)

โคแควรีเอเจนต์ (Kovac's reagent)

3.1.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์

สารละลายโพแทสเซียมบอโรเรทบัฟเฟอร์ (Potassium borate buffer) พีเอช 9.1

สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมีโนเบนซาลดีไฮด์ (p-dimethylamino-benzaldehyde ; p-DMAB)

อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เข้มข้น 2 โมลาร์

3.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียในการวิจัยนี้ได้จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินรอบๆ โรงงานกึ่งแช่แข็ง ในจังหวัดชลบุรี ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลาย และใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน (Krairak and Budda. 2002)

3.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดีย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดียในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมห้วเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน

เตรียมสารละลายโคติน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมห้วเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์

3.3.1 ศึกษาแบคทีเรียในระยะ active cells

3.3.1.1 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดียปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมห้วแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้แก่ เปปโตน (Peptone) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมห้วเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.1.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดียปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.1 ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโพลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.1.3 ศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดียปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.1 ความเข้มข้นตามที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.2 ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าและ เขย่าด้วยความเร็ว 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโพลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.1.4 ศึกษาปริมาณของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดีย ปริมาณ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.1 ความเข้มข้นตามที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.2 ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.1.3 เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโพลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ โดย แบคทีเรียในระยะ Active cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโคตินมีเดียม ปริมาตรตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.1.4 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมห่วงไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.1 ความเข้มข้นตามที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.1.2 ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมห่วงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.1.3 เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.2 ศึกษาแบคทีเรียในระยะ Resting cells

3.3.2.1 ศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสารละลายโคติน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมห่วงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.2.2 ศึกษาปริมาณของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells

เตรียมสารละลายโคติน ปริมาตร 50 100 และ 150 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมห่วงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.2.1 เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์

โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells

เตรียมสารละลายโคติน ปริมาตรตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.2.2 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 นำไปมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมห่วงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.3.2.1 เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโคตินโพลิโกเมอร์ ปริมาณเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ปริมาณเซลล์และปริมาณโคตินที่เหลือ

3.4 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

3.4.1 การจำแนกด้วยวิธีทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข)

ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย โดยการตรวจสอบการติดสีย้อม (Gram) รูปร่าง (Shape) แคปซูล (Capsule) เอนโดสปอร์ (Endospore) การติดสีกรด (Acid-fast) ความต้องการอากาศในการเจริญ ความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) ความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefaction test) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) ปฏิกิริยาการใช้ซิเตรต (Simmon's citrate utilization) การทดสอบปฏิกิริยาอินโดล (Indole test) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีเมทิล เรด (Methyl red indicator) ปฏิกิริยา Voges Proskauer ปฏิกิริยาไนเตรตรีดักชันและดีไนตริฟิเคชัน (Nitrate reduction and denitrification) ทดสอบทริปเปิลชูการ์ไอรอน (Triple Sugar Iron ; TSI test) ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) น้ำตาลซูโครส (Sucrose) น้ำตาลแลคโตส (Lactose)

3.4.2 การจำแนกด้วยชุดทดสอบของบริษัท bioMerieux

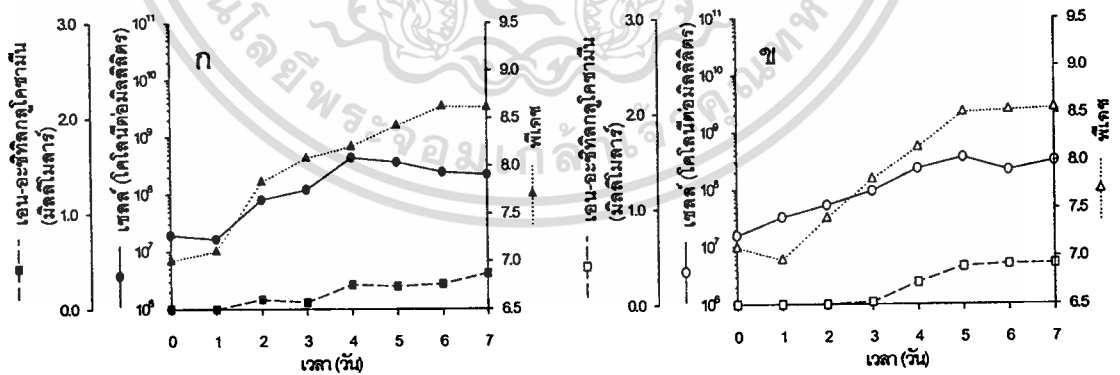
เชื้อเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบ GPI และชุดทดสอบ GNI+

ผลการทดลอง

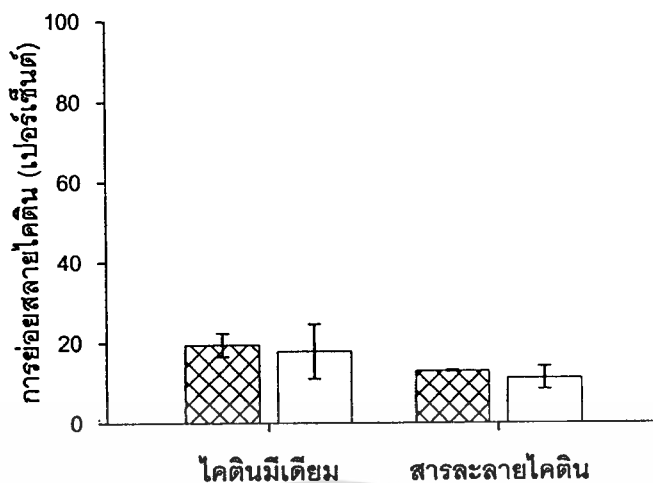
4.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1

4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารเหลวโคตินมีเดียมาตรฐาน

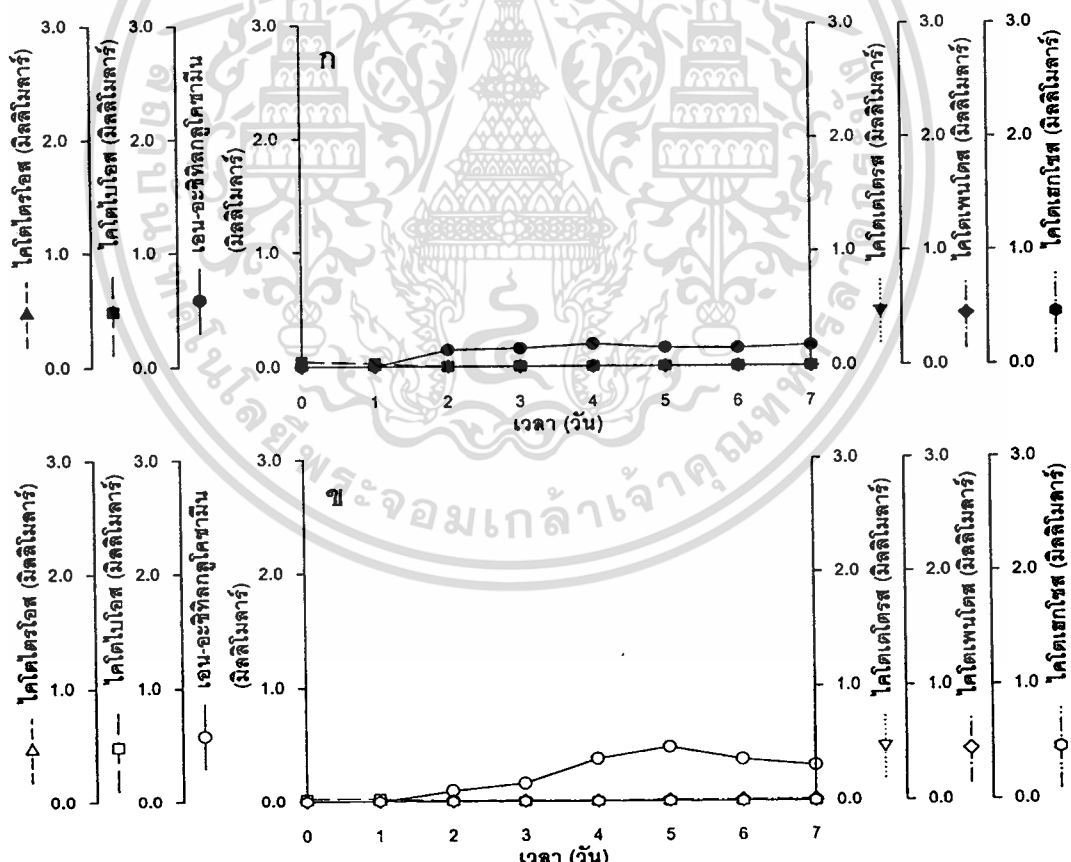
การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมาตรฐาน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหย้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน (โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีในภาคผนวก ข) ปริมาณสูงสุด 0.37 (ภาพที่ 4.1 ก) และ 0.42 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 4.1 ข) ในวันที่ 7 ตามลำดับ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินได้ 19.49 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถย่อยได้ 17.91 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 เมื่อนำน้ำหมัก (Spent culture) มาวิเคราะห์ปริมาณโคตินโพลิโกเมอร์ ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ให้การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน สูงสุด 0.19 มิลลิโมลาร์ และปริมาณโคโตไบโอสสูงสุด 0.05 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 4.3 ก) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 0.47 มิลลิโมลาร์ และโคโตไบโอส 0.03 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 4.3 ข) แต่ไม่พบการสะสมโคตินโพลิโกเมอร์ชนิดอื่นในอาหารโคตินมีเดียที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียทั้งรหัส 6.0 และ 6.1



ภาพที่ 4.1 แสดงการเจริญ การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมาตรฐาน เหย้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณไคตินในอาหารไคตินมีเดียมสูตรพื้นฐาน และสารละลายไคติน ที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (▨) และ 6.1 (□) เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.3 แสดงการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารเหลวไคตินมีเดียมสูตรพื้นฐาน เช้าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

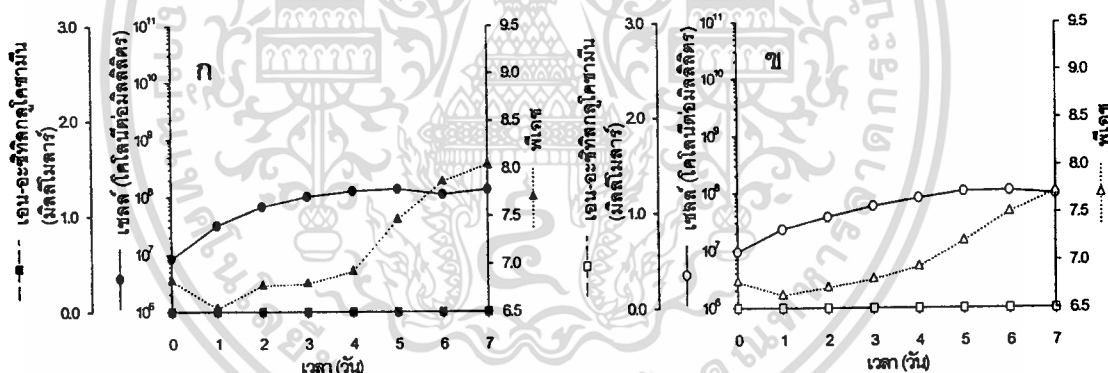
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมสูตรพื้นฐาน พบ ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิเมตร (ภาพที่ 4.1 ก และ 4.1 ข) ในเวลา 7 วัน และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate, μ_{max}) เท่ากับ 0.043 ต่อ ชั่วโมง และ 0.027 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียมสูตร พื้นฐานที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.00 เป็น 8.61 และจาก 7.09 เป็น 8.55 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1

ในสารละลายโคติน

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ไม่พบการสะสมแอน-อะซิติกลูโคซามีน และ โคตินโอลิโกเมอร์ทั้งในเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 (ภาพที่ 4.4 ก และ 4.4 ข) แต่พบว่าเชื้อ แบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สามารถย่อยโคตินได้ 13.12 และ 11.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ ที่ 4.2)



ภาพที่ 4.4 แสดงการเจริญ การสะสมแอน-อะซิติกลูโคซามีน และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในสารละลายโคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

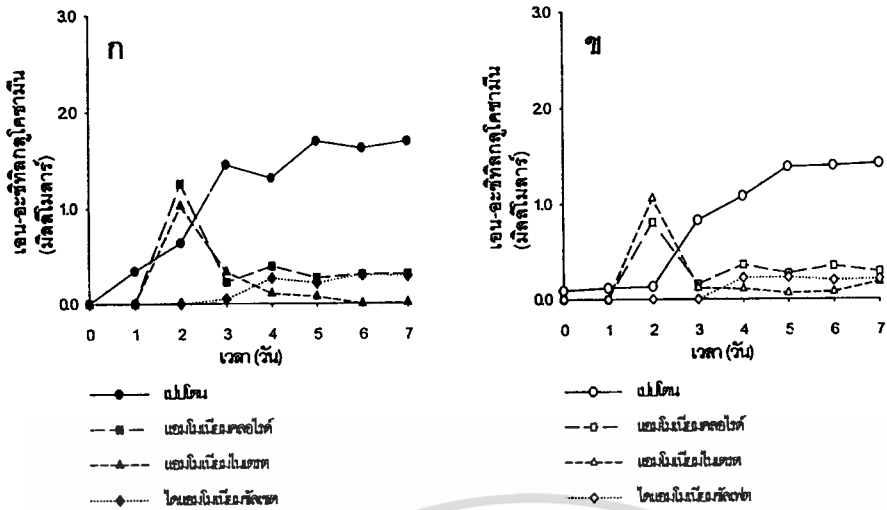
การเจริญของแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน พบว่าปริมาณ เซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิเมตร (ภาพที่ 4.4 ก และ 4.4 ข) ในเวลา 7 วัน และมี อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.025 ต่อชั่วโมง และ 0.018 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการ เปลี่ยนแปลงพีเอชในสารละลายโคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 6.82 เป็น 8.04 และจาก 6.77 เป็น 7.72 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์

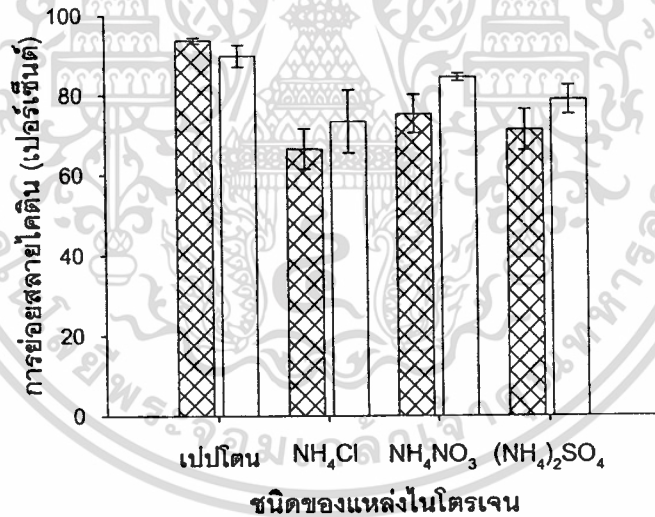
4.2.1 ผลการศึกษาโดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

4.2.1.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Active cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตเนแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ เปปโตเน แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และไดแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำน้ำหนักไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโคตินด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 มีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ปริมาณสูงสุด 1.70 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 5 (ภาพที่ 4.5 ก) รองมาได้แก่ แหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งพบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด ปริมาณ 1.26 และ 1.02 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) ตามลำดับ และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น สำหรับแหล่งไนโตรเจนชนิดไดแอมโมเนียมซัลเฟต พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุดเพียง 0.30 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 กรณีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนสูงสุด 1.42 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 7 ของการเลี้ยง (ภาพที่ 4.5 ข) รองลงมาได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ซึ่งมีการสะสมสูงสุด 1.06 และ 0.81 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดไดแอมโมเนียมซัลเฟต พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุดเพียง 0.23 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 ของการเจริญ ความสามารถในการย่อยสลายโคติน พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยโคตินได้สูงสุด 93.74 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน รองมาได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต 75.32 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 71.29 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ 66.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) สำหรับเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถย่อยโคตินในอาหารที่มีเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้สูงสุด 89.87 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ปริมาณ 84.47 78.82 และ 73.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



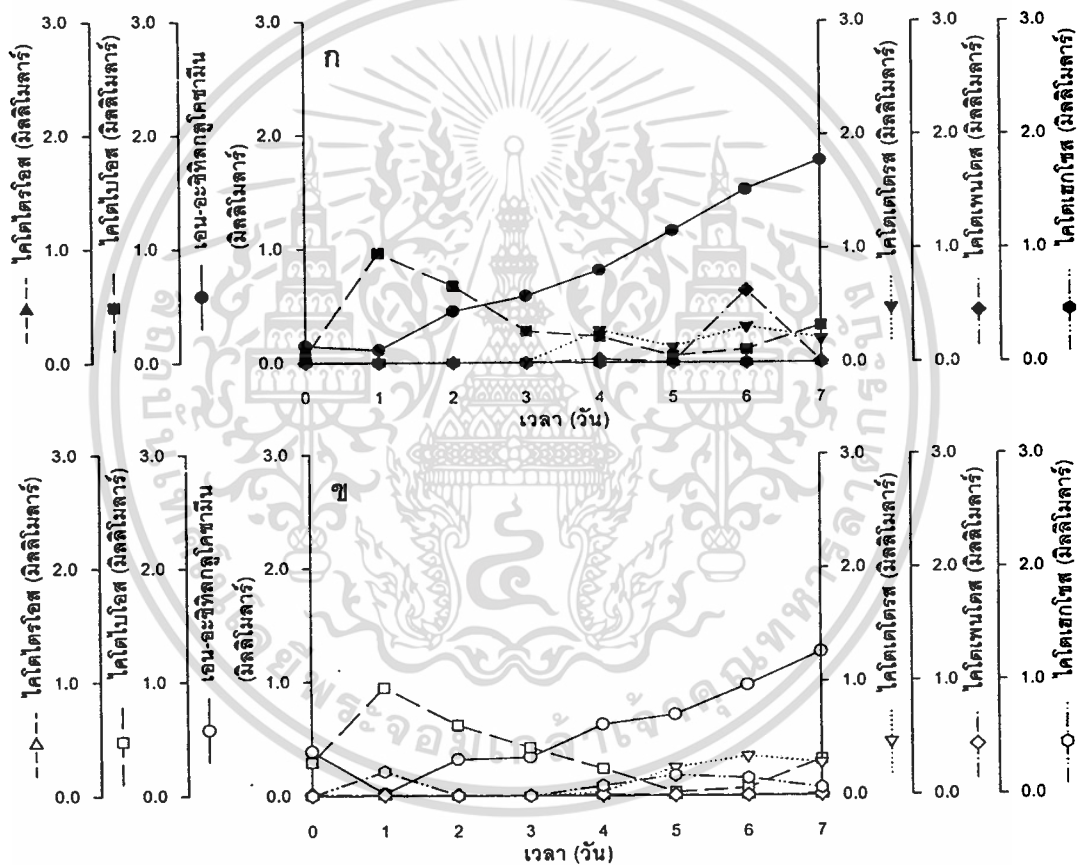
ภาพที่ 4.5 แสดงการสะสมเอน-อะมิทิลกลูโคซามีน จากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียมที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (▨) และ 6.1 (□) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

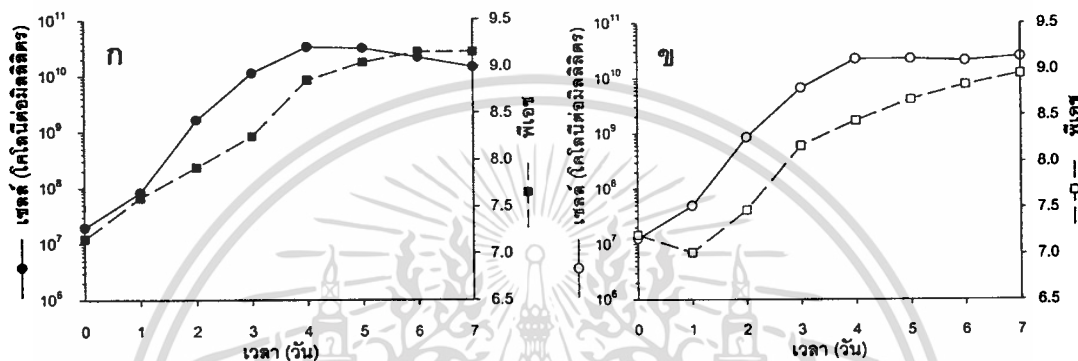
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำน้ำหมักจากการเจริญในอาหารโคตินมีเดียม ซึ่งมีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโคตินด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อรหัส 6.0 มีการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนสูงสุด 1.77 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 7 โคโตไบโอซิสสูงสุด 0.96 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 1 โคโตเตโตรส และโคโตเพนโตสสูงสุด 0.31 และ 0.63 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 ก ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีนสูงสุด 1.26 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 7 โคโตไบโอซิสสูงสุด 1.33 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 1 โคโตเตโตรสสูงสุด 0.35 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 และโคโตเฮกโซสสูงสุด 0.18 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 5 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7 ข)



ภาพที่ 4.7 แสดงการสะสมเอน-อะซิติกกลูโคซามีน และโคตินโอดีโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

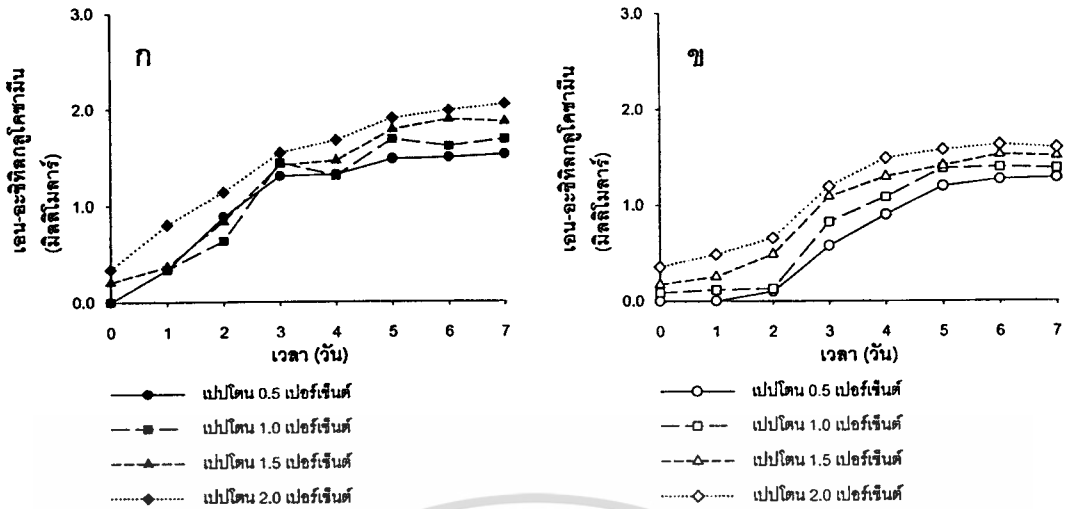
เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารโคตินมีเดียมที่เติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด โดยมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.8 ก และ 4.8 ข) แบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.087 และ 0.085 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในอาหารที่ใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยพบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียมที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.15 เป็น 9.15 และจาก 7.20 เป็น 8.95 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 4.8 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

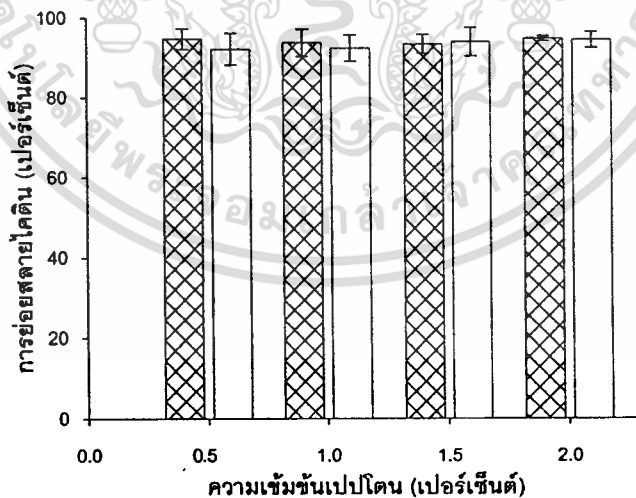
4.2.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกลูโคไซด์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells การศึกษาความเข้มข้นของเปปโตเนที่เหมาะสมต่อการผลิตโคติน

โพลิโกลูโคไซด์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Active cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารโคตินมีเดียมที่มีการเติมเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อนำน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 เจริญในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) พบการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีน ปริมาณสูงสุด 2.06 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 7 แต่เมื่อลดความเข้มข้นของเปปโตเนในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ส่งผลในการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีนลดลงด้วยเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.9 ก ในกรณีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 พบว่าในน้ำหมักมีการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีนสูงสุดที่ระดับ 1.63 1.53 1.40 และ 1.29 มิลลิโมลาร์ ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนความเข้มข้น 2.0 1.5 1.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ (ภาพที่ 4.9 ข)



ภาพที่ 4.9 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในอาหารที่มีเปปโตนความเข้มข้น 2.0 1.5 1.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการย่อยสลายถึง 94.73 93.74 93.38 และ 91.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ การย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ซึ่งมีค่าเป็น 94.41 93.91 92.40 และ 92.17 (ตามลำดับ) เช่นกัน ดังแสดงในภาพ 4.10



ภาพที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้นต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (▨) และ 6.1 (□) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

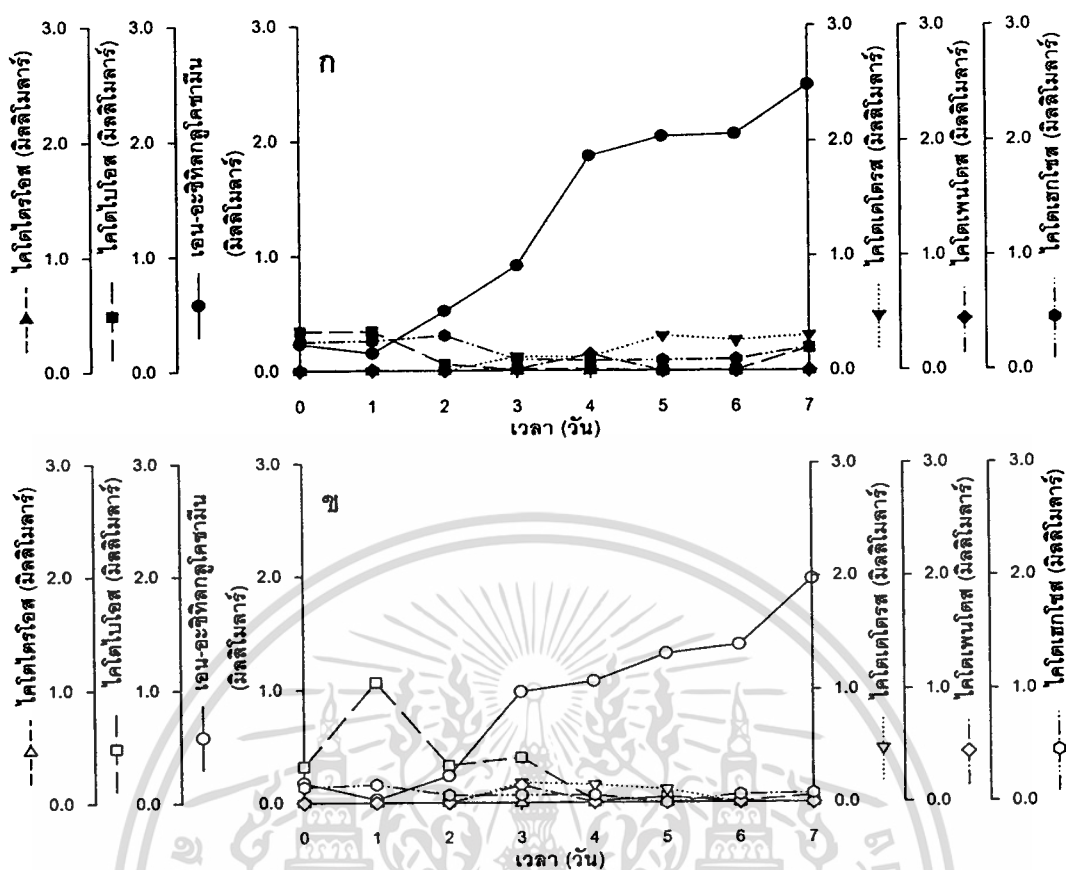
เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของเปปโตินที่เพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีนพบว่าสัดส่วนการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีนต่อความเข้มข้นของเปปโติน (Yield) มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเปปโติน (ตารางที่ 4.1) จากข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 พบว่าเมื่อเติมเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารโคตินมีเดียมีเดียมให้ผลได้สูงสุด 0.31 และ 0.26 มิลลิโมลต่อกรัมเปปโติน ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอาหารโคตินมีเดียมีเดียมที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.1 แสดงผลได้ของเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีนต่อความเข้มข้นเปปโตินที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมีเดียม เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นเปปโติน ในอาหารโคตินมีเดียมีเดียม (เปอร์เซ็นต์)	การสะสมเอน-อะซิทธิล กลูโคซามีน (มิลลิโมลาร์)	ผลได้ (Yield) ของเอน- อะซิทธิลกลูโคซามีนต่อ ความเข้มข้นเปปโติน (มิลลิโมล ต่อกรัมเปปโติน)
รหัส 6.0	0.5	1.54	0.31
	1.0	1.70	0.17
	1.5	1.90	0.13
	2.0	2.06	0.10
รหัส 6.1	0.5	1.29	0.26
	1.0	1.40	0.14
	1.5	1.53	0.10
	2.0	1.63	0.08

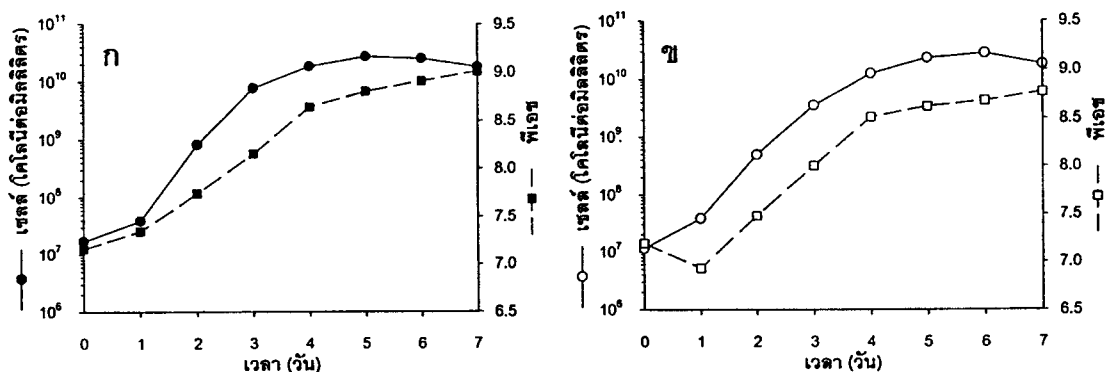
เมื่อนำน้ำหนักที่ได้จากการเจริญในอาหารที่มีเปปโตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโคตินด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อรหัส 6.0 มีการสะสมผลิตภัณฑ์ที่สูงสุดดังต่อไปนี้ เอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน 2.48 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) ไคโตไบโอส 0.34 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ไคโตเตโตรส 0.31 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) ไคโตเพนโตส 0.14 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) และไคโตเฮกโซส 0.31 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) ดังแสดงในภาพที่ 4.11 ก ส่วนเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกโซส เท่ากับ 1.97 (วันที่ 7) 1.07 (วันที่ 1) 0.18 (วันที่ 3) 0.15 (วันที่ 3) 0.16 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงวันเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และโคตินโพลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตเนอความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สามารถเจริญในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตเนอความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.12 ก และ 4.12 ข) โดยให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.086 และ 0.080 ต่อชั่วโมงตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียที่ค่อยๆ ลดลงโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.16 เป็น 9.01 และจาก 7.19 เป็น 8.77 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



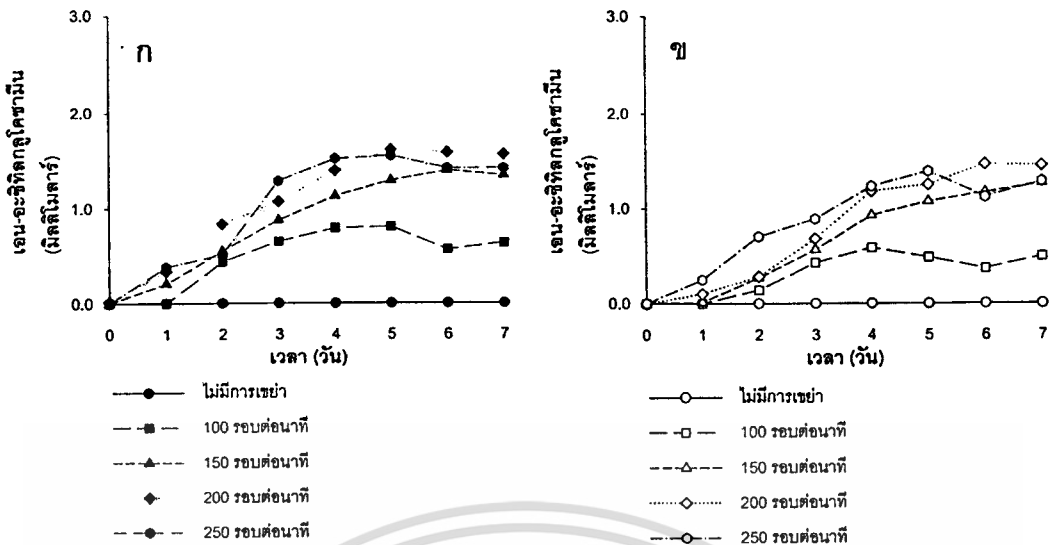
ภาพที่ 4.12 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.1.3 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต

โคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

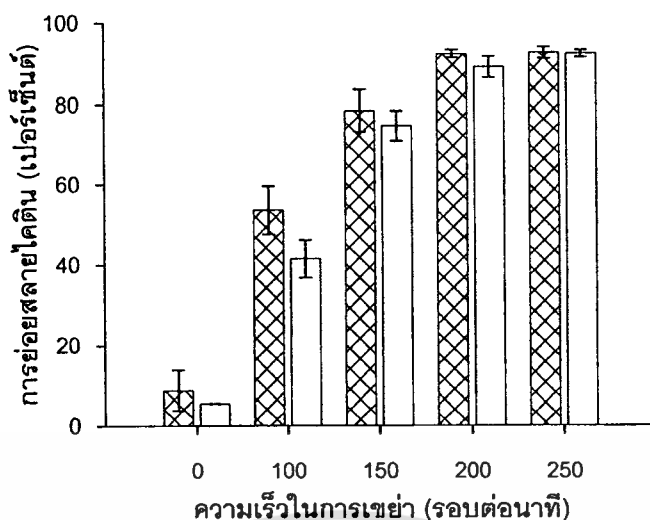
การศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตโคติน

โอลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Active cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบความเร็วรอบการเขย่าต่างๆ ได้แก่ 0 (ไม่เขย่า) 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที พบว่าการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ที่เจริญในอาหารโคตินมีเดียมในสภาวะที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยนำน้ำหนักมาวิเคราะห์ (ด้วยวิธีทางเคมี) มีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.62 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 5) แต่เมื่อใช้ความเร็วรอบการเขย่าเพิ่มขึ้น (250 รอบต่อนาที) หรือลดลง (150 และ 100 รอบต่อนาที) พบว่าการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.56 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 5) หรือมีค่าเพียง 1.40 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) และ 0.64 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะไม่เขย่า ไม่พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนในระหว่างการย่อยสลายโคติน (ภาพที่ 4.13 ก) ในกรณีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 พบว่ามีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.47 (วันที่ 6) 1.39 (วันที่ 5) 1.26 (วันที่ 6) และ 0.50 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) เมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 200 250 150 และ 100 รอบต่อนาที ตามลำดับ ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสภาวะไม่เขย่าไม่พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.13 ข)



ภาพที่ 4.13 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายไคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าที่ค่าต่างๆ

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายไคตินได้สูงสุด 92.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารไคตินมีเดียมบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที แต่เมื่อลดความเร็วรอบการเขย่าเป็น 200 150 100 และ 0 (ไม่เขย่า) รอบต่อนาที พบอัตราการย่อยสลายไคตินเป็น 92.50 78.45 53.67 และ 8.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.14) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถย่อยไคตินในอาหารไคตินมีเดียมที่มีการเขย่า 250 200 150 100 และ 0 (ไม่เขย่า) รอบต่อนาที เท่ากับ 92.54 89.27 74.68 41.54 และ 5.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



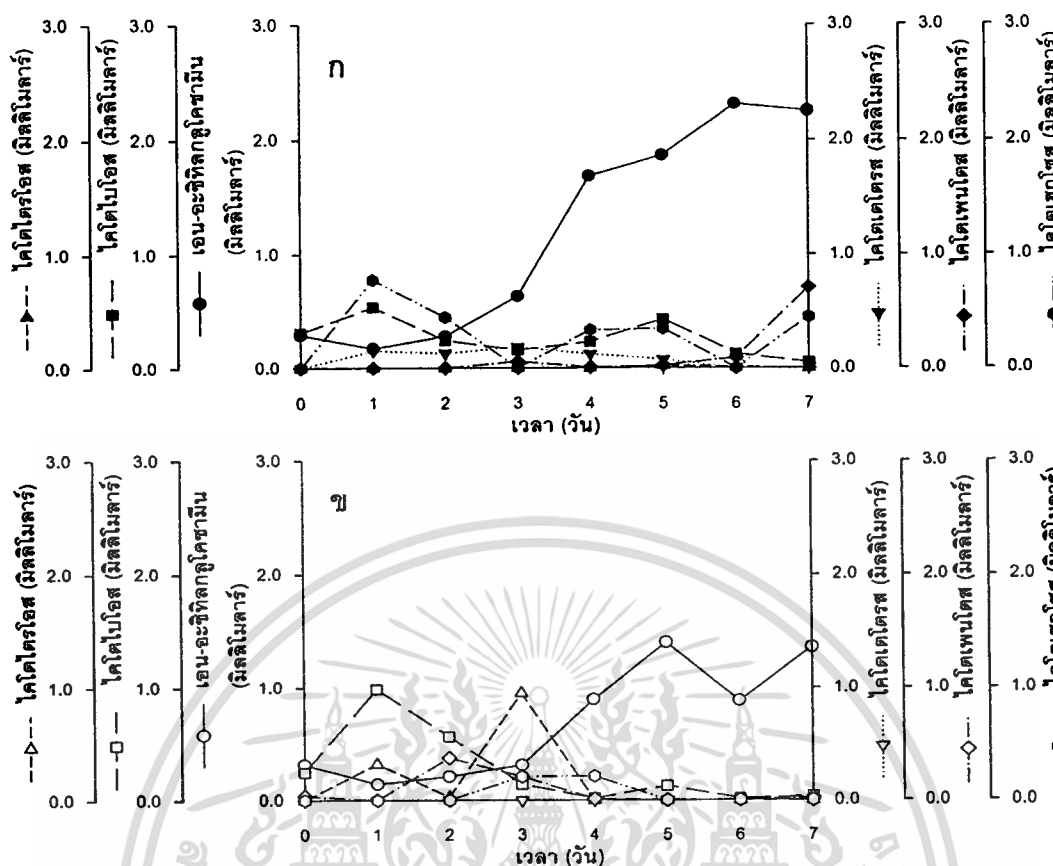
ภาพที่ 4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (■)

และ 6.1 (□) ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

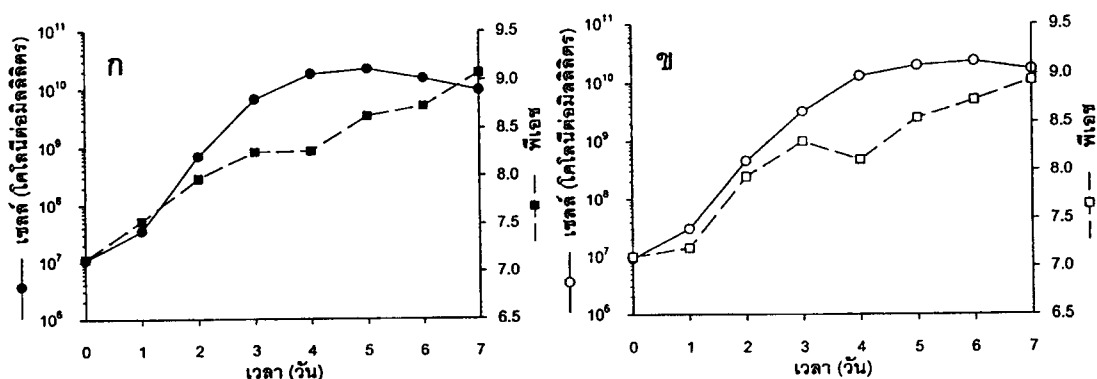
จากข้อมูล เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 200 รอบต่อนาที เป็น 250 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น จาก 0.088 เป็น 0.103 ต่อชั่วโมง (เชื้อรหัส 6.0) และจาก 0.084 เป็น 0.99 ต่อชั่วโมง (เชื้อรหัส 6.1) แต่มีแนวโน้มการสะสมเอโน-อะซิทธิลกลูโคซามีนลดลง ดังนั้นจึงเลือกสภาวะการเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในอาหารไคตินมีเดียมโดยเชื้อแบคทีเรีย 6.0 ที่เจริญบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบการสะสมเอโน-อะซิทธิลกลูโคซามีน 2.26 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) ไคโตไบโอส 0.54 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ไคโตเตโตรส 0.18 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 3) ไคโตเพนโตส 0.71 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) และ ไคโตเฮกโซส 0.78 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.15 ก ในขณะที่การย่อยสลายไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ให้การสะสมเอโน-อะซิทธิลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกโซส เท่ากับ 1.40 (วันที่ 5) 0.98 (วันที่ 1) 0.95 (วันที่ 3) 0.37 (วันที่ 2) และ 0.21 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15 ข)



ภาพที่ 4.15 แสดงการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลลีโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตโนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ที่เจริญในอาหารโคตินมีเดียมที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.16 ก และ 4.16 ข) โดยให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.088 และ 0.084 ต่อชั่วโมงตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียมที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.13 เป็น 9.07 และจาก 7.10 เป็น 8.93 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

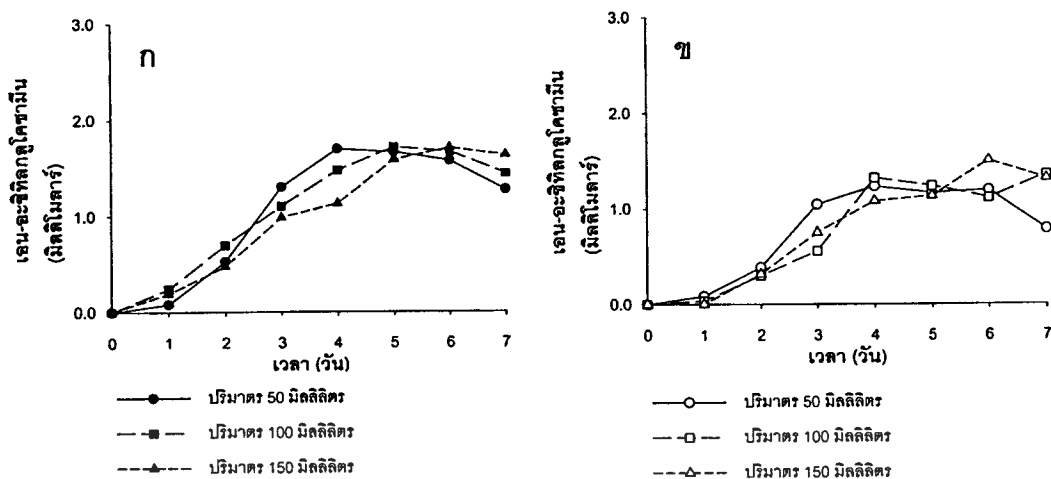


ภาพที่ 4.16 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.1.4 ผลการศึกษาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกลิเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

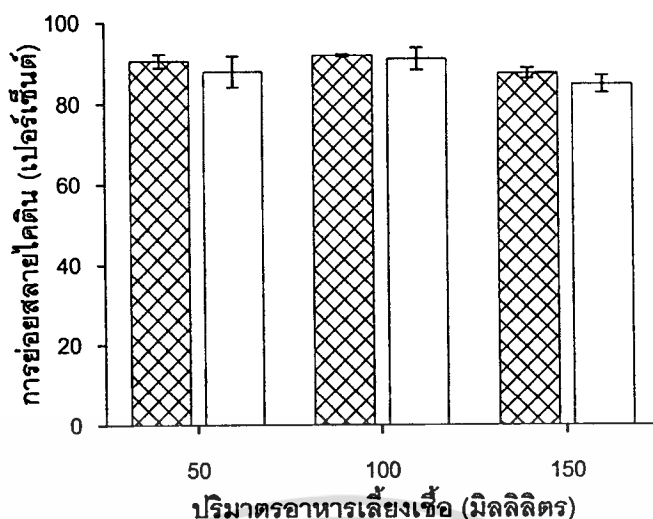
การศึกษาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย

โคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Active cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการแปรผันปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในอาหารโคตินมีเดียปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำน้ำหมักมาวิเคราะห์การสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) พบปริมาณสูงสุด 1.77 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 5) และเมื่อเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 100 และ 150 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนสะสมมีค่าใกล้เคียงกัน [1.72 (วันที่ 5) และ 1.71 (วันที่ 5) ตามลำดับ] ดังแสดงในภาพที่ 4.17 ก สำหรับการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 พบว่ามีเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนสะสมสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารโคตินมีเดียปริมาณ 150 100 และ 50 มิลลิลิตร เท่ากับ 1.51 (วันที่ 6) 1.36 (วันที่ 7) และ 1.23 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.17 ข)



ภาพที่ 4.17 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลโคลีนจากอาหารโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความสามารถในการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในอาหารโคตินมีเดียมที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบว่ามีค่าสูงสุด 91.94 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ ปริมาตรอาหารโคตินมีเดียม 50 และ 150 มิลลิลิตร เท่ากับ 90.58 และ 87.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18) ส่วนการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ค่าสูงสุด 91.04 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ ปริมาตรอาหารโคตินมีเดียม 50 และ 150 มิลลิลิตร ได้เท่ากับ 85.50 และ 84.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (■)

และ 6.1 (□) ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน

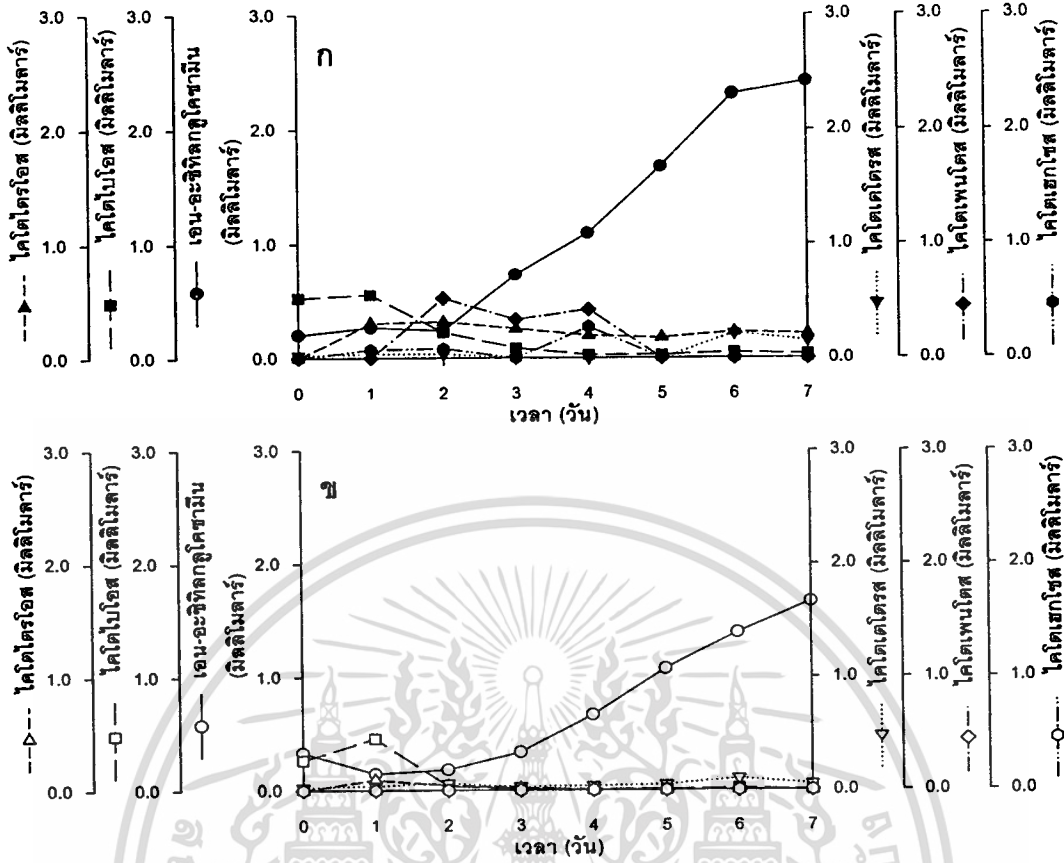
จากข้อมูลพบว่าความเข้มข้นของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนจากการศึกษาแปรผันปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ต่างก็ให้การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนที่ได้จากการย่อยสลายไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระดับใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนทั้งหมดในฟลาสก์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ให้การสะสมสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 150 มิลลิลิตร เท่ากับ 0.257 และ 0.225 มิลลิโมล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารไคตินมีเดียมปริมาณ 150 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคตินโดยวิธี HPLC พบว่าเชื้อรหัส 6.0 มีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2.42 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 7) ไคโตไบโอส 0.55 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ไคโตไตรโอส 0.32 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) ไคโตเตโตรส 0.04 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) ไคโตเพนโตส 0.52 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) และ ไคโตเฮกไซส 0.27 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) ดังแสดงในภาพที่ 4.19 ก ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส และไคโตเตโตรส เท่ากับ 1.66 (วันที่ 7) 0.46 (วันที่ 2) 0.09 (วันที่ 1) และ 0.10 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) ตามลำดับ แต่ไม่พบการสะสมของไคโตเพนโตสและไคโตเฮกไซส (ภาพที่ 4.19 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

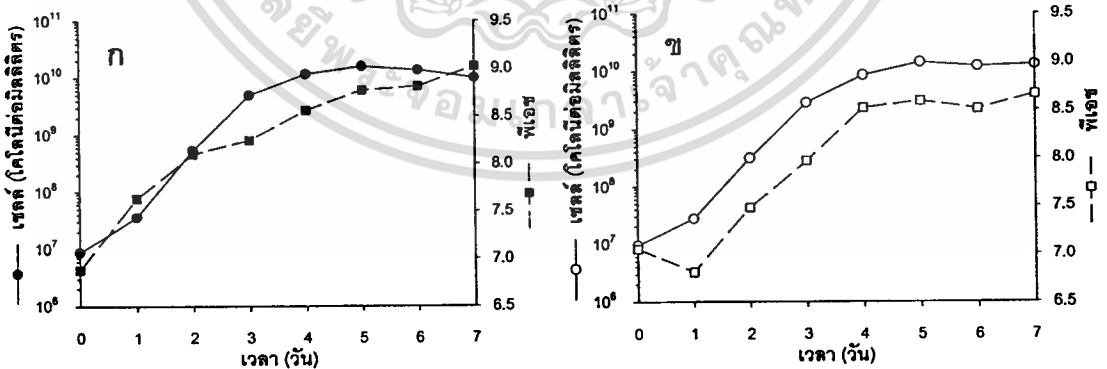
ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณเอน-อะซิติกกลูโคซามีนทั้งหมดในพลาสติก จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)	การสะสมเอน-อะซิติก กลูโคซามีน (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณเอน-อะซิติก กลูโคซามีนทั้งหมดในพลาสติก (มิลลิโมล)
รหัส 6.0	50	1.77	0.089
	100	1.72	0.172
	150	1.71	0.257
รหัส 6.1	50	1.23	0.062
	100	1.36	0.136
	150	1.51	0.225

การเจริญของแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.20 ก และ 4.20 ข) และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.079 และ 0.081 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียมที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 6.88 เป็น 9.02 และจาก 7.05 เป็น 8.66 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 4.19 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

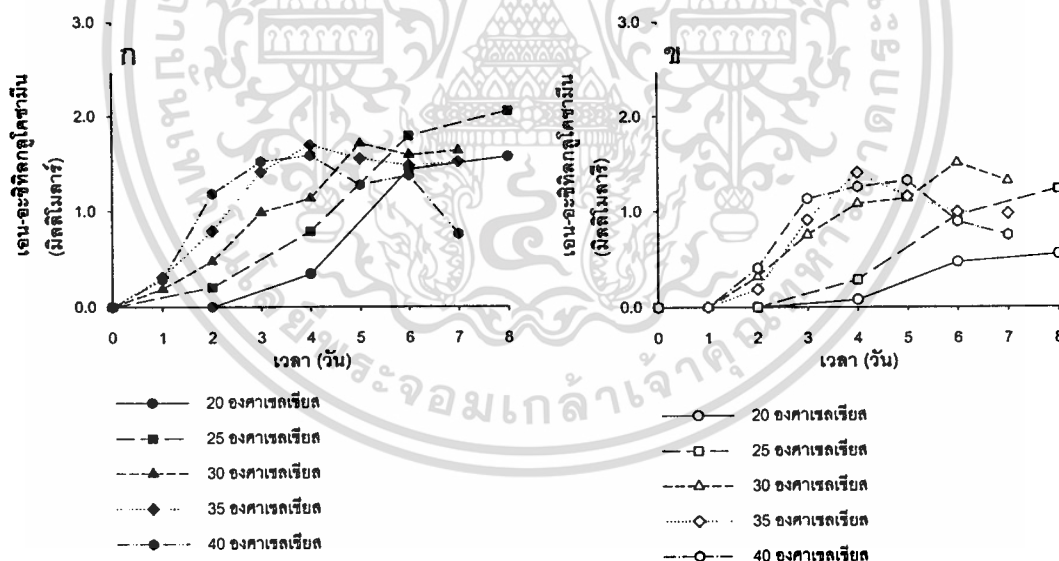


ภาพที่ 4.20 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

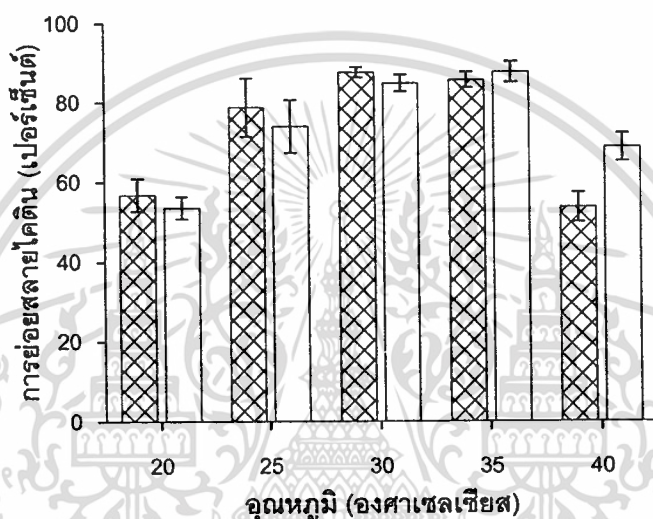
4.2.1.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Active cells

การศึกษานี้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Active cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำน้ำหนักของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนในอาหารที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุด 2.05 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) แต่เมื่อลด (20 องศาเซลเซียส) หรือเพิ่ม (30 35 และ 40 องศาเซลเซียส) พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนเพียง 1.57 (วันที่ 8) หรือ 1.64 (วันที่ 7) 1.69 (วันที่ 4) และ 1.58 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) ดังแสดงในภาพ 4.21 ก สำหรับการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.51 (วันที่ 6) 1.41 (วันที่ 4) 1.32 (วันที่ 5) 1.23 (วันที่ 8) และ 0.55 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 25 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.21 ข)



ภาพที่ 4.21 แสดงการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนจากการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

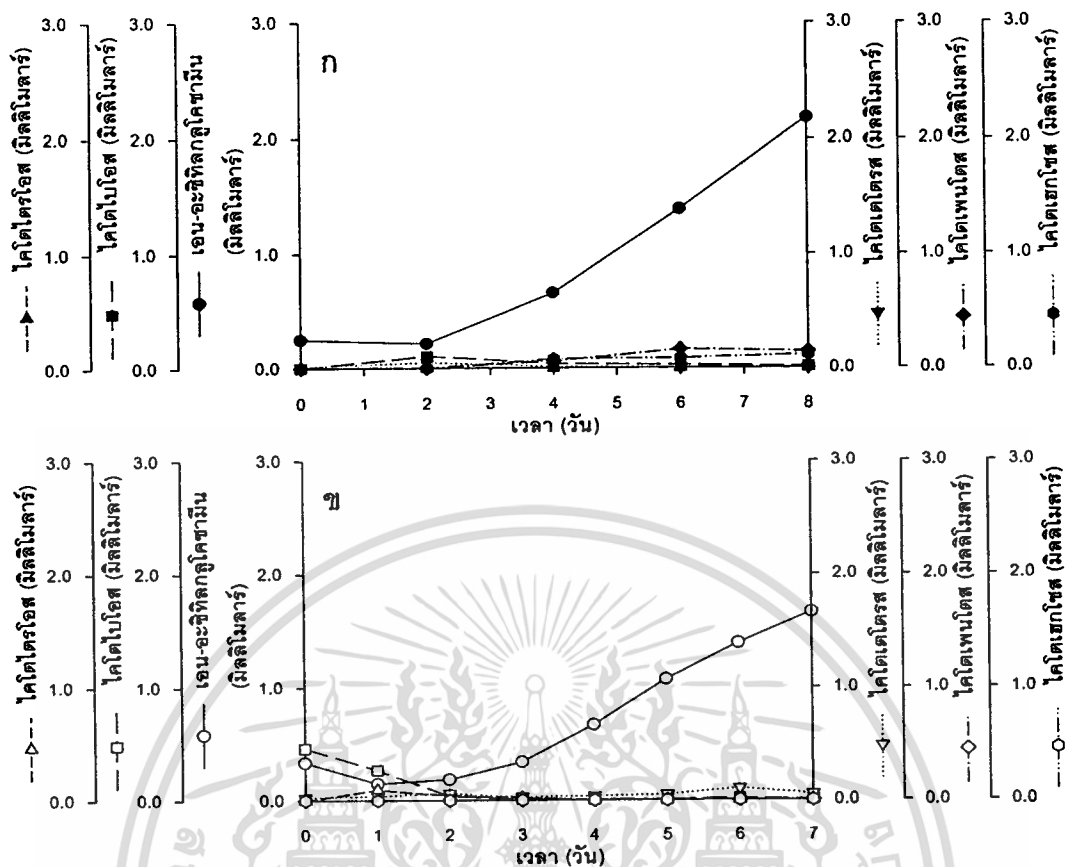
เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้สูงสุด 87.45 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 20 25 35 และ 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยโคตินได้เพียง 56.81 78.67 85.56 และ 53.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.22) ส่วนเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถย่อยสลายโคตินเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้สูงสุด 87.58 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายเพียง 53.55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิลดลงเป็น 30 25 และ 20 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายได้ 84.79 73.91 และ 68.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.22 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายโคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (■) และ 6.1 (□) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนอความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน

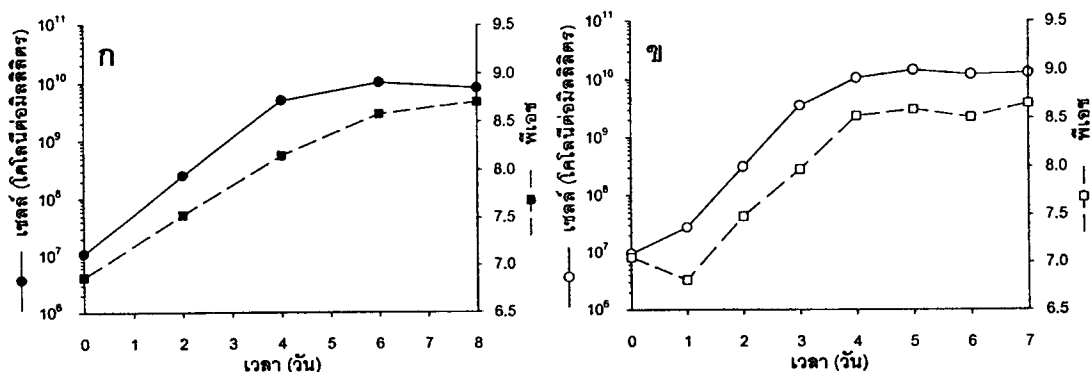
เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียม โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีน 2.18 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) โคโคโบไฮส 0.11 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) โคโคเตโตรส 0.05 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) โคโคเพนโดส 0.16 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) และโคโคเฮกโซส 0.12 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) ดังแสดงภาพที่ 4.23 ก ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีการสะสมเฮน-อะซีทิลกลูโคซามีน โคโคโบไฮส โคโคเตโตรส และโคโคเตโตรส เท่ากับ 1.66 (วันที่ 7) 0.46 (วันที่ 2) 0.09 (วันที่ 1) และ 0.10 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) ตามลำดับ แต่ไม่พบการสะสมของโคโคเพนโดสและโคโคเฮกโซส (ภาพที่ 4.23 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.23 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และโคตินโพลิเมอร์ ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในอาหารโคตินมีเดียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.24 ก) และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารโคตินมีเดียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.24 ข) พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคลินีต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.039 และ 0.081 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 6.87 เป็น 8.71 และจาก 7.05 เป็น 8.66 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง



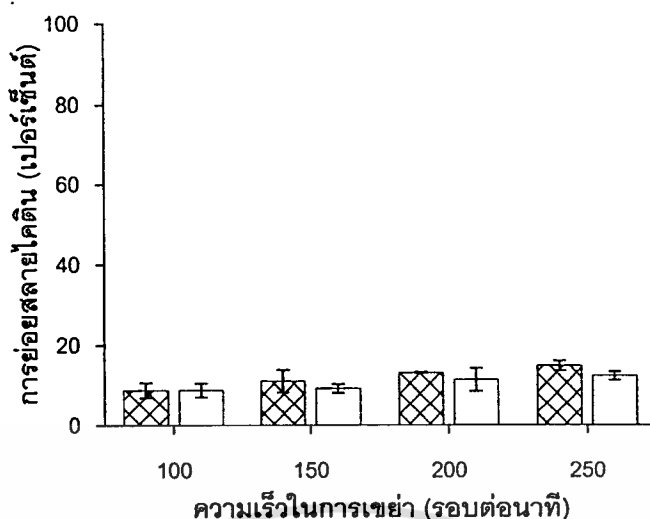
ภาพที่ 4.24 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.2 ผลการศึกษาโดยแบคทีเรียในระยะ Resting Cells

4.2.2.1 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิต

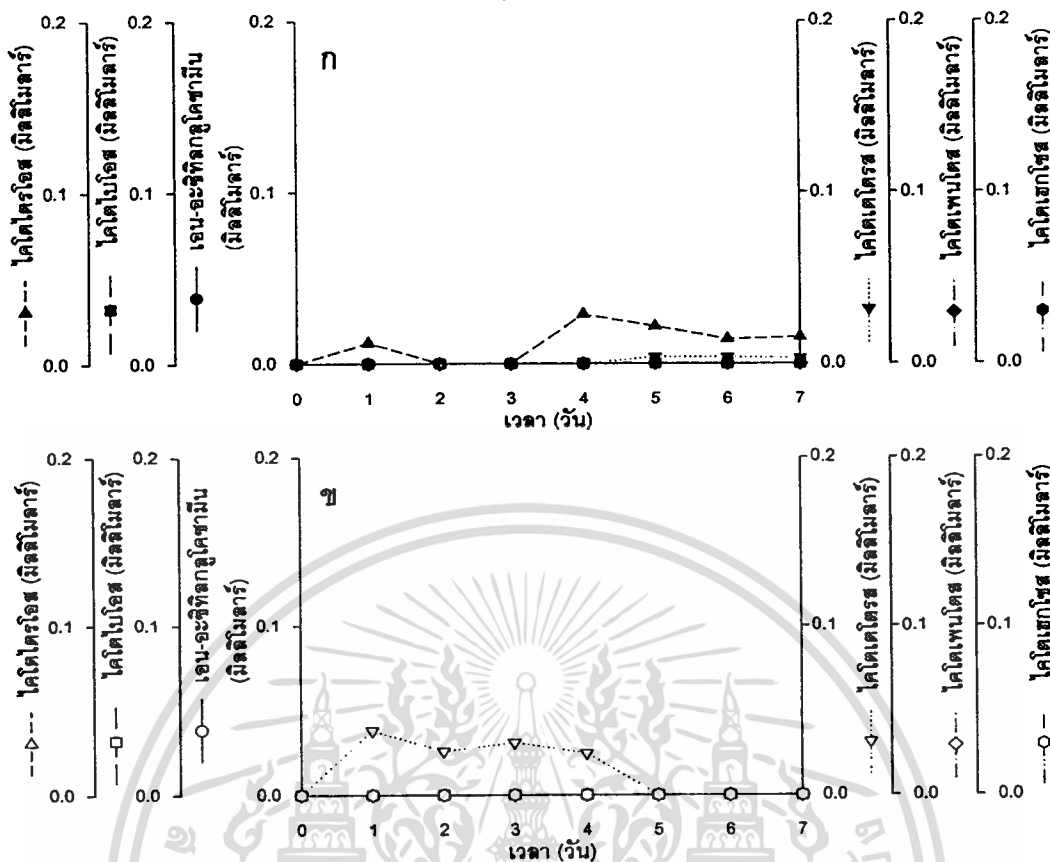
โคตินโอลลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells

การศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Resting cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสารละลายโคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แปรผันความเร็วรอบการเขย่าที่ 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที เมื่อนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) ไม่พบการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีนในสารละลายโคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินได้สูงสุด 14.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที แต่เมื่อลดความเร็วในการเขย่าเป็น 200 150 และ 100 รอบต่อนาที พบอัตราการย่อยสลายโคตินเป็น 13.12 11.05 และ 8.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.25) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถย่อยโคตินในสารละลายโคตินที่มีการเขย่า 250 200 150 และ 100 รอบต่อนาที เท่ากับ 12.26 11.33 9.16 และ 8.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



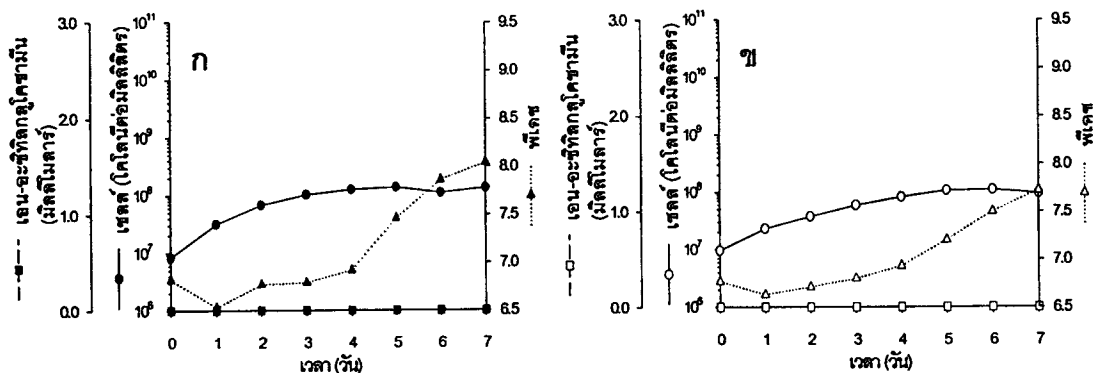
ภาพที่ 4.25 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (■) และ 6.1 (□) ในสารละลายไคติน โดยเขี้ยวด้วยความเร็วรอบต่างกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เนื่องจากไม่พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนในสารละลายไคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ที่ความเร็วการเขี้ยวต่างๆ แต่ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายไคตินระหว่าง Active cells และ Resting cells ดังนั้นจึงนำน้ำหนักที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในสารละลายไคตินที่เขี้ยวด้วยความเร็ว 200 รอบต่ออนาที (ความเร็วในการเขี้ยวเท่ากับการศึกษาในระยะ Active cells) มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สะสมโคโตเตโตรส 0.029 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) และโคโตเพนโตส 0.004 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 5) ดังแสดงในภาพที่ 4.26 (ก) ในขณะที่เชื้อรหัส 6.1 ให้การสะสมโคโตเตโตรส 0.038 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) (ภาพที่ 4.26 ข)



ภาพที่ 4.26 แสดงการสะสมเอม-อะซิทธิลกลูโคซามีน และโคโคไตรเอซเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในสารละลายโคโคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

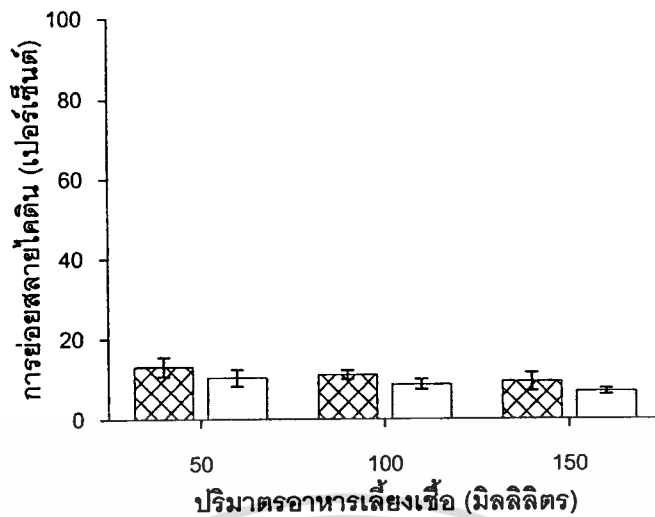
เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ที่เจริญในสารละลายโคโคตินที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.27 ก และ 4.27 ข) โดยให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.025 และ 0.018 ต่อชั่วโมงตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในสารละลายโคโคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 6.82 เป็น 8.04 และจาก 6.77 เป็น 7.72 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตามลำดับ)



ภาพที่ 4.27 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเคเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนอความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.2.2 ผลการศึกษาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโอไลโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells การศึกษาปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย

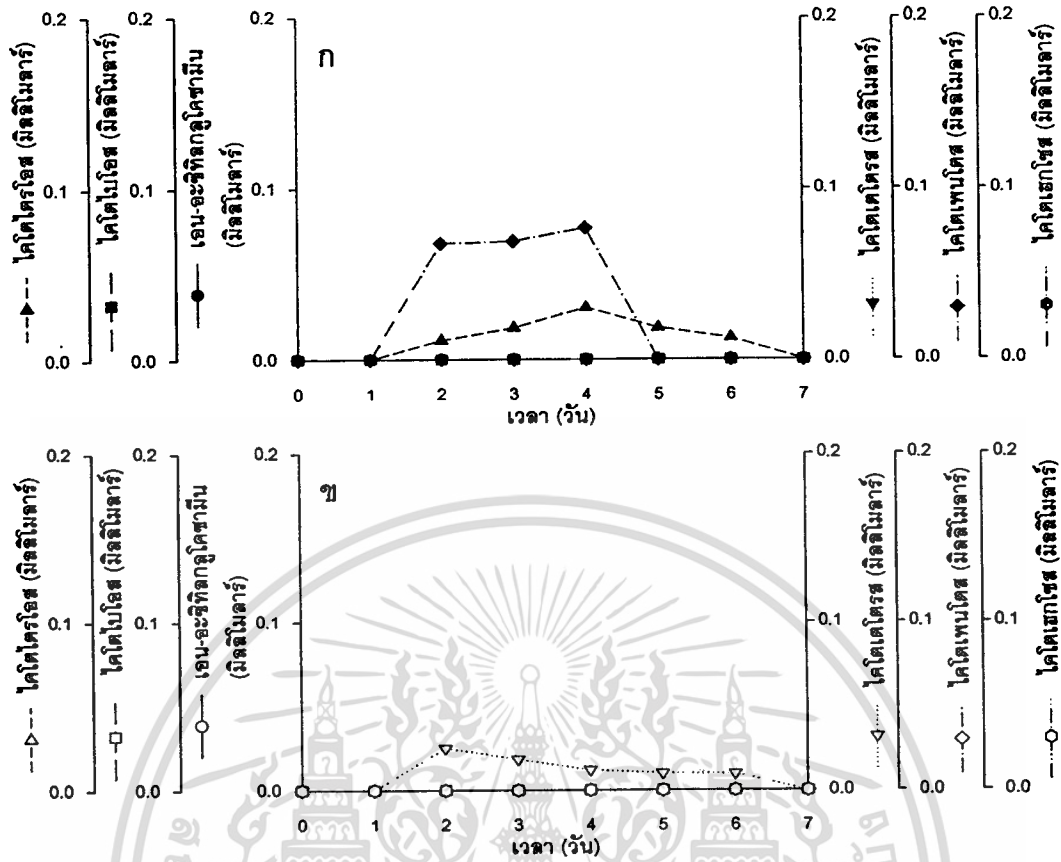
โคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Resting cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสารละลายโคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทดสอบการแปรผันปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ 50 100 และ 150 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำหมักมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) ไม่พบการสะสมเอโนอะซิติกกลูโคซามีนในสารละลายโคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินในสารละลายโคตินปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุด 13.03 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่ปริมาตรสารละลายโคติน 100 และ 150 มิลลิลิตร เท่ากับ 11.02 และ 9.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.28) ส่วนการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในสารละลายโคตินปริมาตร 50 100 และ 150 มิลลิลิตร เท่ากับ 10.34 8.62 และ 6.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.28 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (■)

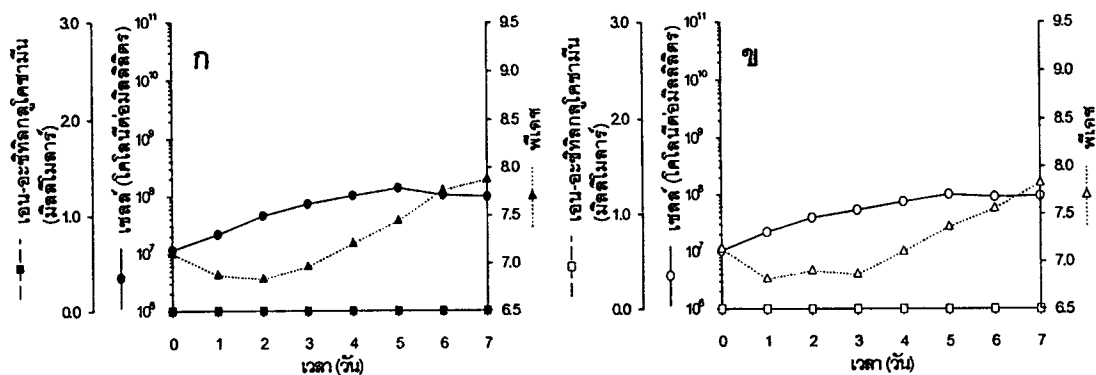
และ 6.1 (□) ในสารละลายไคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน
 เป็นเวลา 7 วัน

เนื่องจากไม่พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนในสารละลายไคติน
 ที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 แต่ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์
 จากการย่อยสลายไคตินระหว่าง Active cells และ Resting cells ดังนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้จาก
 การย่อยสลายไคตินในสารละลายไคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร (ปริมาตรเท่ากับการศึกษาในระยะ
 Active cells) มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0
 สะสมโคโตเดโตรส 0.030 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) และโคโตเพนโตส 0.077 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4)
 (ภาพที่ 29 ก) ในขณะที่เชื้อรหัส 6.1 ให้การสะสมโคโตเดโตรส 0.025 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2)
 (ภาพที่ 29 ข)



ภาพที่ 4.29 แสดงการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และไคตินโพลิโกเมอร์เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในสารละลายไคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

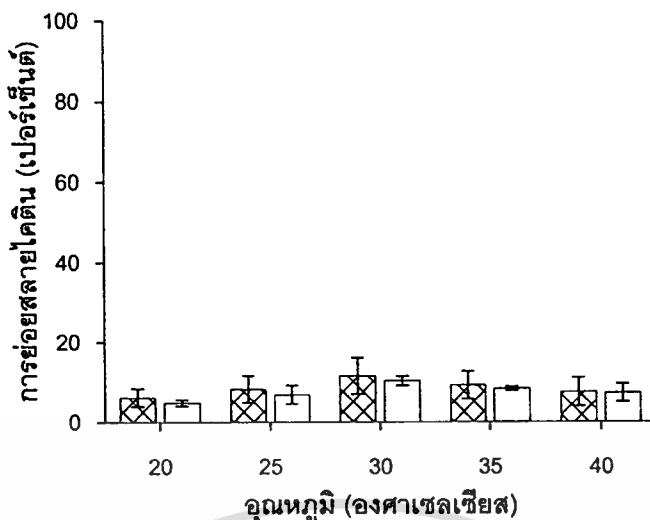
เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ที่เจริญในสารละลายไคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร พบการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.30 ก และ 4.30 ข) โดยให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.026 และ 0.017 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในสารละลายไคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.10 เป็น 7.87 และจาก 7.13 เป็น 7.82 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตามลำดับ)



ภาพที่ 4.30 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงฟิโอส เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในสารละลายโคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.2.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกลิโกเมอร์ โดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells

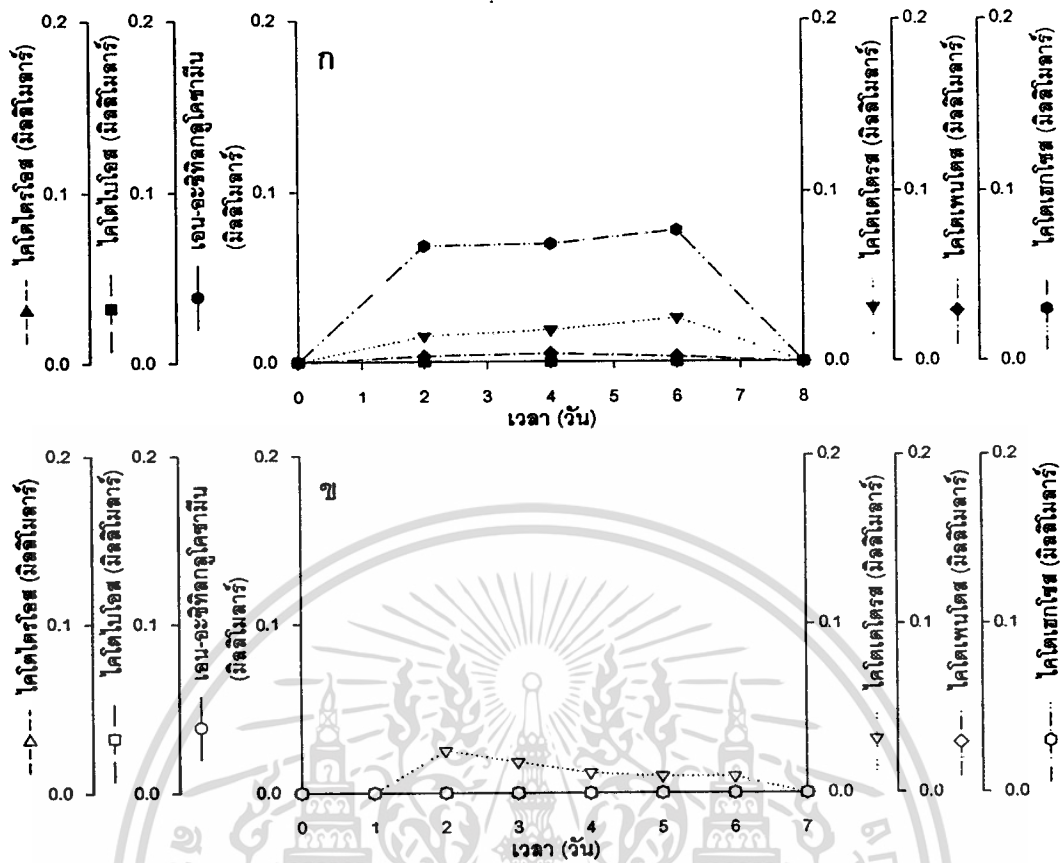
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโคตินโพลิโกลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในระยะ Resting cells โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสารละลายโคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำหนักมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (ภาคผนวก ข) ไม่พบการสะสมเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนในสารละลายโคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินในสารละลายโคตินได้สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 11.52 เปอร์เซ็นต์ รองมาได้แก่สารละลายโคตินที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 25 40 และ 20 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 9.18 8.20 7.48 และ 6.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.31) ส่วนการย่อยสลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 35 40 25 และ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 10.26 8.29 7.27 6.85 และ 4.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.31 แสดงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (▨)

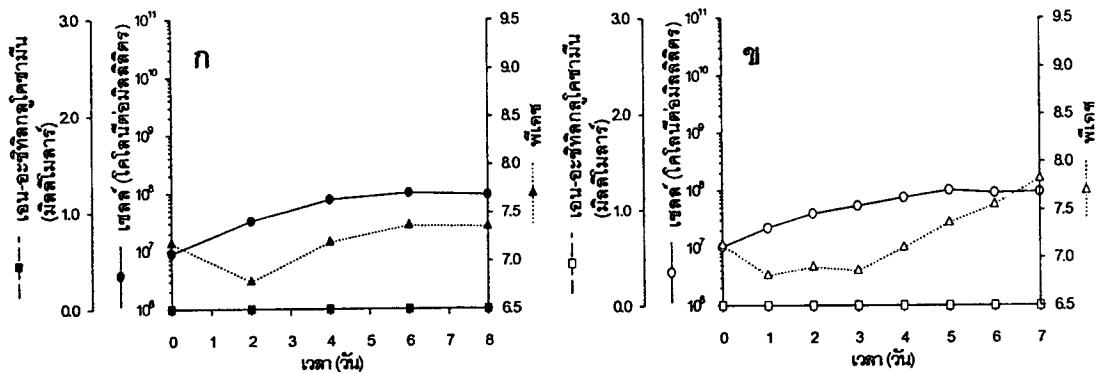
และ 6.1 (□) ในสารละลายไคตินปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน

เนื่องจากไม่พบการสะสมเอน-อะซิติลกลูโคซามีนในสารละลายไคตินที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 แต่ในการทดลองนี้ต้องการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายไคตินระหว่าง Active cells และ Resting cells ดังนั้นจึงนำน้ำหนักจากการย่อยสลายไคตินโดยเชื้อรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิเท่ากับการศึกษาในระยะ Active) มาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข) พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 สะสมโคโตเตโตรส 0.026 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) โคโตเพนโตล 0.004 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) และโคโตเฮกโซล 0.077 (วันที่ 6) (ภาพที่ 4.32 ก) ในขณะที่เชื้อรหัส 6.1 ให้การสะสมโคโตเตโตรส 0.025 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) (ภาพที่ 4.32 ข)



ภาพที่ 4.32 แสดงการสะสมเอน-อะซิทธิลกลูโคซามีน และโคตินโพลิโกเมอร์ ในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรีย รหัส 6.0 (ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในสารละลายโคตินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.33 ก) และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในสารละลายโคตินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.33 ข) พบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.018 และ 0.017 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารโคตินมีเดียมที่ย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 จากเริ่มต้น 7.18 เป็น 7.35 และจาก 7.13 เป็น 7.82 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตามลำดับ)



ภาพที่ 4.33 แสดงการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.3 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

4.3.1 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางชีวเคมี

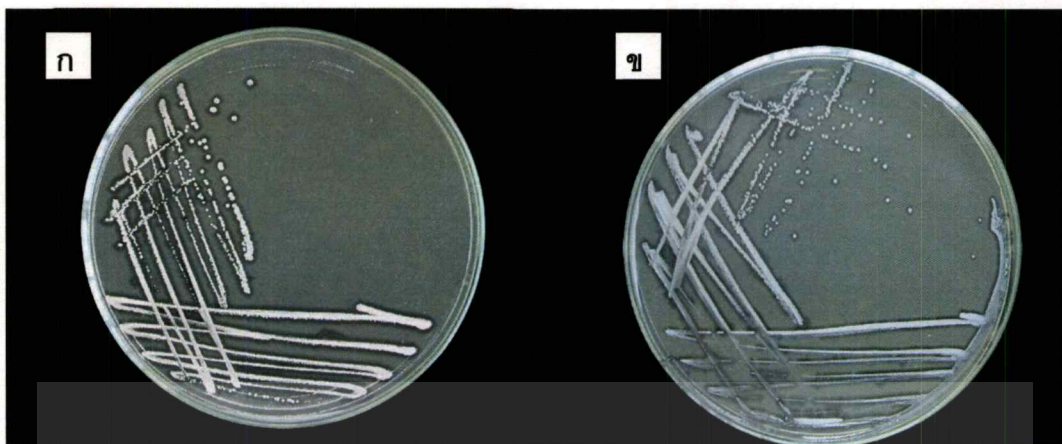
ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ภาพที่ 4.34 ก) และ 6.1 (ภาพที่ 4.34 ข) ในขั้นต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 มีลักษณะเป็นรูปท่อน และย้อมติดสีแกรมลบ สร้างแคปซูล ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่ติดสีทนกรด มีความต้องการออกซิเจนแบบฟาคัลเททีฟ (facultative) สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารแข็งนิวเตรียนต์ที่มีปริมาณน้ำ 0.75 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ไม่ผลิตเอนไซม์เจลาติเนส (Gelatinase) สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับปฏิกิริยามีทิล-เรด และปฏิกิริยาไนเตรตรีดักชัน ให้ผลการทดสอบเป็นลบกับปฏิกิริยาการใช้ซิเตรต ปฏิกิริยาอินโดล ปฏิกิริยา Voges-Proskauer และปฏิกิริยาการผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดจากการใช้สับสเตรต ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และ ฟรุคโตส แต่ไม่ผลิตกรดเมื่อเจริญในสับสเตรตประเภทน้ำตาลซูโครส และแลคโตส (แสดงในตารางที่ 4.3) จากการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเหมือนกัน แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน ได้แก่ สีและขนาดโคโลนี และการย่อยสลายคอลลอยด์คอลลโคติน (Colloidal chitin) (ภาพที่ 4.35 ก และ 4.35 ข) โดยพบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งคอลลอยด์คอลลโคติน มีลักษณะโคโลนีสีขาวทึบขนาดใหญ่ และใหว่ใส (Clear zone) กว้าง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีลักษณะโคโลนีสีขาวแต่มีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 เชื้อรหัส 6.1 สามารถย่อยสลายคอลลอยด์คอลลโคติน ใหว่ใสที่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อรหัส 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.34 แสดงการย่อยเม็ดสีแกรมและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.35 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ในอาหารแข็ง คอลลอยด์คอลโคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในคู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 9 (Holt, 1994) พบว่าสอดคล้องกับแฟมิลี Enterobacteriaceae (จีโนส *Budvicia*, *Edwardsiella* และ *Escherichia*) และแฟมิลี Bibrionaceae (จีโนส *Aeromonas* และ *Plesiomon*) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากการทดลองพบว่าผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สอดคล้องกับจีโนส *Escherichia* และ *Edwardsiell* แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมียังให้ผลสอดคล้องกับแบคทีเรีย *Budvicia* แต่ไม่พบปฏิกิริยาเมทิล-เรด และปฏิกิริยาการผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ส่วนข้อมูลของแบคทีเรียในจีโนส *Aeromonas* และ *Plesiomon* ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีสอดคล้องลดหลั่นลงมาโดยไม่พบการผลิตเอนไซม์เจลาติเนส และการผลิตกรดจากน้ำตาลแลคโตส และไม่พบปฏิกิริยาอินโดลและการผลิตกรดจากน้ำตาลแลคโตสตามลำดับ

เนื่องจากข้อมูลในการทดสอบทางเคมีไม่เพียงพอที่จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงทำการจำแนกด้วยชุดทดสอบ GPI และ GNI+ ซึ่งให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบทางเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 เปรียบเทียบกับแบบคทีเรียชนิดต่างๆ

คุณลักษณะและปฏิกิริยา	แบบคทีเรีย รหัส 6.0		แบบคทีเรีย รหัส 6.1		Escherichia	Edwardiella	Budvicia	Aeromonas	Plesiomon
	รูปท่อน	ฟาคัลเดทีฟ	รูปท่อน	ฟาคัลเดทีฟ	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.
แกรม	-	-	-	-	-	-	-	-	-
รูปร่าง	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน	รูปท่อน
แคปซูล	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
สปอร์	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ย้อมติดสีทิงการด	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
ความต้องการออกซิเจน	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ	ฟาคัลเดทีฟ
ความสามารถในการเคลื่อนที่	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะตอะเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอนไคเนส	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ปฏิกิริยาการใช้เตรต	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ปฏิกิริยาอินโดล	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+
ปฏิกิริยาเมทิล-เรด	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
ปฏิกิริยา Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ปฏิกิริยาไนเตรตรีดักชัน	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การผลิตซัลเฟอร์ไดออกไซด์	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ความสามารถในการผลิตกรดโดยใช้ น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรต	แบคทีเรีย		Escherichia		Budvicia		Aeromonas		Plesiomon	
	รหัส 6.0	รหัส 6.1	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.	sp.
กลูโคส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
กาแลคโตส	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	N/A	N/A
ฟรุกโตส	+	+	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+
ซูโครส	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
แลคโตส	-	-	+/-	-	-	+	+	+	+	+

หมายเหตุ

- + หมายถึง ผลการทดสอบเป็นบวก
- หมายถึง ผลการทดสอบเป็นลบ
- +/- หมายถึง ผลการทดสอบแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน
- N/A หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ GPI และ GNI+

ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ GPI พบว่าไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 2

สายพันธุ์ ในขณะที่ข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 จากชุดทดสอบ GNI+ อยู่ในกลุ่ม *Sphingobacterium* ข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 จากชุดทดสอบ GNI+ อยู่ในกลุ่ม *Brevundimonas*

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ด้วยชุดทดสอบ GNI+

คุณลักษณะและปฏิกิริยา	แบคทีเรีย รหัส 6.0	แบคทีเรีย รหัส 6.1
สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบที่มี 2,4,4'- ไทรโคล-2'-ไฮดรอกซี ไดฟีนิล อีเทอร์ (2,4,4'-trichlo-2'-hydroxy diphenyl ether)	-	-
สามารถผลิตกรดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันกลูโคส	+	-
สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวเสริมมีเดียม (Enriched medium)	+	+
ทดสอบความสามารถในการใช้อะซิตาไมด์ (Acetamide)	-	-
ทดสอบความสามารถในการย่อยเอสคูลิน	+	+
ทดสอบความสามารถในการย่อยสารอินดอกซิล-เบตา-ดี-กลูโคไซด์ (Indoxyl-β-D-glucoside)	+	-
ทดสอบความสามารถในการย่อยยูเรีย โดยเอนไซม์ยูรีเอส	+	-
ทดสอบความสามารถในการใช้ซิเตรต (Citrate)	-	-
ทดสอบความสามารถในการใช้มาโลเนต (Malonate)	-	-
ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทริปโตเฟน ดีอะมิเนส (Tryptophan deaminase)	-	-
ทดสอบความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะพอลิมัยซิน-บี (Polymysin B)	-	-
ทดสอบความสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ที่มีพารา-โคุมาริก (p-Coumaric) เป็นสารยับยั้ง	-	-
ความสามารถในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide)	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

คุณลักษณะและปฏิกิริยา	แบคทีเรีย รหัส 6.0	แบคทีเรีย รหัส 6.1
ความสามารถในการย่อยสลายสลายสาร ออโท-ไนโตรฟีนิล-เบตา-ดี-กาแลคโตไพราโนไซด์ (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyronoside)	-	-
ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (Lysine decarboxylase)	-	-
ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออร์นิทีน ดีคาร์บอกซิเลส (Ornithine decarboxylase)	-	-
ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส	+	+
ความสามารถในการใช้น้ำตาลในการเจริญ		
แลคโตส	-	-
มอลโตส	+	+
แมนนิทอล	-	-
ไซโลส	+	+
ราฟฟาโนส	-	-
ซอร์บิทอล	-	-
ซูโครส	+	-
อินโนซิทอล	-	-
อะโดนิทอล (Adonitol)	-	-
แรมโนส (Rhamnose)	-	-
แอล-อะราบิโนส (L-Arabinose)	+	+
กลูโคส	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์ใหม่ และ เมทาบอลิซึมของเซลล์ (López *et al.*, 2003) และเปปไทด์สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส เป็นผลให้เกิดการย่อยสลายเอนไซม์ไคตินเนสได้ (Mao *et al.*, 2005)

การควบคุมอัตราการให้อากาศ (ความเร็วรอบ และปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) มีผลต่อ อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ (ความเร็วรอบในการเขย่า สูง หรือปริมาณอาหารเลี้ยงเชื่อน้อย) ส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น โดยพบว่าปริมาณ เซลล์และการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วรอบการเขย่าจาก 0 รอบ ต่อนาทีเป็น 100 และ 150 และ 200 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญและการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น และมีการนำ ผลิตภัณฑ์ไปใช้ในการเจริญเป็นผลให้การสะสมลดลง ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกสภาวะการ เลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ ในขณะที่ความแตกต่างของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลต่อการเจริญและการสะสมเอน- อะซิ- ทิลกลูโคซามีน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนทั้งหมดในฟลาสก์ พบว่าเชื้อ แบคทีเรียทั้งรหัส 6.0 และ 6.1 ให้การสะสมสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารไคตินมีเดียปริมาณ 150 มิลลิลิตร

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำ (20 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียมี อัตราการเจริญจำเพาะ การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และการย่อยสลายไคตินต่ำ และเมื่อ เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น (25 และ 30 องศาเซลเซียส) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญให้อัตราการ เจริญจำเพาะ การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และการย่อยสลายไคตินเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิ สูงถึงระดับหนึ่ง (35 และ 40 องศาเซลเซียส) เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญ การสะสมเอน-อะซิทิล- กลูโคซามีน และการย่อยสลายไคตินในระดับคงที่ ซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ ทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปมีผลให้เอนไซม์มีกิจกรรมลด ต่ำลง ทำให้การย่อยสลายช้าลงหรือการเจริญต่ำลงด้วย

ในขณะที่แบคทีเรียเจริญพบการเปลี่ยนแปลงพีเอชสูงขึ้นในอาหารไคตินมีเดีย (จาก 7.0 เป็น 9.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) และสารละลายไคติน (จาก 7.0 เป็น 8.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) โดยแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนอยู่ในช่วงพีเอชเป็นต่าง อาจส่งผลต่อ การทำงานของเอนไซม์และความคงตัว (Stability) ของเอนไซม์ เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต เอนไซม์หลายชนิดในการย่อยสลายไคติน (Shigemasa *et al.*, 1994. ; Svitil *et al.*, 1997) ดังนั้น อุณหภูมิและพีเอชจึงมีความจำเพาะต่อเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน การเพิ่มหรือลดอุณหภูมิและ พีเอชส่งผลให้เอนไซม์บางชนิดทำงานได้ไม่ดี ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความแตกต่างกัน อุณหภูมิ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายไคตินและผลิตเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน อาจแตกต่างกับ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย

การย่อยสลายไคตินเป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนและไคตินโอลิโกเมอร์ เป็นการทำงาน ร่วมกันโดยเอนไซม์หลายชนิด (Warren, 1996) ซึ่งสามารถย่อยสลายภายในสายไคตินพอลิเมอร์ (เอนโดไคตินเนส) และย่อยสลายโมเลกุลเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนจากด้านปลายอนรีดิวซ์ของสาย พอลิเมอร์ (เอกโซไคตินเนส) จากการทดลองพบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนต่ำ ในช่วงแรก ของการทดลองและเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายไคตินนานขึ้น พบการสะสมโคโตไบโอส สูงในช่วงแรกของการทดลอง (วันที่ 1) และค่อยๆ ลดลงเมื่อใช้เวลาการย่อยสลายไคตินนานขึ้น ในขณะที่การสะสมโคโตไตรโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส และโคโตเฮกโซส มีรูปแบบไม่ แน่นนอน อาจเป็นเพราะในช่วงแรกของการทดลองเอนไซม์เอนโดไคตินเนสย่อยสลายไคตินเป็น พอลิเมอร์และไคตินโอลิโกเมอร์ขนาดใหญ่ ในขณะที่เอนไซม์เอกโซไคตินเนสทำงานไม่ดี หรือทำงาน ได้ดีแต่แบคทีเรียนำเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนไปใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ จึงไม่สามารถ ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ได้ เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายไคตินนานขึ้น ปริมาณเซลล์และพีเอชในน้ำ หมักสูงขึ้น อาจทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เอกโซไคตินเนสสูงขึ้น หรือเอนไซม์สามารถย่อยสลาย พอลิเมอร์และไคตินโอลิโกเมอร์ขนาดใหญ่ให้เป็นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมากขึ้น จึงตรวจวัดการ สะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในช่วงท้ายของการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ และการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนคงที่ อาจเป็นเพราะเกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ เนื่องจากการจำกัดปริมาณสับสเตรต หรือการยับยั้งเนื่องจากผลิตภัณฑ์ (เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน) เป็นผลให้เซลล์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนและผลิตเอนไซม์ได้ (Ulhoa and Peberly, 1991 ; Béguin and Auber, 1994 ; Nawani and Kapdnis, 2005)

เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแบคทีเรียในระยะ Active cells พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโตเนอความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ให้ผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด เท่ากับ 2.030 มิลลิโมล ต่อกกรัมเซลล์แห้ง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส สามารถให้ผลได้ของ ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตโตรส และโคโตเพนโตสสูงสุด เท่ากับ 120.155 4.577 7.554 และ 7.504 มิลลิโมลต่อกกรัมเซลล์แห้ง (ตามลำดับ) (ตารางที่ 5.1) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ให้ผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และโคโตไตรโอสสูงสุดเท่ากับ 2.171 และ 57.387 มิลลิโมล ต่อกกรัมเซลล์แห้ง (ตามลำดับ) (ตารางที่ 5.2) แต่เมื่อลดปริมาตรอาหารไคตินมีเดียมเป็น 100 มิลลิลิตร พบว่าเชื้อรหัส 6.0 สามารถให้ผลได้ของโคโตเฮกโซสสูงสุดเท่ากับ 174.731 มิลลิโมล ต่อกกรัมเซลล์แห้ง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 สามารถให้ผลได้ของโคโตไบโอส ไคโต- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตโตรส โคโตเพนโตส และโคโตเฮกโซสสูงสุดเท่ากับ 586.763 0.858 4.684 88.152 มิลลิ-
โมลต่อกรัมเซลล์แห้ง (ตามลำดับ)

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในระยะ Resting cells พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ใน
สารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส สามารถให้ผลได้ของโคโตไตรโอส และโคโตเพนโตสสูงสุด เท่ากับ 2.286 และ 5.833
มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง (ตามลำดับ) (ตารางที่ 5.3) และเมื่อลดอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียส
สามารถให้ผลได้ของโคโตเตโตรส และโคโตเฮกโซสสูงสุด เท่ากับ 1.946 และ 5.861 มิลลิโมลต่อ
กรัมเซลล์แห้ง (ตามลำดับ) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ให้ผลได้ของโคโตเตโตรสสูงสุด
27.981 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วย
ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5.4)

สมมุติฐานของการทดลองย่อยสลายโคตินโดยแบคทีเรียในระยะ Resting cells คาดว่า
การจำกัดการเจริญของเซลล์โดยการควบคุมสารอาหาร สามารถเพิ่มการสะสมผลิตภัณฑ์ (เอโน-
อะซิติกกลูโคซามีน และโคตินโพลิโกเมอร์) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโคตินถูก
นำไปใช้เพื่อซ่อมแซมเซลล์เท่านั้น (Maintenance substrate) โดยอาศัยการควบคุมจากสภาวะ
จำกัดสารอาหาร ความเร็วรอบการเขย่า และปริมาณอาหารเหลว เพื่อให้แบคทีเรียเจริญช้าหรือ
คงที่ แต่จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียในระยะ Resting cells ไม่สามารถให้การสะสมเอโน-
อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์สูง จึงจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยควบคุมอื่นๆ ร่วมด้วย
เพื่อให้การผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้นต่อไป

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 โดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับ
คู่มือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 9 (Holt, 1994)
พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์อาจอยู่ในจีนัส *Budvicia* *Edwaedsiella* *Eschrichia*
Aeromonas หรือ *Plesiomon* แต่เมื่อนำมาทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบของบริษัท bioMerieux
ได้แก่ชุดทดสอบ GNI+ พบว่าแบคทีเรียรหัส 6.0 อาจเป็นจีนัส *Sphingobacterium* และ
แบคทีเรียรหัส 6.1 อาจเป็นจีนัส *Brevundimonas* จึงจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน 16S rDNA แต่พบปัญหา เนื่องจากดีเอ็นเอไพเมอร์ไม่เหมาะสมกับจีโนมดีเอ็นเอของ
เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ดังนั้นจึงไม่สามารถจัดจำแนกด้วยวิธีนี้ได้ ดังนั้นในการศึกษา
เกี่ยวกับงานวิจัยขั้นต่อไป ควรศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอไพเมอร์ และสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่
เหมาะสม เพื่อทำการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ต่อไป

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบผลได้ของเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนและโคตินโอดีทเมอริโดยวิธีแยกที่ร้อยละ 6.0 ในระยะ Active cells ที่สภาวะต่างๆ

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ผลได้กัวนซ์									
	เอน-อะซีทิลกลูโคซามีน					โคโตไบโอส				
	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)
1	1.771	1.807	0.980	0.960	0.011	90.823	nd	nd	nd	nd
2	2.485	2.349	1.058	0.411	0.005	82.076	nd	nd	nd	nd
3	2.255	1.258	1.792	0.535	0.004	120.155	nd	nd	nd	nd
4	2.418	1.278	1.892	0.554	0.005	119.570	0.319	0.070	0.070	4.577
5	2.182	1.075	2.030	0.106	0.032	3.285	nd	nd	nd	nd

ตารางที่ 5.1 (ต่อ)

		ผลึกภัณฑ์							
		โคโคเตโตรอส		โคโคเพนโตส		โคโคเฮกโซส			
สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	การสะสมสูงสุด (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิตร)	ผลได้ (มิลลิเมตรต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิตร)	ผลได้ (มิลลิเมตรต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิตร)	ผลได้ (มิลลิเมตรต่อกรัมเซลล์แห้ง)
1	0.312	2.710	0.115	0.629	2.710	0.232	nd	nd	nd
2	0.307	2.349	0.131	0.144	2.375	0.061	0.306	0.105	2.909
3	0.184	0.878	0.210	0.712	1.258	0.566	0.778	0.004	174.731
4	0.035	0.005	7.554	0.523	0.070	7.504	0.273	1.497	0.182
5	0.050	0.032	1.550	0.164	1.342	0.122	0.116	1.075	0.108

หมายเหตุ

1. อาหารโคคินมีเดียที่มีเปปโตเนอซมเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. อาหารโคคินมีเดียที่มีเปปโตเนอซมเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
3. อาหารโคคินมีเดียที่มีเปปโตเนอซมเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
4. อาหารโคคินมีเดียที่มีเปปโตเนอซมเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
5. อาหารโคคินมีเดียที่มีเปปโตเนอซมเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

*วิเคราะห์ตามวิธีเอนคาผลก

nd หมายถึงตรวจไม่พบ

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบผลได้ของเอน-อะซิติกกลูโคซามีนและโคตินโอดีโทไมนโดยวิธีแยกแยะที่เรียกรหัส 6.1 ในระยะ Active cells ที่สภาวะต่างๆ

		ผลิตภัณฑ์					
		เอน-อะซิติกกลูโคซามีน			โคตินโอดีโทไมน		
สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	โคโคโคโรส
	(มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง *	(มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	(มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง *	(มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	น้ำหนัก
	(มิลลิโมลาร์)	(มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	(มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	(มิลลิโมลาร์)	(มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)	(มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	(มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร)
1	1.259	1.461	0.861	1.334	0.003	457.314	nd
2	1.974	1.073	1.841	1.065	0.002	586.763	nd
3	1.398	1.432	0.976	0.985	0.004	254.410	0.949
4	1.663	0.766	2.171	0.458	0.002	282.616	0.093
5	1.663	0.766	2.171	0.458	0.002	282.616	0.093
							0.002
							0.002
							0.002

ตารางที่ 5.2 (ต่อ)

ผลการดำเนินงาน	ผลิตภัณฑ์					
	โคโคเตโรส			โคโคเพนโตส		
	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิเมตรต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิเมตรต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิตร)	ผลได้ (มิลลิเมตรต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิเมตรต่อ กรัมเซลล์แห้ง)
1	0.346	1.238	0.280	nd	nd	0.177
2	0.180	0.210	0.858	0.210	0.739	0.160
3	nd	nd	nd	0.080	4.684	0.211
4	0.102	0.719	0.142	nd	nd	nd
5	0.102	0.719	0.142	nd	nd	nd

หมายเหตุ

1. อาหารโคคินมีเดียที่มีโปรตีนความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. อาหารโคคินมีเดียที่มีโปรตีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
3. อาหารโคคินมีเดียที่มีโปรตีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
4. อาหารโคคินมีเดียที่มีโปรตีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
5. อาหารโคคินมีเดียที่มีโปรตีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

* วิเคราะห์ตามวิธีเอนคาสมนท

nd หมายถึงตรวจไม่พบ

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบผลได้ของเอน-อะซิทีลกลูโคซามีนและโคตินโอดีนอริโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ในระยะ Resting cells ที่สภาวะต่างๆ

สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ผลิตภัณฑ์					
	เอน-อะซิทีลกลูโคซามีน			โคโตไบิโอส		
	น้ำหนัก	ผลได้	น้ำหนัก	ผลได้	น้ำหนัก	ผลได้
1	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง * (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง * (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง * (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร
2	nd	nd	nd	nd	0.029	0.016
3	nd	nd	nd	nd	0.030	0.018
	nd	nd	nd	nd	nd	nd
						1.758
						2.286
						nd

ตารางที่ 5.3 (ต่อ)

ผลการ เลี้ยงเชื้อ	ผลิตภัณฑ์					
	โคโคเตโตรอส			โคโคเพนโตส		
	น้ำหนัก	ผลได้ (มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร)	ผลได้ (มิลลิโมลต่อ กรัมเซลล์แห้ง)	น้ำหนัก เซลล์แห้ง* (มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร)
การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)
1	0.004	0.018	0.219	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	0.077	5.833	nd
3	0.026	0.013	1.946	0.005	0.477	0.077

หมายเหตุ

1. สารละลายโคคิน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. สารละลายโคคิน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
3. สารละลายโคคิน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

*วิเคราะห์ตามวิธีเอนคาเมนท

nd หมายถึงตรวจไม่พบ

ตารางที่ 5.4 เปรียบเทียบผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนและโคตินอิลโกเมอริโดยเข็แบบที่เรียหที่ 6.1 ในระยะ Resting cells ที่สภาวะต่างๆ

		ผลิตภัณฑ์					
		เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน			โคโคไปเอส		
สภาวะการเลี้ยงเชื้อ		นำหนัก	ผลได้	นำหนัก	ผลได้	นำหนัก	ผลได้
		เซลล์แห้ง *	(มิลลิโมลต่อ (มิลลิโมลาร์) กรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร)	เซลล์แห้ง *	(มิลลิโมลต่อ (มิลลิโมลาร์) กรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร)	เซลล์แห้ง *	(มิลลิโมลต่อ (มิลลิโมลาร์) กรัมเซลล์แห้ง) ต่อมิลลิลิตร)
1	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd
2	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd
3	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	nd

ตารางที่ 5.4 (ต่อ)

ผลการดำเนินงาน	ผลิตภัณฑ์					
	โคโคเตโตโรส			โคโคเตเพนโตส		
	น้ำหนัก	ผลได้	น้ำหนัก	ผลได้	น้ำหนัก	ผลได้
เลี้ยงเชื้อ	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง* (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง* (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)	การสะสมสูงสุด (มิลลิโมลาร์)	เซลล์แห้ง* (มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)
1	0.038	0.001	nd	nd	nd	nd
2	0.025	0.002	nd	nd	nd	nd
3	0.025	0.002	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ

1. สารละลายโคโคเตโตโรส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. สารละลายโคโคเตเพนโตโรส ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
3. สารละลายโคโคเตโตโรส ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

* วิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก

nd หมายถึงตรวจไม่พบ

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโคตินโดยเชื้อแบคทีเรีย ในระยะ Active cells เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารเหลวโคตินมีเดียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักที่ได้จากการย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียมโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2.05 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2.18 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) โคโตไบโอส 0.11 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) โคโตเตโตรส 0.05 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) โคโตเพนโตส 0.16 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) และโคโตเฮกโซส 0.12 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 8) เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักที่ได้จากการย่อยสลายโคตินในอาหารโคตินมีเดียมโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ด้วยวิธีทางเคมี พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 1.51 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ให้การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส และโคโตเตโตรส เท่ากับ 1.66 (วันที่ 7) 0.46 (วันที่ 2) 0.09 (วันที่ 1) และ 0.10 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) ตามลำดับ เชื้อรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินได้ 78.67 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรหัส 6.1 สามารถย่อยได้ 87.49 เปอร์เซ็นต์ ทั้งเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สามารถเจริญได้ในอาหารโคตินมีเดียมโดยมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในระยะ Resting cells เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ในสารละลายโคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อรหัส 6.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเชื้อรหัส 6.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อนำน้ำหนักจากการย่อยสลายโคตินในสารละลายโคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี ไม่พบการสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน และเมื่อนำน้ำหนักมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าเชื้อรหัส 6.0 ให้การสะสมโคโตเตโตรส 0.026 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 6) โคโตเพนโตส 0.004 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 4) และโคโตเฮกโซส 0.077 (วันที่ 6) และเชื้อรหัส 6.1 ให้การสะสมโคโตเตโตรส 0.025 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) เชื้อรหัส 6.0 สามารถย่อยสลายโคตินได้ 8.20 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรหัส 6.1 สามารถย่อยได้ 10.26 เปอร์เซ็นต์ ทั้งเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 สามารถเจริญได้ในสารละลายโคตินโดยมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ด้วยวิธีทางชีวเคมีพบว่าตรงกับ จีโนส *Eschrichia* sp. จีโนส *Edwaedsiella* sp. จีโนส *Budvicia* sp. และจีโนส *Aeromonas* sp. และ *Plesiomon* sp. และเมื่อยืนยันผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ GNI+ พบว่าข้อมูลของเชื้อรหัส 6.0 ตรงกับ *Sphingobacterium* sp. ข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 จากชุดทดสอบ GNI+ ตรงกับ *Brevundimonas* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2544. "ไคติน-ไคโตซาน." หน้า 9-10. ใน **เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน**. กรุงเทพฯ : ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ.
- รัฐ พิษณุวงกุล. 2544. "การตัดไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์." หน้า 41-51. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รัตนา รุจิรวินช. 2544. "การผลิตไคติน-ไคโตซาน." หน้า 1-10. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศวนบุญ จิระชาญชัย, รักรอง ยกสำน และโกศล สมัครรัตน์. 2544. "สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน." หน้า 11-40. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Anonymous. 2005. Chitin. [online]. Available : http://www.faunistik.net/detinvert/morphology/gewebe/chitin_01.html.
- Aiba, S., S. Krairak, H. Sashiwa, N. Yamano, K. Ishikawa, A. Shimomura, G. Kawabata, K. Hiraga, and K. Ida. 2003. "Production of N-acetyl-D-glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Derived from *Trichoderma viride* and *Aeromonas hydrophila* H-2330." p. 126. in **9th International Chitin Chitosan Conference**. Montreal.
- Austin, P.R. and J.P. Zikakis. 1981. "Chitin : New Facets of Research." *Science*. 212 : 749-753.
- Bassler, B.L., C. Yu, Y.C. Lee, and S. Roseman. 1991. "Chitin Utilization by Marine Bacteria ; Degradation and Catabolism of Chitin Oligosaccharide by *Vibrio furtisii*." *The Journal of Biological Chemistry*. 266 : 24276-24286.
- Béguin, P. and J.P. Auber. 1994. "The Biological Degradation of Cellulose." *FEMS Microbiology Reviews*. 13 : 28-88.
- Brameld, D.A. and W.A. Goddard III. 1998. "The Role of Enzyme Distortion in the Single Displacement Mechanism of Family 19 Chitinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chang, K.L.B., J. Lee, and W. Fu. 2000. "HPLC Analysis of N-Acetyl-Chitooligosaccharide During the Acid Hydrolysis of Chitin." *Journal of Food and Drug Analysis*. 8(2) :75-83.
- Cheng, C.Y. and Y. Li. 2000. "An *Aspergillus* Chitosanase with Potential for Large-Scale Preparation of Chitosan Oligosaccharide." *Biotechnology Applied Biochemistry*. 32 : 197-203.
- Chirachanchi, S. and R. Yokan. 2002. "Structural Characterization of γ -Ray Irradiated Chitosan." p. 18. in 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.
- Choi, W.S., Y.S. Park, and H.J. Park. 2002. "Preparation of Chitosan Oligomer by Irradiation." 61. in 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.
- Cottaz, S., B. Brasme, and H. Driguez. 2000. "A Fluorescence-Quenched Chitopentaose for the Study of Endo-chitinase and Chitobiosidase." *European Journal of Biochemistry*. 267 : 5593-5600.
- Eijsink, V.G.H., B. Synstad, G. Kolstad, S. Gåseidnes, D. Komander, D. Houston, N.G. Perter, and D.N.F. Ban Aaltenm. 2003. "Structure and Function of Chitinolytic Enzyme." p. 71-78. in Vårum, K.M., A. Domard, and Q. Smidsrød. *Advances in Chitin Science Volume VI*. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.
- Hensyl, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. editor. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Maryland : Williams and Wilkins.
- Horsch, M., C.Mayer, U. Sennhauser, and D.M. Rast. 1997. " β -N-Acetylhexosaminidase : A Target for the Design of Antifungal Agent." *Pharmacology Therapeutics*. 76 : 187-218.
- Jeuniaux, C. 1966. "Chitinase." *Method Enzymology* 8: 645-650.
- Koga, D., M. Mitsutomi, M. Kono, and M. Matsumiya. 1999. "Biochemistry of Chitinases." p. 111-123. in Jollés, P. and R.A.A. Muzzarelli. *Chitin and Chitinases*. Basel. Birkhäuser Verlag.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Krairak, S. and N. Budda. 2002. "The Production of Short Chitin Oligomer by Chitinolytic Microorganism." p. 60. in 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.
- López, J. L. C., J.A.S. Pérez, J.M.F. Sevilla, F.G.A. Fernández, E.M. Grima, and Y. Chisti. 2003. "Production of Lovastatin by *Aspergillus terreus*: Effects of the C:N Ratio and the Principal Nutrients on Growth and Metabolite Production." *Enzyme and Microbial Technology*. 33 : 270-277.
- Mao, X.B., T. Eksriwong, S. Chaybatcharin, J.J. Zhong. 2005. "Optimization of Carbon Source and Carbon/Nitrogen Ratio for Cordycepin Production by Submerged Cultivation of Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris*." *Process Biochemistry*. 40 : 1667-1672.
- Michael, J., Jr. Pelczar, R.D. Reid, and E.C.S. Chan. 1977. *Microbiology*. 4th Ed. New York. : McGraw-Hill., Inc.
- Michels, P.C. and J.P. Rosazza. 1999. "Methods for Biocatalysis and Biotransformation." P. 165-180. in Demain, A.L. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd Ed. Washing DC. : American Society for Microbiology Press.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin*. New York : Pergamon Press.
- Monreal, J. and E.T. Reese. 1969. "The Chitinase of *Serratia marcescens*." *Canadian Journal of Microbiology*. 15 : 689-696.
- Nawani, N. N., B.P. Kapadnis. 2005. "Optimization of Chitinase Production Using Statistics Based Experimental Designs." *Process Biochemistry*. 40 : 651-660.
- Nishi, N., J. Noguchi, S. Tokura, and H. Shiota. 1979. "Studies on Chitin. I. Acetylation of Chitin." *Polymer Journal*. 11 : 27-32.
- Nordtveit, R.J., K.M. Vårum, and O. Smidsrød. 1994. "Degradation of Fully Water-Soluble, Partially *N*-Acetylated Chitosans with Lysozyme." *Carbohydrate Polymers*. 23 : 253-260.
- Novikov, B.Y. 2003. "Hydrolysis of Chitin and Chitosan under the Action of Hydrochloric acid." p. 315-316. in Vårum, K.M., A. Domard, and O. Smidsrød. *Advances in Chitin Science Volume VI*. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pichyangkura, R., S. Kudan, K. Kuttiyawong, T. Sukwattanasint, and S. Aiba. 2002. Quantitative Production of 2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucose from Crystalline Chitin by Bacterial Chitinase." *Carbohydrate Research*. 337. : 557-559.
- Rattanakit, N., S. Yano, M. Wakayama, A. Plikomol, and T. Tachiki. 2003. "Saccharification of Chitin Using Solid-State Culture of *Aspergillus* sp. S1-13 with Shellfish Waste as a Substrate." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95 : 391-396.
- Reguera, G. and S.B. Leschine. 2001. "Chitin Degradation by Cellulytic Anaerobes and Facultative Aerobes from Soils and Sediments." *FEMS Microbiology Letters*. 204 : 367-374.
- Rudall, K.M. and W. Kenchington. 1973. "The Chitin System." *Biological Review*. 48. : 597-636.
- Ruiz-Herreza, J. and A.D. Martinez-Espinoza. 1999. "Chitin Biosynthesis and Structural Organization in vivo." p. 39-53. in Jollès, P. and R.A.A. Muzzarelli. *Chitin and Chitinases*. Basel. : Birkhäuser Verlag.
- Sandhya, C., LK. Adapa, KM. Nampoothiri, P. Binod, G. Szakacs, and A. Pandey. 2004. "Extracellular Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* in Submerged Fermentation." *Journal of Basic Microbiology*. 44 : 49-58.
- Sashiwa, H., S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Nuraki, M. Sukwattanasinitt, R. Pichyangkura, and S. Aiba. 2003. "Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin, Degradation Study of N-Acetylchitooligosaccharide and the Effect of Mixing of Crude Enzymes." *Carbohydrate Polymers*. 51 : 391-395.
- Sato, K., M. Morimoto, H. Saimoto, and Y. Shigemasa. 2003. Depolymerization of Chitin and Chitosan under Hydrothermal Condition." p. 281-282. in Vårum, K.M., A. Domard, and O. Smidsrød. *Advances in Chitin Science Volume VI*. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.
- Shigemasa, Y., K. Saito, H. Sashiwa, and H. Saimoto. 1994. "Enzymatic Degradation of Chitin and Partially Deacetylated Chitins." *International Journal of Biological Macromolecules*. 16 : 43-49.

- Siri-Upatham, C. 2002. "Radiation Degradation of Chitosan and Its Application for Young Orchid Plants Growth Promotion." p. 131. in 5 th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.
- Strand, S.P., O. Smidsrød, and K.M. Vårum. 2003. "Structure-Function Relationship in Chitosan." p. 27-34. in Vårum, K.M., A. Domard, and O. Smidsrød. **Advances in Chitin Science Volume VI**. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.
- Sukwattanasinitt, M., H. Zhu, H. Sashiwa, and S. Aiba. 2002. "Utilization of Commercial Non-Chitinase Enzyme from Fungi for Preparation of 2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucose from β -chitin." *Carbohydrate Research*. 337(2) :133-137.
- Svitil, A.L., S.M. Ni Cadhain, J.A. Moore, and D.L. Kirchman. 1997. "Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitinase." *Applied and Environmental Microbiology*. 63. : 408-413.
- Tjoelker , L.W., L. Gosting, S. Frey, C.L. Hunter, H.L. Trong, B. Steiner, H. Brammer, and P.W. Gray. 2000. "Structural and Functional Definition of Human Chitinase chitin-binding Domain." *The Journal of Biological Chemistry*. 275(1) : 514-520.
- Tsigos I. and V. Bosuriotis. 1995. "Purification and Characterization of Chitin Deacetylase form *Colletotrichum lindemuthianum*." *The Journal of Biological Chemistry*. 270(44) : 26286-26291.
- Ulhoa, C.J. and J.F. Peberdy. 1991. "Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*." *Journal of General Microbiology*. 137 : 2163-2169.
- Vårum, K.M., M.H. Ottøy, and O. Smidsrød. 2001. "Acid hydrolysis of chitosans." *Carbohydrate Polymers*. 46 : 89-98.
- Vishu, K.A.B. and R.N. Tharanathan. 2004. "A Comparative Study on Depolymerization of Chitosan by Proteolytic Enzymes." *Carbohydrate Polymer*. 58 : 275-284.
- Warren, R.A.J. 1996. "Microbial Hydrolysis of Polysaccharides." *Annual Review of Microbiology*. 50 : 183-212.
- Weikert, C., U. Sauer, and J.E. Bailey. 1998. "Increased Phenylalanine Production by Growing and Nongrowing *Escherichia coli* Strain CWML2." *Biotechnology Progress*. 14 : 420-424.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีในการทดลอง

อาหารไคตินมีเดียม (ดัดแปลงจาก Krairak and Budda. 2002)

ประกอบด้วย

ไคตินผง (powdered chitin) ขนาด 45 เมช 1.0 กรัม

ยีสต์สกัด (yeast extract) 0.1 กรัม

ซึ่งไคติน และยีสต์สกัด ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เป็น 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารสารละลายไคติน

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับอาหารไคตินมีเดียมแต่ไม่ต้อง

ใส่ยีสต์สกัด

อาหารแข็งคอลลอยด์คอลไคติน (ดัดแปลงจาก Krairak and Budda. 2002)

ประกอบด้วย

คอลลอยด์คอลไคติน 10.0 กรัม

ยีสต์สกัด 1.5 กรัม

แอมโมเนียมไนเตรด 10.0 กรัม

วุ้น 15.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารเหลวนิวเตรียนต์ (NB)

ประกอบด้วย

เนื้อสกัด (Beef extract) 3.0 กรัม

เปปโตน 5.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็งนิวเตรียนต์ (NA)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับ NB แต่ใส่หัว 15.0 กรัม

ต่ออาหาร 1 ลิตร

อาหารนิวเตรียนต์ เจลาติน (Nutrient Gelatin)

ประกอบด้วย

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
เจลาติน (Gelatin)	120.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร พีเอช

7.0 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารแข็งทริปเปิลซูการ์ไอรอน

ประกอบด้วย

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
เคซีนจากน้ำย่อยของตับอ่อน (Pancreatic digest of casein)	15.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No. 3)	5.0	กรัม
แลกโตส	10.0	กรัม
ซูโครส	10.0	กรัม
เดรกซ์โตส	1.0	กรัม
เฟอร์รัส ซัลเฟต (Ferrous sulfate)	0.2	กรัม
โซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride)	5.0	กรัม
โซเดียม ไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)	0.3	กรัม
ฟีนอล เรด	24.0	มิลลิกรัม
หัว	12.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารเหลวฟรุกโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (FruYB broth)

ประกอบด้วย

ฟรุกโตส	10.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด	1.0	กรัม
บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (Brom cresol purple)	13.3	มิลลิกรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร พีเอช

7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารเหลวกลูโคส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (GluYB broth)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับ FruYB แต่ใช้กลูโคสแทนฟรุกโตส

อาหารเหลวกาแลคโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (GalYB broth)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับ FruYB แต่ใช้กาแลคโตสแทนฟรุกโตส

อาหารเหลวแลคโตส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (LacYB broth)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับ FruYB แต่ใช้แลคโตสแทนฟรุกโตส

อาหารเหลวซูโครส ยีสต์ เอกซ์แทรกต์ บรอม ครีซอล เพอร์เพิล (SucYB broth)

ส่วนประกอบและวิธีเตรียมเหมือนกับ FruYB แต่ใช้ซูโครสแทนฟรุกโตส

อาหารเหลวเอ็มอาร์-วีพี

เปปโตน	7.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (Dipotassium phosphate)	5.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร พีเอช

6.9 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารเหลวไนเตรต

ประกอบด้วย

โพแทสเซียม ไนเตรต (Potassium nitrate) 5.0 กรัม

เปปโตน 5.0 กรัม

เนื้อสกัด 3.0 กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2 ซ้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารทริปโตน

ละลายทริปโตน (Tryptone) 10.0 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1

ลิตร พีเอช 7.0 ± 0.2 ซ้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

สารละลายแบร็ทเทอรีเอเจนต์ (สารละลาย A และ สารละลาย B)

สารละลาย A

ละลายแอลฟา-แนปธอล (α -naphthol) 5.0 กรัม ในเอธานอล (Ethanol) 100

มิลลิลิตร

สารละลาย B

ละลายโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) 16.0 กรัม ในน้ำ

กลั่น 100 มิลลิลิตร

โคแควรีเอเจนต์

ประกอบด้วย

พารา-ไดเมธิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ (p-dimethylaminobenzaldehyde)

5.0 กรัม

บิวทิล แอลกอฮอล์ (Butyl alcohol)

75.0 มิลลิลิตร

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrochloric acid concentrated)

20.0 มิลลิลิตร

ละลายพารา-ไดเมธิอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ในบิวทิลแอลกอฮอล์แล้วจึงเติมกรด

ไฮโดรคลอริก

แอซิก-แอลกอฮอล์

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 97.0 มิลลิลิตร

2. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณแอน-อะซิติกกลูโคซามีน

สารละลายโพแทสเซียมบอร์เลดบัพเฟอร์ พีเอช 9.1

เตรียมกรดบอริกเข้มข้น 0.8 โมลาร์ โดยละลายกรดบอริก 49.464 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ โดยละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 56.11 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

นำสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 0.8 โมลาร์ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ จนได้พีเอช 9.1

สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์

ละลาย p-DMAB 10.0 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วย HPLC

อะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์

อะซิโตไนไตรล์	700	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน (Deionization water)	300	มิลลิลิตร
ผสมแล้วกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร		

4. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโคตินที่เหลือจากการย่อย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีทดสอบและการวิเคราะห์

1. การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

การย้อมแกรมแบคทีเรีย

เขียนเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สเมียร์ (smear) เซลล์แบคทีเรียบนสไลด์ และตรึงเซลล์ (fixing) เซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2 ถึง 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมคริสตัล ไวโอเล็ต เป็นเวลา 1 นาที ย้อมทับด้วยสีย้อมแกรมไอโอดีน เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างรวดเร็ว (ไม่เกิน 20 วินาที) ล้างเบาๆ ด้วยน้ำ ย้อมซ้ำด้วยสีซาฟรานีน-โอ (safranin-O) เป็นเวลา 60 วินาที ล้างเบาๆ ด้วยน้ำจนหมดสี ชับด้วยกระดาษหรือวางเอียง 45 องศา ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 X 100 เท่า

การย้อมเอนโดสปอร์

เขียนเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็งนิวเตรียนต์ ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียมาสเมียร์บนสไลด์และตรึงเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2 ถึง 3 ครั้ง หยดสีมาลาไคท์กรีนให้ท่วมรอยสเมียร์ โดยวางสไลด์ไว้บนอ่างน้ำเดือด 10 นาที และคอยเติมสีอย่าให้แห้ง ล้างสีออกโดยผ่านน้ำเบาๆ จนไม่มีสีติดออกมา วางเอียง 45 องศาปล่อยให้แห้ง ย้อมทับด้วยสีซาฟรานีน-โอ ให้ท่วมรอยสเมียร์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างเบาๆออกด้วยน้ำ ชับด้วยกระดาษหรือวางเอียง 45 องศา ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 X 100 เท่า

การย้อมแคปซูล (ย้อม negative stain)

เขียนเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็งนิวเตรียนต์ ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูปแตะเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย ผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ ที่มีสีไนโกรซิน (nigrosin) ผสมสีย้อมและเซลล์แบคทีเรียให้เข้ากันโดยใช้สไลด์อีกแผ่นลากให้เป็นฟิล์มบางๆ ไปตามความยาวของแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้จนสีย้อมแห้ง แล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 X 100 เท่า

การย้อมสีติดกรด

เย็บเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารแข็งนิวเตรียนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียมาสมเมียร์บนสไลด์ และตรึงเซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2 ถึง 3 ครั้ง หยดสีย้อมคาร์บอน ฟุคซิน ให้ท่วมรอยสมเมียร์ โดยวางสไลด์ไว้บนอ่างน้ำเดือด 10 นาที และคอยเติมสีอย่าให้แห้ง ล้างสีย้อมออกเบาๆ ด้วยน้ำจืดไม่มีสีย้อมปนออกมา ล้างด้วยแอซิกแอลกอฮอล์ จนคราบแบคทีเรียเป็นสีชมพู (30 วินาที) ล้างเบาๆด้วยน้ำทันที ย้อมทับด้วย เมธิลีน บลู เป็นเวลา 30 วินาที ล้างสีย้อมออกด้วยน้ำเบาๆ ทิ้งไว้จนสีย้อมแห้ง แล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 X 100 เท่า

ทดสอบความต้องการอากาศในการเจริญ ของแบคทีเรีย

แทงเข็มเย็บเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียลงหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ตรงๆ เพียงครั้งเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย

ทดสอบการเคลื่อนที่

แทงเข็มเย็บเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ (ปริมาณ 0.75 เปอร์เซ็นต์) ตรงๆ เพียงครั้งเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะการเจริญและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

ทดสอบความสามารถการย่อยเจลาติน

แทงเข็มเย็บเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารนิวเตรียนต์ เจลาติน ตรงๆ เพียงครั้งเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลการทดลองโดยนำหลอดทดลองใส่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที บันทึกลักษณะการเจริญและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะเลส

ขีดเชื้อแบคทีเรียในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เข็มเย็บเชื้อกลางโคโลนีของแบคทีเรียตะบนสไลด์ หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนรอยเชื้อ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้นและบันทึกผลการทดลองเป็นบวก

การทดสอบทริปเปิล ซูการ์ ไอรอน

ชั่งเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหาร FruYB broth, GluYB broth, GalYB broth, LacYB broth และ SucYB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและการเกิดก๊าซของอาหารบริเวณผิวหน้าเอียงและรอยแทงเชื้อที่ก้นหลอด (butt)

ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรีย

ชั่งเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหาร FruYB broth, GluYB broth, GalYB broth, LacYB broth และ SucYB broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย การเปลี่ยนสีและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ บันทึกผลการทดลอง

การทดสอบปฏิกิริยาเมธิล เรด

ชั่งเชื้อแบคทีเรียลงในซึ่งมีอาหารเอ็มอาร์-วีพี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยดสีย้อมเมธิล เรด 3 หยดลงในหลอดทดลอง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร บันทึกผลการทดลอง

การทดสอบปฏิกิริยา Voges Proskauer

ชั่งเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเอ็มอาร์-วีพี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมแบร็ทเทอรีเอเจนต์ สารละลาย A และ สารละลาย B อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร บันทึกผลการทดลอง

การทดสอบปฏิกิริยาไนเตรดรีดักชัน และดีไนตริฟิเคชัน

ชั่งเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลวไนเตรด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายกรดซัลฟานิลิก (Sulfanilic acid) 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติก เข้มข้น 5.0 นอร์มอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย อัลฟา-แนพทิลเอมีน (α -naphthylamine) 5 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติก เข้มข้น 5.0 นอร์มอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร ในกรณีที่ผลการทดสอบไม่เปลี่ยนแปลง ให้ทำการทดลองขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสี (Zinc powder) สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

การทดสอบปฏิกิริยาอินโดล

เขียนเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลวทริปโตน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายโคแวกรีเอเจนต์ 3 หยด ลงในหลอดทดลอง เขย่าเบาๆ สังเกตสีแดงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผลการทดลอง

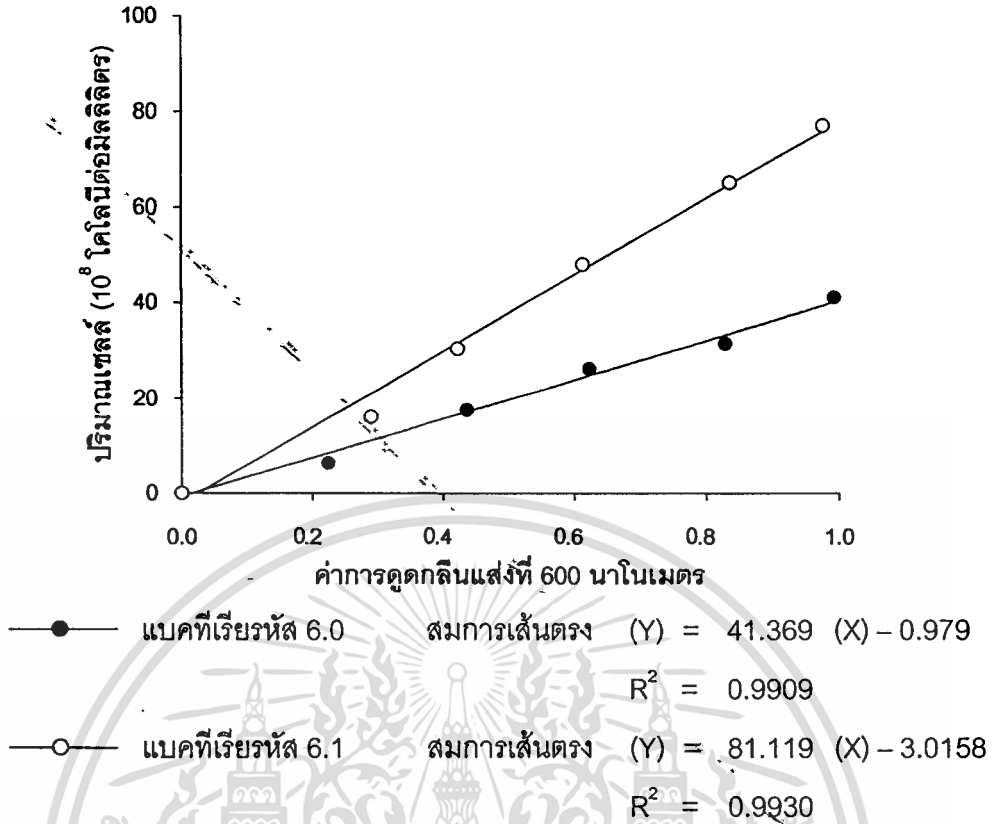
2. การเตรียมหัวเชื้อและกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

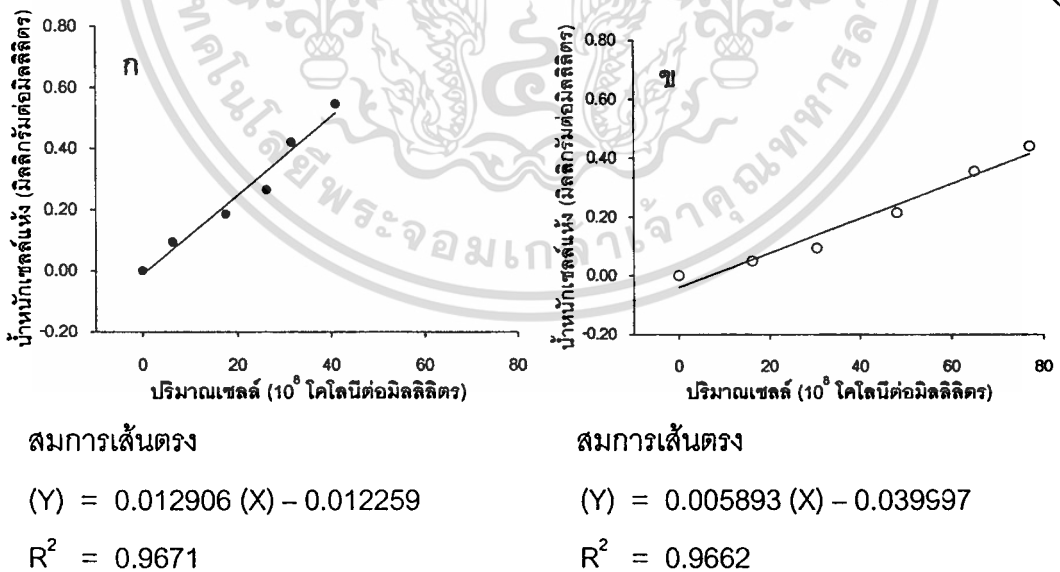
เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์รหัส 6.0 และ 6.1 ในอาหารแข็งนิวเตรียนต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ 1 ลูบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนเซลล์โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นกระจายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ในการทดลองปรับให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 ถึง 2×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

เขียนเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเตรียนต์ผิวหน้าเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 ลูบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวนิวเตรียนต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนเซลล์โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง (ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง) หลังจากนั้นละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำมาปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 นับปริมาณเซลล์แต่ละค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเทคนิคการกระจายเซลล์ (spread plate) และนำสารละลายเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงต่างๆ ไปอบหาน้ำหนักเซลล์แห้ง เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร กับปริมาณเซลล์ (ภาพที่ ข. 1) และกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพที่ ข. 2)



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 และ 6.1 ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กับปริมาณเซลล์



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 (ก) และ 6.1 (ข) ระหว่างปริมาณเซลล์กับ น้ำหมักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์และสับสเตรต

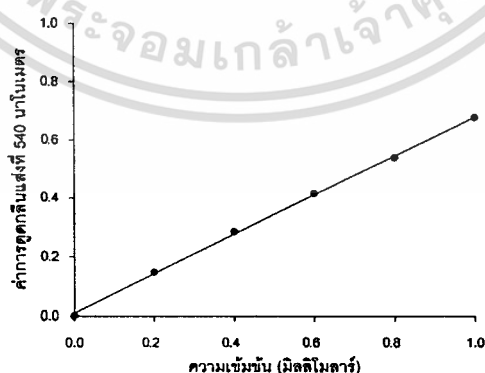
การวิเคราะห์ปริมาณเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay)

(Jeuniaux. 1966)

ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมโพแทสเซียมบอร์เรตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 3 นาที ลดอุณหภูมิโดยแช่น้ำแข็งทันที เติมสารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน (water bath) เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตสารละลายที่ได้ ใส่ในไมโครเพลท (micro plate) หลุมละ 300 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณเอน-อะซีทิลกลูโคซามีน ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอน-อะซีทิลกลูโคซามีน

1. เตรียมสารละลายเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เอน-อะซีทิลกลูโคซามีน 20.42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์
3. วิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (แกน Y)



$$\text{สมการเส้นตรง (Y) = 0.6693 (X) + 0.0092}$$

$$R^2 = 0.9992$$

ภาพที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานของเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนระหว่างความเข้มข้นกับ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วย HPLC

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส 3 ส่วนผสมกับอะซิโตไนโตรล์ 7 ส่วน กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ คอลัมน์ Asahipak Shodex NH₂P-50 4E โดยมีอะซิโตไนโตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนและโคตินโอลลิโกเมอร์ ด้วยวิธี HPLC

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

เตรียมสารละลายเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 20.42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคโบไฮสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งโคโคโบไฮส 42.46 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคไตรโฮสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งโคโคไตรโฮส 62.76 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคเตตระโฮสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งโคโคเตตระโฮส 8.31 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

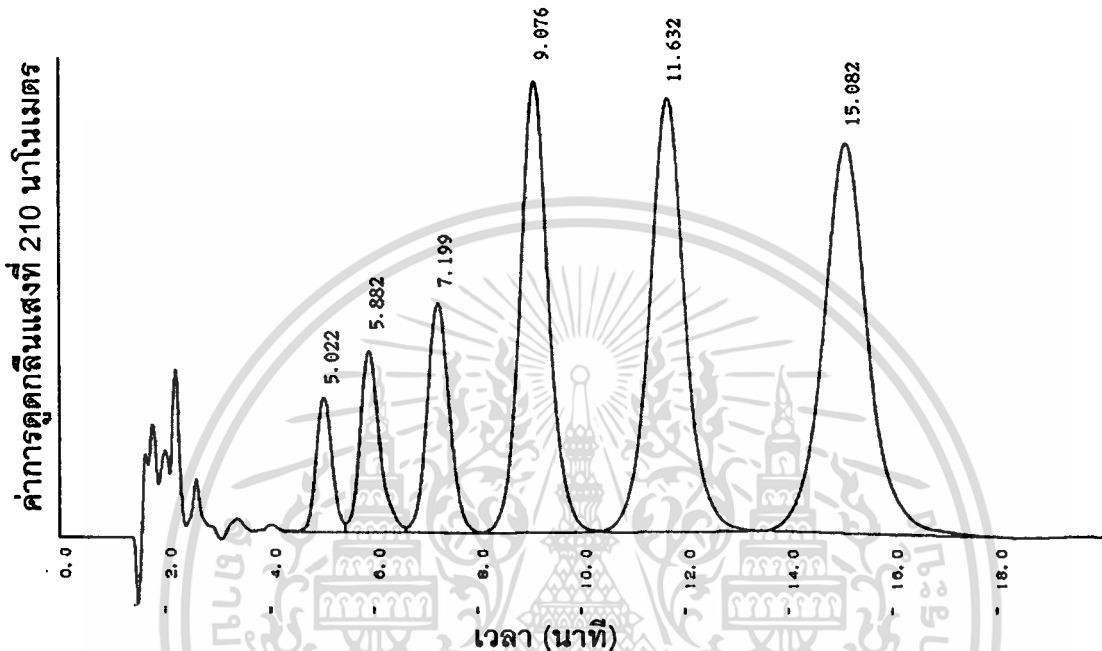
เตรียมสารละลายโคโคเพนโตสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งโคโคเพนโตส 10.34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคเฮกซะโฮสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งโคโคเฮกซะโฮส 12.37 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

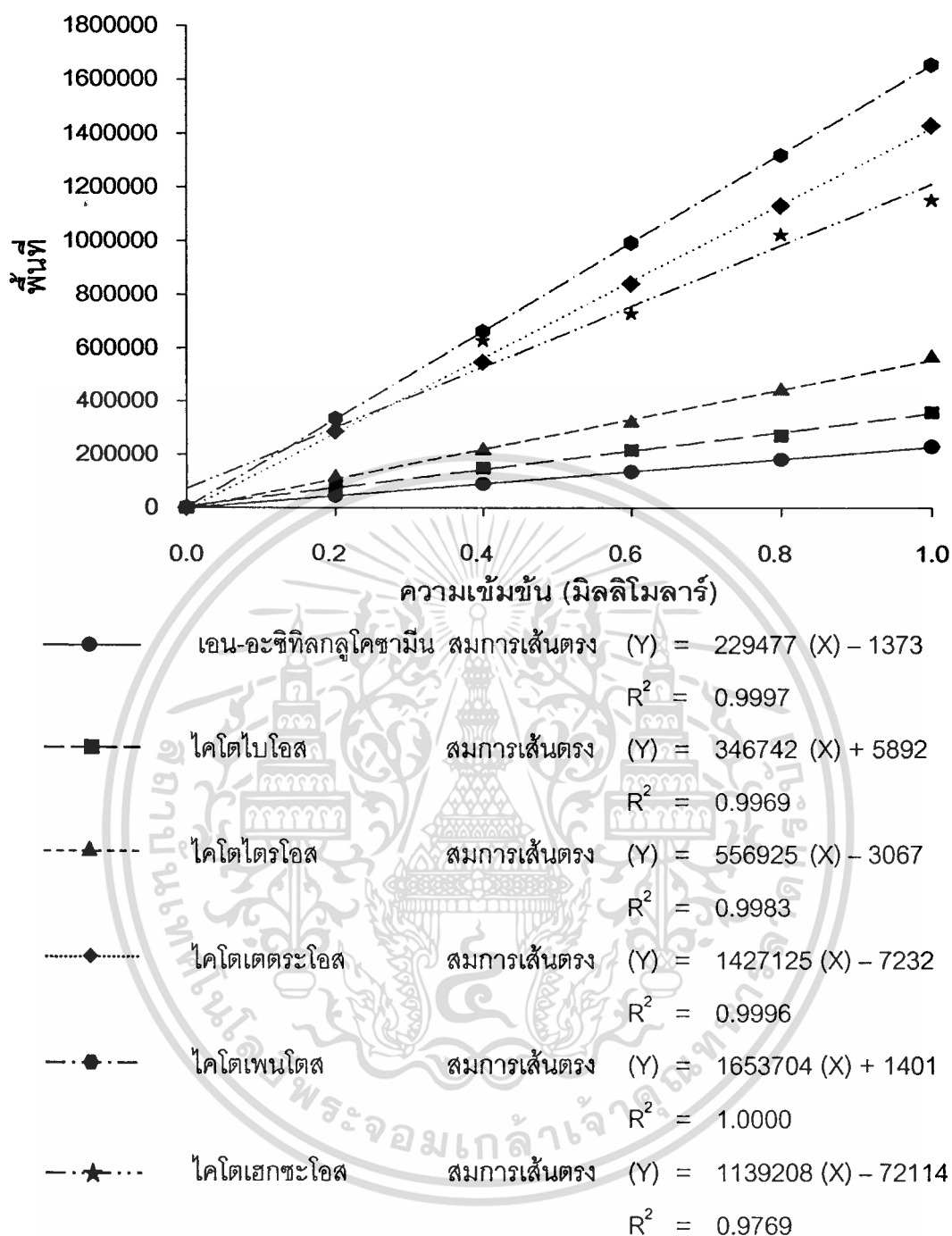
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผสมสารละลายมาตรฐานที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 3 ส่วน กับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน
4. กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร
5. วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y)



ภาพที่ ข.4 แสดงเวลาริเทนชัน (Retention time) ของเอน-อะซิติลกลูโคซามีน (5.022 นาที) ไคโตไบโอส (5.882 นาที) ไคโตไตรโอส (7.199 นาที) มิลลิโมลาร์ ไคโตเตโตรส (9.076 นาที) ไคโตเพนโตส (11.632 นาที) ไคโตเฮกโซส (15.082 นาที)



ภาพที่ ข.5 แสดงกราฟมาตรฐานของเอน-อะซีทิลกลูโคซามีนและโคตินโพลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่โดยวิธี HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณไคตินที่เหลือจากการย่อย

ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ละลายตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2.0 โมลาร์ นำไปต้มเป็นเวลา 40 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนโดยการเติมน้ำกลั่นในปริมาตรเท่าเดิม แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นเทตะกอนบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักและบันทึกผลการทดลอง

การคำนวณผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนต่อความเข้มข้นเปปโติน (มิลลิโมลต่อกรัมเปปโติน)

คำนวณจาก

ความเข้มข้นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด (มิลลิโมลาร์)

ความเข้มข้นเปปโติน (เปอร์เซ็นต์)

ตัวอย่างการคำนวณ

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ให้การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.54 มิลลิโมลาร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารไคตินมีเดียมที่มีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนต่อความเข้มข้นเปปโติน เท่ากับ

$$\frac{1.54 \text{ (มิลลิโมลาร์)}}{1000 \text{ (มิลลิลิตร)}} \times \frac{100 \text{ (มิลลิลิตร)}}{0.5 \text{ (กรัมเปปโติน)}}$$

เท่ากับ 0.31 มิลลิโมลต่อกรัมเปปโติน

การคำนวณปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนทั้งหมดในฟลาสก์ (มิลลิโมล)

คำนวณจาก

ความเข้มข้นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด (มิลลิโมลาร์)

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ให้การสะสมเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนสูงสุด 1.71 มิลลิโมลาร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลได้ของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนทั้งหมดในฟลาสก์ เท่ากับ

$$\frac{1.71 \text{ (มิลลิโมล)}}{1000 \text{ (มิลลิลิตร)}} \times 150 \text{ (มิลลิลิตร)}$$

เท่ากับ 0.257 มิลลิโมล

การคำนวณผลได้ของโพลิโกเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (โมลต่อกรัมเซลล์แห้ง)

คำนวณจาก

ความเข้มข้นเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนหรือโคโตโพลิโกเมอร์สูงสุดสูงสุด (มิลลิโมลาร์)

น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 ให้การสะสมโคโตเพนโตสสูงสุด 0.523 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 2) เมื่อเลี้ยงในอาหารโคตินมีเดียที่มีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบการเจริญของแบคทีเรียเท่ากับ 5.40×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในวันที่ให้การสะสมสูงสุด

เปลี่ยนปริมาณเชื้อแบคทีเรียให้อยู่ในค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้สมการ

$$(Y) = 0.012906 (X) - 0.012259$$

เมื่อ X แทน ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

Y แทน น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียรหัส 6.0 มีปริมาณเซลล์ 5.40×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.070 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

และมีผลได้ของโคโตเพนโดสต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\frac{0.523 \text{ (มิลลิโมล)}}{1000 \text{ (มิลลิลิตร)}} \times \frac{1 \text{ (มิลลิลิตร)}}{0.070 \text{ (มิลลิกรัมเซลล์แห้ง)}}$$

เท่ากับ 7.504 มิลลิโมลต่อกรัมเซลล์แห้ง

การคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)

เขียนกราฟระหว่าง Natural logarithm (ln) ของปริมาณเซลล์กับเวลา ซึ่งค่าความลาดเอียง (Slope) มีค่าเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

ตัวอย่างการคำนวณ

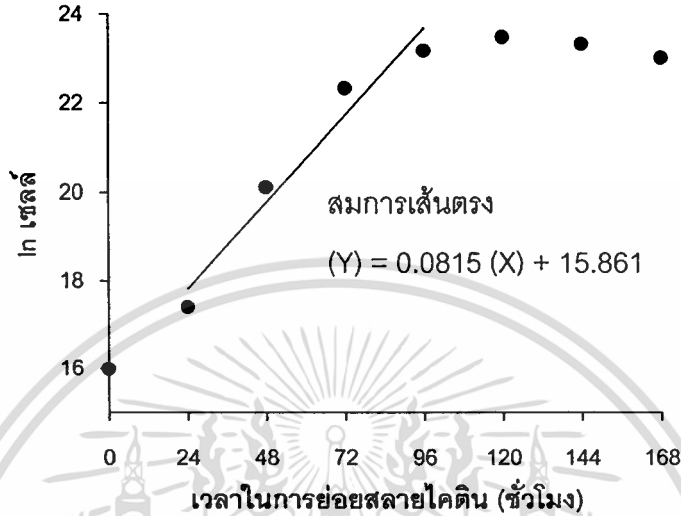
ตารางที่ ข. 1 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เรียรหัส 6.0 เมื่อเลี้ยงในอาหารโคตินมีเดียมที่มีเปปโติน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาในการย่อยสลายโคติน (ชั่วโมง)	ปริมาณเซลล์ (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	ln ปริมาณเซลล์
0	8700000	15.98
24	35900000	17.40
48	54000000	20.11
72	500000000	22.33
96	1163000000	23.18
120	1580000000	23.48
144	1350000000	23.33
168	990000000	23.02

เขียนกราฟระหว่าง ln ของปริมาณเซลล์กับเวลา

หาสมการเส้นตรงในช่วงลอกกาลิทึม (Logarithm phase)

อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 0.0815 ต่อชั่วโมง



ภาพที่ ข. 6 แสดงกราฟระหว่าง ln ของปริมาณเซลล์กับเวลา

ประวัติผู้เขียน

นายธีระพันธ์ เจริญสาคร เกิดวันที่ 1 มกราคม 2517 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2543 ถึงปีการศึกษา 2547



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้