

สำนักหอสมุดกลาง วิทยาลัยอาชีวศึกษาลาดกระบัง



การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน

7



นาย สพจน์ วัฒนวิทย์

นางสาว อารี วัฒนพงษ์วานิช

ร.พ.
๘๒๒๖๗

๒๕๖๕

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี.....

612548224

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

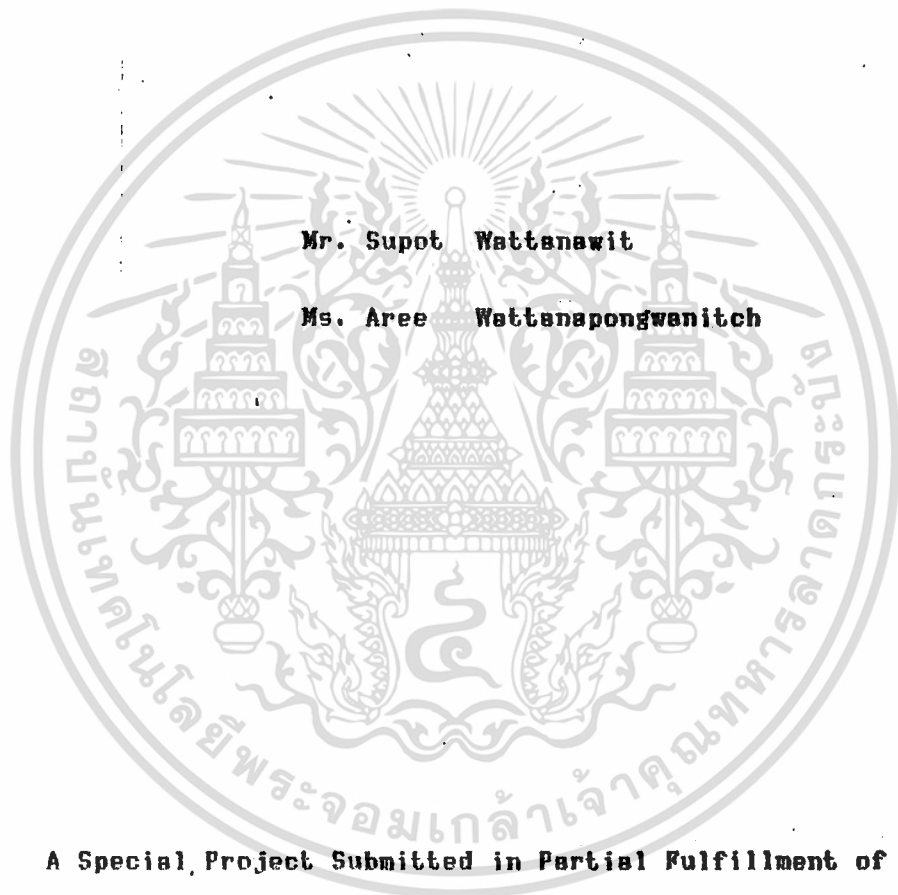
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ปีการศึกษา ๒๕๖๕

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SCREENING FOR CHITINOLITIC BACTERIA



Mr. Supot Wattanawit

Ms. Aree Wattanapongwanitch

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถสลายไคติน

โดย

นายสุพจน์ วัฒนวิทย์

นางสาวอารี พัฒนพงษ์วานิช

ภาควิชา


ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วรรณมา พรเศรษฐคุณ

ดร.จิราภรณ์ สุขุมาวาสี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
ทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นำโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต



(ผศ.เนาวรัตน์ ปานไย้ม)

หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงการพิเศษ



(ผศ.ดร.ดษณี ธนะปริวัฒน์)

ประธานกรรมการ



(ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์)

กรรมการ



(อ.สุรีย์ นานาสมบัติ)

กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน
นักศึกษา	นาย สุกจน์ วัฒนวิทย์ นางสาว อารี วัฒนพงษ์วานิช
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ วรณา พรเศรษฐคุณ ดร.จิราภรณ์ สุขมาวาสี
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2534

บทคัดย่อ

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ที่มีมากเป็นอันดับสองของโลก ซึ่งพบอยู่ตามผนังเซลล์ของพืชและสัตว์ โดยจะพบในเปลือกกุ้งซึ่งเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมทำกุ้งกระป๋อง อุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็ง เป็นส่วนใหญ่ จึงได้มีการศึกษาเพื่อนำส่วนเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ โดยนำมาทำการผลิตไคติน และเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของไคติน เพื่อให้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ทางด้านการแพทย์ ทางด้านการเกษตร และอื่น ๆ

การเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์ สามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี แต่มีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ ต้นทุนสูง ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะ เป็นต้น การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์ โดยแบคทีเรีย ซึ่งทำการแยกเชื้อจากแหล่งสำรวจ 14 แหล่งโดยใช้ Nutrient broth ที่มีส่วนผสมของบอลมิลไคติน อยู่ด้วยพบแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคตินได้จำนวน 21 ชนิด และทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย 1 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไคติน มาจากแหล่งสำรวจบริเวณ ทำน้ำสมุทรปราการ (น้ำกร่อย) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าว มีลักษณะเป็นรูปท่อน ดิดสีแกรมลบ สร้างสปอร์ได้ สามารถใช้บอลมิลไคติน 4.5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นส่วนผสมใน Nutrient broth ได้หมดภายในเวลา 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title Screening for Chitinolytic Bacteria

Name Mr. Supot Wattanawit

 Ms. Aree Wattanapongwanitch

Special Project Advisor Ms. Wanna Pornsettakul

 Mrs. Jiraporn Sukumawasi

Department Applied Biology

Academic Year 1991-1992

Abstract

Chitin is the second largest organic material in the world found in plant and animal cell wall and especially in shrimp skins which are the waste from shrimp canning and frozen shrimp industry. The utilization of shrimp waste for chitin and its derivatives production has been studied. The products obtained can be used widely in food industry, medical application, agriculture and so on. Chitin derivatives can be synthesized by chemical method, however, there are a lot of disadvantages such as high cost and pollution. This study is a preliminary study to produce chitin derivatives by bacteria. It has been found that 21 bacteria can hydrolyse chitin by using nutrient broth containing ball mill chitin to screen bacteria from 14 selected sources. The best effective bacteria is gram-negative rod, spore-forming and can utilize 4.5 ml. of ball mill chitin in the mixture of nutrient broth within 1 week.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งรายงานฉบับนี้จะขาดความสมบูรณ์ไป ถ้าไม่ได้รับการตรวจแก้จากผู้ทรงคุณวุฒิ ในการนี้ต้องขอขอบคุณ ดร.ตหณี สนะบริพันธ์ ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ อ.สุรีย์ นานาสัมบัติ และ อ.วรรณพร เศรษฐคุณ ที่ได้กรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษาให้ถูกต้อง ดร.จิราภรณ์ สุขุมาวาสี ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิชาการต่างๆ ผศ.สุวลี จันทร์กระจำง ที่กรุณาเอื้อเฟื้อไคติข และ คณะกรรมการนิจนาจรณาโครงการพิเศษทุกท่าน ที่ได้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ในระหว่างทำปัญหาพิเศษนี้ รวมทั้งนี้ ้ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทุกท่านที่ช่วยเป็นกำลังใจ และ เอื้อเฟื้อตลอดมา



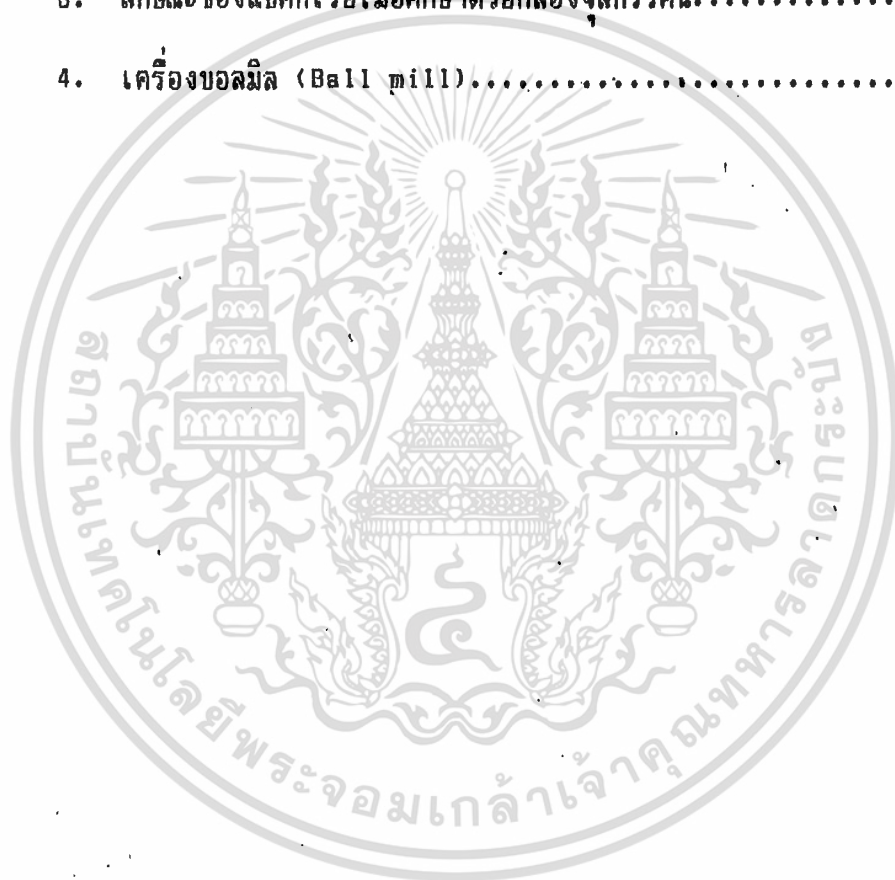
6 มี.ค. 2535

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. Microorganisms Screened for Chitinolytic Activity.....	10
2. Chitinolytic Activity of Bacterial Species.....	12
3. Conversion of Chitin to Reducing Sugar by Bacteria.....	13
4. ปริมาณผลผลิตทั่วโลกของสารประเภทไคติน.....	15
5. แสดงจำนวนและแหล่งสำรวจที่พบ Chitinolytic bacteria	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของไคติน ไคโตแซน และเซลลูโลส.....	8
2. ผลการตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายไคติน.....	22
3. ลักษณะของแบคทีเรียเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	26
4. เครื่องบอลลมิล (Ball mill).....	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
- วัตถุประสงค์	
- ขอบเขตของการศึกษา	
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
2. การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	7
- การสกัดโคตินจากเปลือกกุ้ง	
3. ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	19
- การออกสำรวจและเก็บตัวอย่าง	
- การแยกเชื้อ	
- การตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย	
4. ผลการทดลองและวิจารณ์.....	23
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	25
ภาคผนวก.....	28
เอกสารอ้างอิง.....	37
ประวัติ.....	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ไคตินจัดเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ ประมาณกันว่าไคตินหลายล้านตันได้มาจากสิ่งมีชีวิตในคลาสครัสเตเชีย (crustacean) (1) สำหรับไคตินจากแหล่งอื่น ๆ ได้แก่ พวกสิ่งมีชีวิตในทะเล รา โปรโตซัว หนอน และแมลง (2-7) ไคตินประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ β -1,4 N-acetylglucosamine (NAG) ซึ่งไม่ละลายในสารอินทรีย์ แต่ละลายในกรดเข้มข้น (8) ไคตินจัดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส (cellulose) ต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็น NH-CO-CH₃ แทนที่จะเป็นหมู่ OH เหมือนกับเซลลูโลส โดยทั่วไปคุณสมบัติของไคตินไม่สามารถละลายได้ดีโดยง่าย ดังนั้นการนำไคตินมาใช้ประโยชน์จึงไม่แพร่หลายเท่าที่ควร แต่อย่างไรก็ตาม ไคตินสามารถถูกดัดแปลงให้เป็นไคโตแซน (chitosan: Poly- β -(1 \rightarrow 4)2-amino-2-deoxy-D-glucan) ซึ่งผลิตได้โดยการแยกหมู่ Acetyl (Deacetylation) ออกจากไคติน เนื่องจากไคโตแซนสามารถมีประจุบวกบนหมู่ NH₂ ได้ จึงทำให้ไคโตแซนสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้การใช้ประโยชน์ของไคโตแซนมีมากกว่าไคติน ในธรรมชาติ การเปลี่ยนไคตินเป็น NAG ทำได้โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้าง Hydrolytic enzyme ได้แก่ CHITINASE (Chitinoglycanohydrolase, EC3.2.14) และ CHITOBIASE (Acetylaminodeoxyglucohydrolase, EC3.2.1.29) (9-11) Chitinolytic enzyme ได้จากจุลินทรีย์หลายพันธุ์ (4, 6, 7, 8, 9, 12-17) ที่รู้จักกันดี ได้แก่ จุลินทรีย์ในเจินัส *Aeromonas, Seratia, Vibrio, Myxobacter, Streptomyces* และ *Bacillus* (7, 8, 11, 15, 16, 17-20) ไคตินที่อยู่ในดินจะถูกย่อยสลายไปโดยพวก Actinomycetes ส่วนพวกที่อยู่ในทะเลจะถูกย่อยสลายโดยพวก *Vibrio sp.* (21)

สายพันธุ์ของเชื้อ *Serratia marcescens* (14-22) *Bacillus sp.* (23)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Vibrio sp.* (24) พบว่ามีปริมาณเอนไซม์สูง ในปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นสามารถผลิตโคตินได้ประมาณ 1000 กิโลกรัมต่อปี สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม (4) ในประเทศสหรัฐอเมริกาของเหลือทิ้งจากพวกครัสเตเชียน (crustacean) เป็นปัญหาใหญ่ที่ต้องแก้ไข เนื่องจากมีปริมาณเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้ *Serratia marcescens* Q.M.1466 (25) สำหรับประเทศไทยในแต่ละปีจะมีส่วนเหลือทิ้งพวกเปลือกกุ้ง เปลือกปู เป็นจำนวนมากจากโรงงานอุตสาหกรรมประเภทแปรรูปอาหารทะเล แต่มีปริมาณเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งในขณะนี้ได้มีกลุ่มนักวิจัยที่ตระหนักถึงคุณค่าของ เปลือกกุ้ง เปลือกปู ที่เป็นส่วนเหลือทิ้งนี้ เช่น มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร มหาวิทยาลัยมหิดล และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการสกัดโคตินจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และ ทำอนุพันธ์ของโคติน (chitin derivatives) ซึ่งมีราคาแพงมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ใช้ในการผลิตหรือเติมลงไป เพื่อปรับปรุงคุณภาพของอาหาร เนื่องจากโคตินสามารถใช้เป็นสาร stabilizer และ สารเพิ่มน้ำหนักให้กับอาหาร นอกจากนี้ โคตินที่อยู่ในรูปที่เรียกว่า Micro crystalline chitin จะมีคุณสมบัติดีกว่าพวก Micro crystalline cellulose ตรงที่ทนต่ออุณหภูมิฆ่าเชื้อ และการแช่แข็งสลับการหลอมละลายหลายครั้งได้ นอกจากนี้ โคโตแซนสามารถทำให้เกิดเป็นแผ่นฟิล์มได้ ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ในการใช้เคลือบผิวพืชเพื่อป้องกันเชื้อรา หรือ ใช้เคลือบไม้ผลเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานออกไป และ แผ่นฟิล์มดังกล่าวยังสามารถบริโภคได้อีกด้วย ประโยชน์ทางด้านอาหารยังมีอีก เช่น ใช้ MCC ใส่ในการทำขนมปังเพื่อเพิ่มปริมาตรของขนมปัง เพราะความสามารถในการจับน้ำได้ดี ใช้เป็นสารตกตะกอน ส่วนหนึ่งของการใช้ประโยชน์ในข้อนี้ก็คือ การแก้ไขปัญหาน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งรวมถึง การลดปริมาณ total solid และ การตกตะกอนโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ใหม่ นอกจากนี้ โคโตแซนยังใช้ในการทำน้ำดื่ม และ น้ำใช้ ให้บริสุทธิ์ ซึ่งสำนักงาน

ป้องกันสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาได้ให้การยอมรับแล้วขณะนี้ โคโตแซนยังใช้กำจัดสิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ไม่ต้องการบางอย่างจากน้ำดื่ม เช่น สารแขวนลอย และ กรดอินทรีย์บางประเภท สารโคโตนเป็นสารโพลีอิเล็กโทรไลต์ (Polyelectrolyte) ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ จากการค้นคว้าพบว่า สารนี้สามารถนำมาตกตะกอนโปรตีนจากน้ำทิ้งของโรงงานแปรรูปอาหารต่าง ๆ โดยลดปริมาณสารแขวนลอยได้ 70-98 เปอร์เซ็นต์ และแยกโปรตีนจากน้ำเสียได้ 13-68 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า หากใช้โคโตนร่วมกับการใช้ Cationic polymer หรือ พวกลีออนินทรีย์ เช่น อลูมิเนียมซัลเฟตจะยิ่งมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นอีก จุดเด่นของโคโตนเมื่อเปรียบเทียบกับสารตกตะกอนชนิดอื่น ๆ คือ โคโตนนั้นสามารถบริโภคได้ หากได้รับการยอมรับจากกองอาหาร และ ยาตกตะกอนของเหลือที่เราได้จากอุตสาหกรรม สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้อีกและนอกจากนี้ ยังมีการใช้โคโตนเพื่อสกัดกรดอินทรีย์หลายชนิดจากกาแฟ เช่น กรดคลอโรจีนิก กรดชิตริก กรดฟมาริก กรดมาลิก กรดไพรูวิก กรดวินิก และ กรดคาเฟอิก (26) จากการค้นคว้าวิจัยของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน พบว่าโคโตนสามารถใช้ในการแยกโลหะหนักบางตัวได้ เช่น ปรอท ตะกั่ว สังกะสี ทองแดง โครเมียม พลูโตเนียม ยูเรเนียม และ แคลเซียม (27,28) และยังสามารถแยก PCB (Polychlorinated biphenyls) ที่ปนเปื้อนในน้ำได้เช่นกัน (29) การใช้โคโตนในเทคโนโลยีพอลิเมอร์ ได้มีรายงานว่าสารโคโตนนี้ น่าจะถูกนำไป ทำเป็นสารตัวพา สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารต่าง ๆ หรือ สารเสริมสุขภาพต่าง ๆ เพื่อนำไป ผสมลงในอาหาร สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะ โคโตนสามารถเกิดเป็นร่างแห (matrix) และมีลักษณะเป็นเจล (ionotropic gel) ซึ่งสามารถหุ้มสารที่จะพาเอาไว้นั่งในได้ และ นอกจากนี้ โคโตนสามารถจะถูกย่อยสลายได้โดยไลโซไซม์ ซึ่งมีอยู่ในร่างกายของคนได้อีกด้วย (30) เนื่องจากโมเลกุลของโคโตนมีประจุบวกจึงได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของตะกอน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง โคโตน กับ สารโมเลกุลยาวที่มีประจุลบอื่น ๆ เช่น Sodium carboxymethylcellulose (31), heparin (32), acidic glyco-

saminoglycans (33), Polyacrylic acid (34) และ alginate (35)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาถึงคุณสมบัติของตะกอนดังกล่าวนี้ได้ว่า เป็นแนวทางในการพัฒนาสารโมเลกุล
 ยาวชนิดใหม่ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมหลายประเภทในอนาคต ปัจจุบัน
 การสกัด และ การทำอนุพันธ์ของไคติน (chitin derivatives) จากเปลือกกุ้ง
 เปลือกปู ส่วนแล้วแต่ใช้วิธีการทางเคมีทั้งสิ้น ส่วนวิธีทางจุลชีววิทยา (Microbiology)
 นั้นยังไม่ได้มีผู้ทำการศึกษา ดังนั้น งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมุ่งวิจัยในการเปลี่ยน (convert)
 ไคตินไปเป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ โดยวิธีทางจุลชีววิทยา เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีความรวดเร็ว
 กว่าวิธีทางเคมี ผลผลิตที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์ และไม่ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะแก่สภาพ
 แวดล้อมอันเนื่องมาจากกระบวนการผลิตอีกด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดที่ต้องการอากาศที่สามารถย่อยสลายไคตินได้
2. เปรียบเทียบ Chitinase activity เพื่อหาแบคทีเรียตัวที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายไคติน

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไคตินได้สูงสุดโดยการคัดแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติโดยตรง เช่น จากน้ำกร่อย ดิน บ่อกักน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อให้ได้ประโยชน์จากการนำสิ่งเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล ได้แก่ เปลือกกุ้ง เปลือกปู มาประยุกต์ใช้ได้มากขึ้น
2. เพื่อให้ได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยน (convert) ไคตินให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางขึ้น
3. เพื่อลดปัญหามลภาวะ และ ต้นทุนการผลิต ในการเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์ของไคตินด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้น้ำเอาแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาใช้แทน (Microbiological method)
4. เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการนำวิธีทางจุลชีววิทยามาประยุกต์ใช้เพื่อเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์ของไคตินต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างของไคตินและไคโตแซน

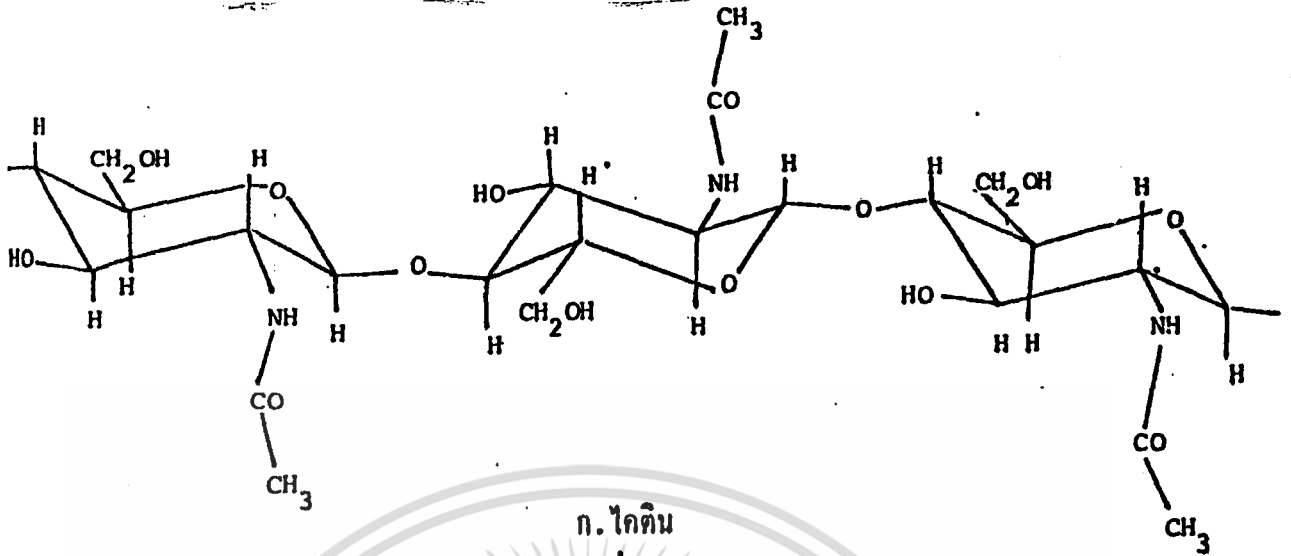
ไคตินประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ β -1,4 N-acetylglucosamine (NAG) ซึ่งไม่ละลายในสารอินทรีย์ แต่ละลายในกรดเข้มข้น ไคตินเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส ต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็น NH-CO-CH₃ แทนที่จะเป็นหมู่ OH เหมือนกับเซลลูโลส (ดังภาพที่ ๕)

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคติน ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของ Poly- β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucan ผลิตได้โดยการแยกหมู่ Acetyl (Deacetylation) ออกจากไคติน (ดังภาพที่ ๕)

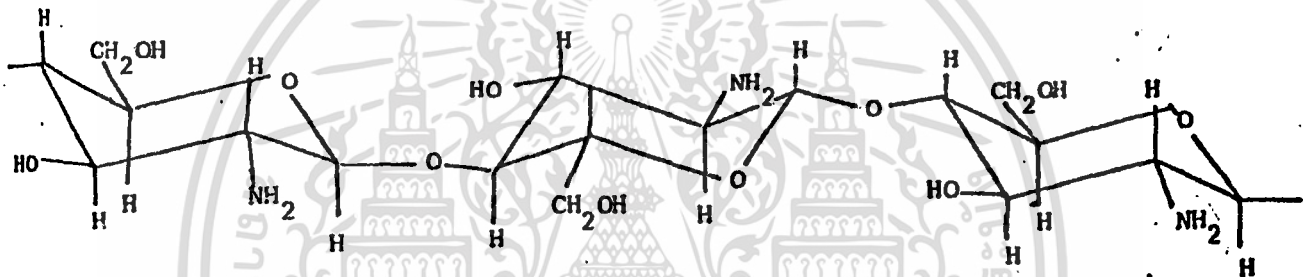
การเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์โดย จุลินทรีย์

การเปลี่ยนไคตินให้เป็นอนุพันธ์ของไคตินทำได้โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้าง Hydrolytic enzyme ได้แก่ CHITINASE (Chitinglycanohydrolase , EC 3.2.14) และ CHITOBIASE ได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ (ตารางที่ 1 ตารางที่ 2 และตารางที่ ๓) ที่รู้จักกันดี ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีนัส *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Myxobacter*, *Streptomyces* และ *Balillus*

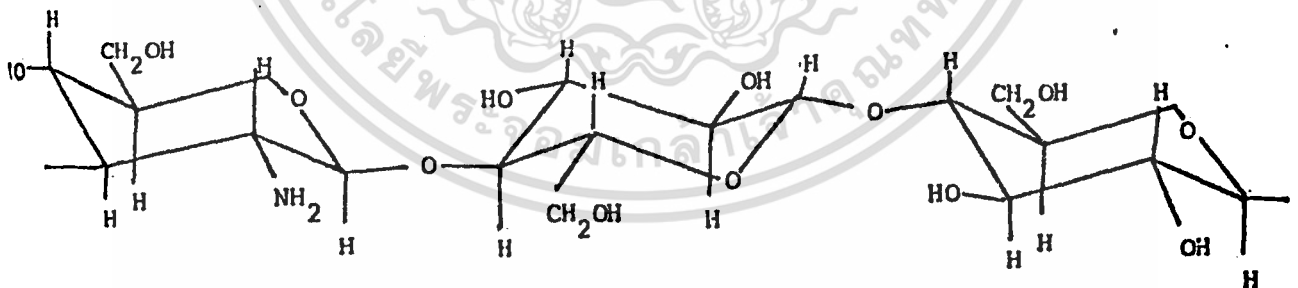
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก. ไคติน



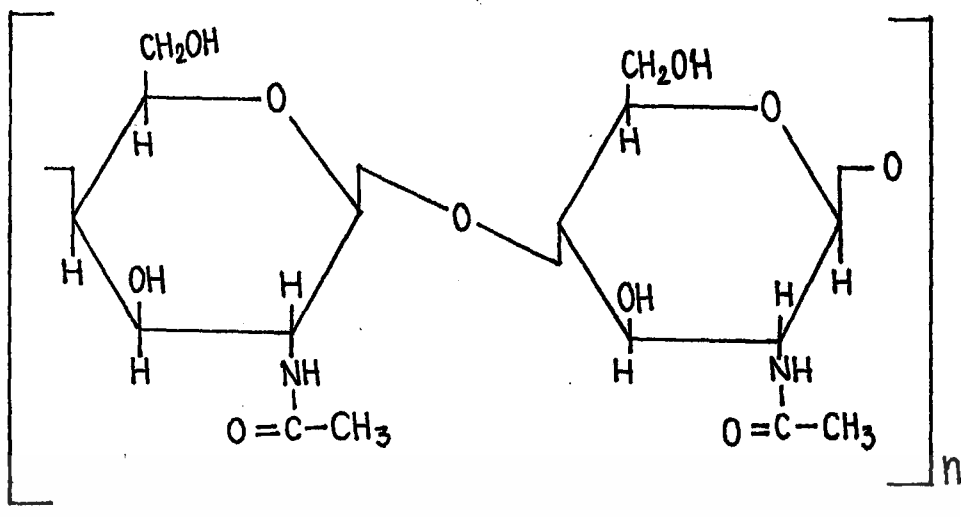
ข. ไคโตซาน



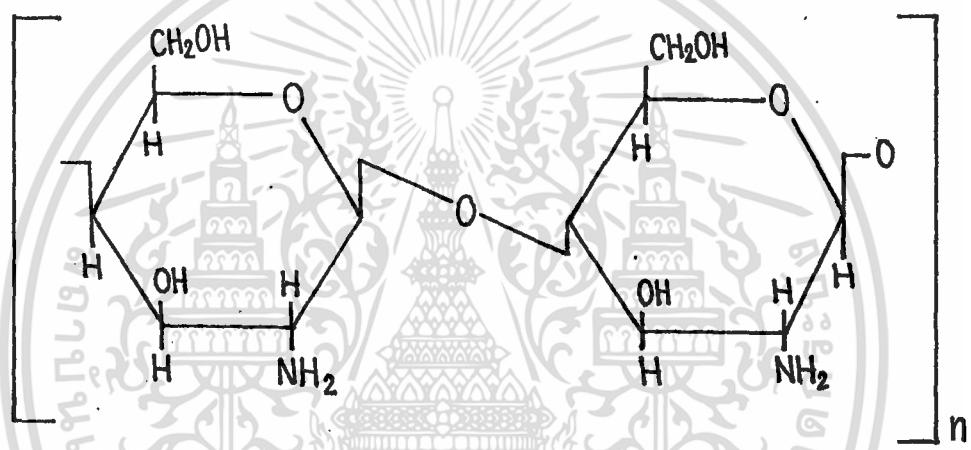
ค. เซลลูโลส

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของไคติน , ไคโตซาน และเซลลูโลส

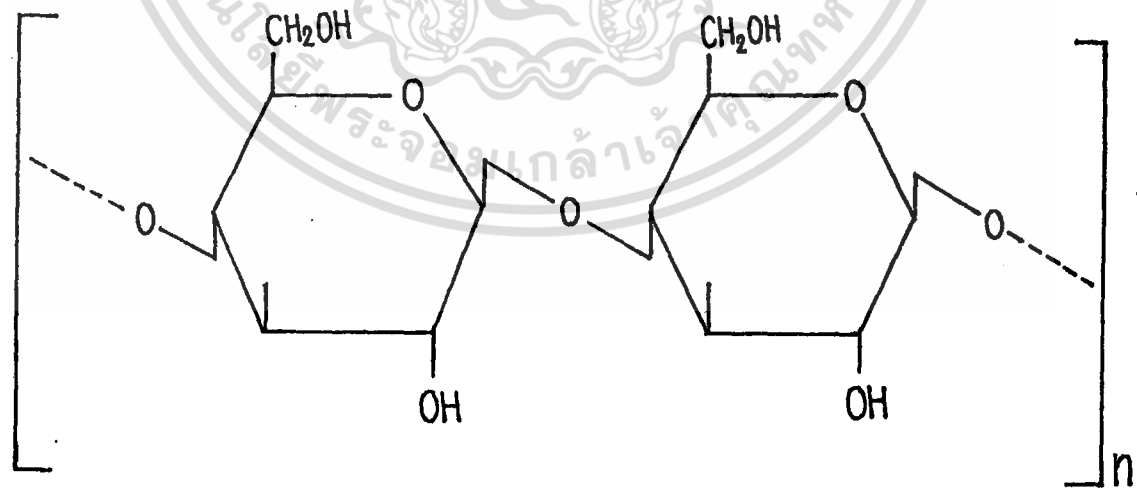
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



โครงสร้างทางเคมีของไคติน



โครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน



โครงสร้างของเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TABLE 1
Microorganisms Screened for Chitinolytic Activity

Strain	ATCC no.	Strain	ATCC no.
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	19606	<i>Erwinia carotovora</i>	459
<i>Aerococcus viridans</i>	11563	subsp. <i>carotovora</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7966	<i>Erwinia herbicola</i>	13329
<i>Aeromonas salmonicida</i>	14174	<i>Escherichia coli</i>	23513
<i>Aeromonas sobria</i>	9071	<i>Flavobacterium capsulatum</i>	14666
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	19358	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	13253
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	15834	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13882
<i>Agrobacterium rubi</i>	13335	<i>Lactobacillus casei</i>	393
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15955	<i>Micrococcus luteus</i>	4698
<i>Alcaligenes faecalis</i>	8750	<i>Micrococcus roseus</i>	418
<i>Arthrobacter globiformis</i>	8010	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	27029
<i>Azotobacter paspali</i>	23369	<i>Morganella morganii</i>	25330
<i>Azotobacter vinelandii</i>	12837	<i>Myxococcus xanthus</i>	25232
<i>Bacillus alvei</i>	6344	<i>Nocardia canicruria</i>	17396
<i>Bacillus brevis</i>	8264	<i>Nocardia cellulana</i>	12330
<i>Bacillus cereus</i>	14597	<i>Nocardia corollina</i>	1-347
<i>Bacillus chitinosporus</i>	19986	<i>Planococcus citreus</i>	1-104
<i>Bacillus circulans</i>	4513	<i>Plesiomonus shigelloides</i>	1-029
<i>Bacillus coagulans</i>	7050	<i>Proteus mirabilis</i>	15146
<i>Bacillus laterosporus</i>	64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145

<i>Bacillus licheniformis</i>	14580	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	13525
<i>Bacillus pumifaciens</i> ^a	13587	<i>Pseudomonas marginalis</i>	10844
<i>Bacillus</i> sp. ^b	AU 91B ^b	<i>Pseudomonas putida</i>	1263
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	10395	<i>Pseudomonas syringae</i>	
<i>Brevibacterium liquefaciens</i>	14929	p.v. <i>glycinea</i>	8727
<i>Candida albicans</i>	10231	<i>Rhizobium leguminosarium</i>	14479
<i>Caryophanon laevis</i>	15219	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7754
<i>Caulobacter vibroides</i>	15265	<i>Salmonella enteritidis</i>	13076
<i>Citrobacter freundii</i>	29221	<i>Serratia marcescens</i>	13880
<i>Clavibacter michiganense</i> ^c	4450	<i>Staphylococcus aureus</i>	14035
<i>Clostridium botulinum</i>	9564	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Clostridium perfringens</i>	3624	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15305
<i>Clostridium sporogenes</i>	3584	<i>Vibrio alginolyticus</i>	17749
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	8028	<i>Vibrio cholerae</i>	14035
<i>Corynebacterium haemolyticum</i>	9345	<i>Vibrio metschnikovii</i>	7708
<i>Corynebacterium poinsettiae</i>	9070	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802
<i>Edwardsiella tarda</i>	15469	<i>Xanthomonas campestris</i>	9563
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<i>Yersinia enterocolitica</i>	27729
<i>Hansenula anomala</i>	16763	<i>Zymomonas mobilis</i>	10988
		subsp. <i>mobilis</i>	

^a*Bacillus pumifaciens* sp. Nov., nom. rev. proposed.¹²

^bSoil isolate.

^cFormerly *Corynebacterium michiganense*.²⁷

TABLE 2
Chitinolytic Activity of Bacterial Species

Strain	ATCC no.	Clear zone-colony size ratio
Aeromonas:		
<i>A. hydrophila</i>	7966	1-23
<i>A. salmonicida</i>	14174	1-46
<i>A. sobria</i>	9071	1-50
Agrobacterium:		
<i>A. radiobacter</i>	19358	0-50
Bacillus:		
<i>B. alvei</i>	6344	2-20
<i>B. brevis</i>	8264	1-80
<i>B. chitinosporus</i>	19986	2-50
<i>B. laterosporus</i>	64	1-50
<i>B. licheniformis</i>	14580	1-00
<i>B. pulvifaciens</i>	13537	2-15
Clostridium:		
<i>C. boulimum</i>	9564	1-14
<i>C. sporogenes</i>	3584	1-23
Micrococcus:		
<i>M. roseus</i>	418	1-59
Micromonospora:		
<i>M. aurantiaca</i>	27029	0-78
Myxococcus:		
<i>M. xanthus</i>	25232	0-38
Plesiomonas:		
<i>P. shigelloides</i>	14029	1-23
Pseudomonas:		
<i>P. aeruginosa</i>	10145	0-44
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	8727	0-50
Serratia:		
<i>S. marcescens</i>	13880	1-61
Vibrio:		
<i>V. alginolyticus</i>	17749	1-34
<i>V. cholerae</i>	14035	1-30
<i>V. metschnikovii</i>	7708	0-50
<i>V. parahaemolyticus</i>	17802	1-20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TABLE 3
Conversion of Chitin to Reducing Sugar by Bacteria

Strain	Reducing sugar (mg ml ⁻¹) incubation (days)				
	2	4	6	8	10
<i>A. hydrophila</i>	0.27	0.45	0.87	1.76	1.35
<i>A. salmonicida</i>	0.19	0.44	0.74	0.90	1.00
<i>A. sobria</i>	0.80	0.48	0.98	1.29	1.41
<i>B. alvei</i>	0.22	0.41	0.57	1.19	1.29
<i>B. brevis</i>	0.27	0.31	0.71	1.11	0.98
<i>B. chitinosporus</i>	0.43	0.52	0.19	0.28	0.28
<i>B. laterosporus</i>	0.00	0.21	0.36	0.61	0.82
<i>B. licheniformis</i>	0.25	0.48	0.49	0.71	0.86
<i>B. pulvifaciens</i>	0.25	0.25	3.50	2.90	1.96
<i>M. aurantiaca</i>	0.00	0.02	0.05	0.04	0.02
<i>M. roseus</i>	0.00	0.08	0.06	0.06	0.05
<i>S. marcescens</i>	0.02	0.05	0.60	0.90	1.21
<i>V. cholerae</i>	0.45	0.87	0.99	1.12	1.26
<i>V. metschnikovii</i>	0.20	0.51	0.65	0.71	0.84
<i>V. parahaemolyticus</i>	0.34	0.79	0.80	1.01	1.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งโดยวิธีทางเคมี

ไคตินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ N-acetyl D-glucosamine ที่เชื่อมต่อกันเป็นพอลิเมอร์ คุณสมบัติที่น่าสนใจคือการนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์โดยสามารถปั่นเป็นเส้น เพื่อใช้เย็บแผลได้ดีกว่าเส้นใยสังเคราะห์ เพราะสามารถผูกเป็นปมได้ง่าย แผลหายเร็ว สลายตัวเมื่อแผลติดกัน และคนไข้ไม่เกิดอาการแพ้ในทางการแพทย์ ไคตินสามารถนำไปใช้ปรับปรุงดิน เพื่อให้มีคุณภาพดีขึ้นเหมาะแก่การเพาะปลูก นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในทางเภสัชกรรม สิ่งทอ สีย้อม กาว เป็นต้น

ไคตินเป็นอินทรีย์สารที่เกิดตามธรรมชาติ มีอยู่ในส่วนประกอบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่นผนังเซลล์ของเชื้อรา เปลือกและกระดองสัตว์พวก crustacean ปริมาณผลผลิตทั่วโลกของสารประเภทไคตินมีเป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 4) ไคตินที่พบจะปะปนอยู่กับอินทรีย์สาร และ เกลือแร่ต่างๆ เช่นในเปลือกกุ้ง กระดองปู โดยจะปะปนอยู่กับ แคลเซียมคาร์บอเนต โปรตีน ไขมัน เม็ดสี เป็นต้น ไคตินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นวิธีแยกไคตินออกจากสารที่ปะปนอยู่ ต้องใช้วิธีเฉพาะสกัดแยกออกมา ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูง โดยทั่วไป มักนิยมทำลายสารที่ปะปนอยู่ให้หมดไป และ คงเหลือไว้แต่ไคติน

สำหรับการผลิตในขั้นอุตสาหกรรม นิยมใช้กรดซัลฟูริกไปย่อยสลาย แคลเซียมคาร์บอเนตให้หมดไป ซึ่งกรดที่ใช้แล้วยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (recycle) จึงทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง แต่กรรมวิธีนี้ต้องควบคุมปริมาณกรดซัลฟูริก ต่อเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต ให้มีอัตราส่วนจำนวนโมเลกุลไม่ต่ำกว่า 2:1 เพื่อป้องกันการเกิดแคลเซียมซัลไฟต์ ซึ่งเป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำ และ อาจปะปนไปกับไคตินได้ กระบวนการจัดว่าเป็นกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน และ ใช้เงินลงทุนสูง จุดคุ้มทุนต้องเป็นการดำเนินการธุรกิจอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมาก ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในการเก็บรวบรวม เนื่องจาก เปลือกกุ้ง กระดองปู เสื่อมสลายง่ายเมื่อมีความชื้นสูง การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ อาจทำได้โดยเก็บรักษาไว้ใน สารละลายลิเทียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ปริมาณผลผลิตทั่วโลกของสารประเภทโคติน (Allen et. al. 1978.)

แหล่ง	ปริมาณ ที่จับได้	ปริมาณ ของเกลือ	นน.โคติน (นน.สด)	ปริมาณ ของแข็ง	นน.แห้ง
หอย	1,700	50-60	468	30-35	154
กุ้งเคย	18,200	40	3,640	22	801
หอย shellfish	1,390	65-85	521	90-95	482
ปลาหมึก	660	20-40	99	21	21
เชื้อรา	790	100	790	20-26	182
แมลง	น้อยมาก	-	-	21-26	-

หอย shellfish นี้ รวมพวกปู , กุ้งนาง , กุ้งก้ามกราม lobster และ crayfish
เชื้อราที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ผลผลิตได้จากการผลิตยาปฏิชีวนะ และกรดอินทรีย์

(lithium chloride) หรือไดเมทิล อะเซทาไมด์ (dimethyl acetamide)
 หรือไมเช่นนั้นก็ควรรักษาโครงสร้างของโคตินไว้ด้วยการต้ม หรือชะล้างด้วยน้ำยากันหิน
 แล้วนำไปตากแห้ง ซึ่งนอกจาก จะรักษาคุณภาพไว้แล้ว ยังทำให้มีน้ำหนักเบา และ
 สะดวกแก่การขนส่งไปไกลโรงงานทำกึ่งบรรจุกระป๋อง เนื่องจากนั้น โรงงานเหล่านี้มี
 เปลือกกึ่งเหลือทิ้งจำนวนมาก คักยภาพการผลิตโคตินของไทยจึงอยู่ในขั้นน่าสนใจ
 เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างสนับสนุนการผลิต เช่น โรงงานผลิตเอทานอล โซเดียม-
 ไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก เป็นต้น รวมไปถึงการมีวัตถุดิบอยู่มาก
 พอสมควร แต่อุปสรรคสำคัญของการผลิตน่าจะเนื่องมาจากตลาดการจำหน่ายยังแคบอยู่
 สาเหตุเพราะขาดการคิดค้นที่จะนำเอาโคตินไปใช้ประโยชน์ในงานต่าง ๆ ซึ่งสืบเนื่อง
 มาจากโคตินมีราคาแพง ไม่เอื้ออำนวยต่อการนำมาศึกษาทดลอง

กรรมวิธีการผลิตโคตินจาก เปลือกกึ่งในระดับห้องปฏิบัติการมีดังนี้ (WO 85/00109
 International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT)
 84/01011)

1. นำแกลบกึ่งซึ่งเป็น เปลือกกึ่งที่บดเป็นผงมาละลายในคลอโรฟอร์มด้วยกรด
 ไฮโดรคลอริกเจือจาง
2. นำแกลบกึ่งที่ย่อยสลายคลอโรฟอร์มแล้ว มาละลายในโปรตีน ด้วยการต้ม
 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 30 นาทีเหลือโคติน
 ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลาย
3. เทกรดซัลฟูริกเข้มข้นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างช้า ๆ ในปริมาณ
 น้อย ๆ เพื่อละลายโคตินที่แขวนลอยอยู่ในน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส โคตินจะค่อย ๆ
 ตกออก และ กลายเป็นของเหลวหนืดเหนียว
4. เติมโคตินเหลวลงในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ที่
 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กวนตลอดเวลา โคตินจะจับตัวเป็นก้อน (precipitated)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำของผสมไคตินและเอทานอล เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยก เอทานอลออก แล้วล้างด้วยน้ำให้หมดกรดหลาย ๆ ครั้ง จนสามารถวัดค่าความเป็น กรด-ด่างได้เท่ากับ 5

6. นำไคตินไประเหยแห้งที่อุณหภูมิต่ำ (freeze dried)

จากกระบวนการผลิตในขั้นต้นดังกล่าว มีข้อที่ควรศึกษาและตัดแปลงดังนี้ (WO 85/00109 International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty 84/01011)

ในขั้นตอนที่ 1 การใช้กรดเกลือเจือจางทำลายแคลเซียม ศึกษาหาความเข้มข้นของกรด เวลาที่แช่กรด และ อัตราส่วนน้ำหนักกลับต่อปริมาตรกากที่เหมาะสม เพื่อที่จะย่อยสลายแคลเซียมให้หมดไปจากกากกึ่ง เพราะถ้ามี แคลเซียมเหลืออยู่จะเป็นเหตุให้ได้ไคตินที่ไม่บริสุทธิ์ ปริมาณผลผลิตต่ำ

ในขั้นตอนที่ 3 การปรับไคติน ให้มีขนาดโมเลกุลเหมาะสมสำหรับ chitin-specific-enzyme ซึ่งทำได้โดยการเติมกรดที่มีคุณสมบัติเป็น multiter forming เช่น กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริกลงไปละลายไคติน โดยต้องควบคุมปฏิกิริยาให้เหมาะสมเพื่อทำให้ chitin fibril แยกตัวเป็น cross-link ในจำนวนที่เพียงพอ จึงจะทำให้โครงสร้างของ chitin fiber อยู่ในสถานะเสถียรและดำรงอยู่ ตราบเท่าที่ไคตินที่เสถียรนั้นไม่เกิดการย่อยพันธะเอสเทอร์ซึ่งจะต้องคำนึงถึง

ก. ความเข้มข้นกรดให้อยู่ในช่วงร้อยละ 25-90 โดยปริมาตร

ข. เวลาที่ใช้แช่ไคตินในกรดประมาณ 3-48 ชั่วโมง

ค. อุณหภูมิในหม้อปฏิกิริยาที่เป็นแก้วทนความร้อนสูง (reactor) ไม่ควรให้มีการเปลี่ยนแปลงเกินกว่า 2 องศาเซลเซียส

เนื่องจากการหยดกรดเข้มข้นลงไปละลายไคตินที่แขวนลอยในน้ำจะมีความร้อนเกิดขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างกรดกับน้ำถ้าแก้ไขตัดแปลงโดย เตรียมกรดที่มี

ความเข้มข้นระดับหนึ่ง แช่เย็นแล้วหยดลงละลายไคตินความรุนแรงของปฏิกิริยาจะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ระดับหนึ่งทำให้สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ดีขึ้น

ในขั้นตอนที่ 4 เติมเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 ลงในโคตินเหลว เพื่อทำให้โคตินรวมตัวเป็นก้อนวันแยกออกมา ถ้าจะแก้ไขตัดแปลงโดยใช้เอธานอล ร้อยละ 95 แทน จะทำให้ปริมาตรรวมทั้งหมดลดลงมีผลทำให้เสียค่าใช้จ่ายน้อยเมื่อกลับ เอธานอลกลับมาใช้ใหม่

ในขั้นตอนที่ 5 ใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แยกก้อนโคติน ออกมาทำให้เสียค่าพลังงานเพิ่มขึ้นจำนวนหนึ่งแต่เนื่องจากก้อนโคตินแยกออกได้ค่อนข้าง ง่าย ถ้านำมารองแยกจะสามารถประหยัดพลังงานลงได้

ในขั้นตอนที่ 6 การทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (freeze dry) เป็นวิธีที่ เสียค่าใช้จ่ายสูงเหมาะสำหรับทำกับผลิตภัณฑ์บางชนิดเท่านั้น สำหรับโคตินการเลือก ทำแห้งภายใต้สุญญากาศก็น่าจะเพียงพอแล้ว

กล่าวโดยสรุปกรรมวิธีนี้สามารถผลิตโคตินจากเปลือกกึ่งได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และมีจุดเด่นคือเป็นกรรมวิธีที่ลดความรุนแรงของปฏิกิริยาความร้อนอันเนื่องจากการตกน้ำ น้อยลง ดังนั้นควรเลือกการละลายโคตินด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 70 หรือใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงละลายโคตินที่แขวนลอยในกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 50

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดต้องการอากาศที่สามารถย่อยสลายไคตินได้ มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

แหล่งที่คาดว่าจะพบ chitinolytic bacteria ได้แก่ บริเวณที่เป็นแหล่ง น้ำกร่อยหรือบริเวณที่มีเศษเปลือกกุ้ง เปลือกปู หอย เป็นต้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะใช้ไคตินซึ่งพบในเปลือกกุ้ง ปู เป็นวัตถุดิบในการเจริญ ดังนั้นและแหล่งที่ทำการสำรวจ จึงมีดังนี้

1. ทำน้ำ สมุทรปราการ (น้ำกร่อย)
2. ทางไปบางปู (น้ำจืด)
3. ทำน้ำบางปู (น้ำกร่อย)
4. กองขยะซอยอ่อนนุช
5. ฟาร์มไก่ รามอินทรา
6. ฟาร์มวัว รามอินทรา
7. ดินที่เพาะเลี้ยงต้นไม้ ใกล้ตอกกล้วย จ.นครปฐม
8. ดินที่เพาะเลี้ยงต้นไม้ ใกล้ตอกไม้ จ.นครปฐม
9. ดินท้องนาที่มีฟางมาก อ.ลาดหลุมแก้ว
10. ดินท้องนาที่มีฟางสุ่ม อ.ลาดหลุมแก้ว
11. ดินท้องนาที่มีการเลี้ยงเป็ด อ.บางเลน
12. ดินท้องนาบริเวณเลี้ยงเป็ดใกล้บ่อน้ำ อ.บางเลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. ดินไก่แห้งแหล่งน้ำที่มีเปลือกหอย (ร่องสวน) จ.นครปฐม

14. บ่อกำจัดน้ำเสียของบริษัท ซีพี ผลิตภัณฑ์อาหาร มินบุรี

2. การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งสำรวจต่าง ๆ จำนวน 14 แหล่งมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคตินได้ ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

1. ปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์จากแต่ละแหล่งตัวอย่างที่ส่งมาโดยในกรณีตัวอย่างเป็นของเหลวจะทำการปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงใน Nutrient broth 5 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ไม่ต้องปิดจุกหลอดแน่นแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน กรณีตัวอย่างเป็นของแข็งให้ใช้ตัวอย่าง 1 กรัม และทำการปรับสภาพโดยวิธีเดียวกัน
2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ครั้งนี้จะใช้ Nutrient broth 5 มิลลิลิตร ที่เติม Ball mill chitin 0.5 มิลลิลิตร
3. ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดของเหลวจากข้อ 1,2 มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย Nutrient broth 5 มิลลิลิตร และ Ball mill chitin 3 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลระดับของไคตินทุกวัน หากพบว่าหลอดใดมีระดับของไคตินลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (control tube)ให้นำมาทดลองต่อในข้อ 4
4. ทำการแยกเชื้อโดยวิธี streak plate ลงบน Nutrient agar นำเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน
5. นำเชื้อที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว (จากข้อ 4) มาทดสอบความสามารถในการใช้ไคตินบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Nutrient broth 5 มิลลิลิตร Ball mill chitin 3 มิลลิลิตร นำเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. ตรวจวัดระดับของไคตินทุกวันเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม(control tube) ประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อได้หลอดที่มีระดับไคตินลดลงแล้วให้นำไปใช้ทดลองต่อในข้อ 7

7. จากข้อ 6 นำเชื้อมาทำการ streak plate ลงบน Nutrient agar นำเข้าตู้หมอดหมู 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ไปทดสอบต่อ เช่นเดียวกับข้อ 6 ทำซ้ำเช่นนี้ประมาณ 2-3 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่คัดแยกได้บริสุทธิ์จริง ๆ

การตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย (chitinase assay)

1. นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย Nutrient broth 7 มิลลิลิตร และ Ball mill chitin 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ที่มีพื้นที่หน้าตัดน้อยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำเข้าตู้หมอดหมู 37 องศาเซลเซียส
2. ทำการวัดระดับของไคตินทุกวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ทำให้ระดับของไคตินลดลงมากที่สุด

(ดูภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายโคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อโคติโนไลติกแบคทีเรีย (chitinolytic bacteria)

จากแหล่งธรรมชาติ

จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่าง ๆ 14 แห่ง นำมาแยกเชื้อ Chitinolytic bacteria ออกจากตัวอย่างโดยใช้อาหาร Nutrient broth ที่มี Ball mill chitin ผสมอยู่ด้วย โดยทำการวัดระดับของโคตินเริ่มต้นไว้ด้วย หากตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีเชื้อจุลินทรีย์จำพวก Chitinolytic bacteria อยู่ ระดับของโคตินจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปโดยจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับหลอดควบคุม (control tube) ดังแสดงในภาพที่ 2 เพราะว่ามีเอนไซม์โคติเนส (chitinase) มาย่อยโคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จากการทดลองแยกเชื้อจากตัวอย่างทั้ง 14 แห่งพบว่าตัวอย่างที่มี chitinolytic bacteria ซึ่งทำให้ระดับของโคตินลดลงอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ ตัวอย่างจากแหล่งสำรวจที่ 1, 2 และ 3 ได้แก่ บริเวณทำน้ำสมุทรปราการ (น้ำกร่อย), ทางไปบางปู (น้ำจืด) และ ทำน้ำบางปู ตามลำดับ พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ 21 สายพันธุ์ ที่สามารถย่อยสลายโคตินได้ (ตารางที่ 5) และนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ของ Chitinolytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายโคติน

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนและแหล่งสำรวจที่พบ Chitinolytic bacteria

แหล่งสำรวจ	จำนวนแบคทีเรีย
1. ทำน้ำ สมุทรปราการ (น้ำกร่อย)	11
2. ทางไปบางปู (น้ำจืด)	6
3. ทำน้ำบางปู (น้ำกร่อย)	4
4. กองขยะซอยอ่อนนุช	—
5. ฟาร์มไก่ रामอินทรา	—
6. ฟาร์มวัว रामอินทรา	—
7. ดินที่เพาะเลี้ยงต้นไม้ ไกล่ตอกกล้วย จ.นครปฐม	—
8. ดินที่เพาะเลี้ยงต้นไม้ ไกล่ตอไม้ จ.นครปฐม	—
9. ดินท้องนาที่มีฟางมาก อ.ลาดหลุมแก้ว	—
10. ดินท้องนาที่มีฟางสุ่ม อ.ลาดหลุมแก้ว	—
11. ดินท้องนาที่มีการเลี้ยงเป็ด อ.บางเลน	—
12. ดินท้องนาบริเวณเลี้ยงเป็ดใกล้บ่อน้ำ อ.บางเลน	—
13. ดินใกล้แหล่งน้ำที่มีเปลือกหอย (ร่องสวน) จ.นครปฐม	—
14. บ่อกำจัดน้ำเสียของบริษัท ซีนิ ผลิตภัณฑ์อาหาร มินบุรี	—

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

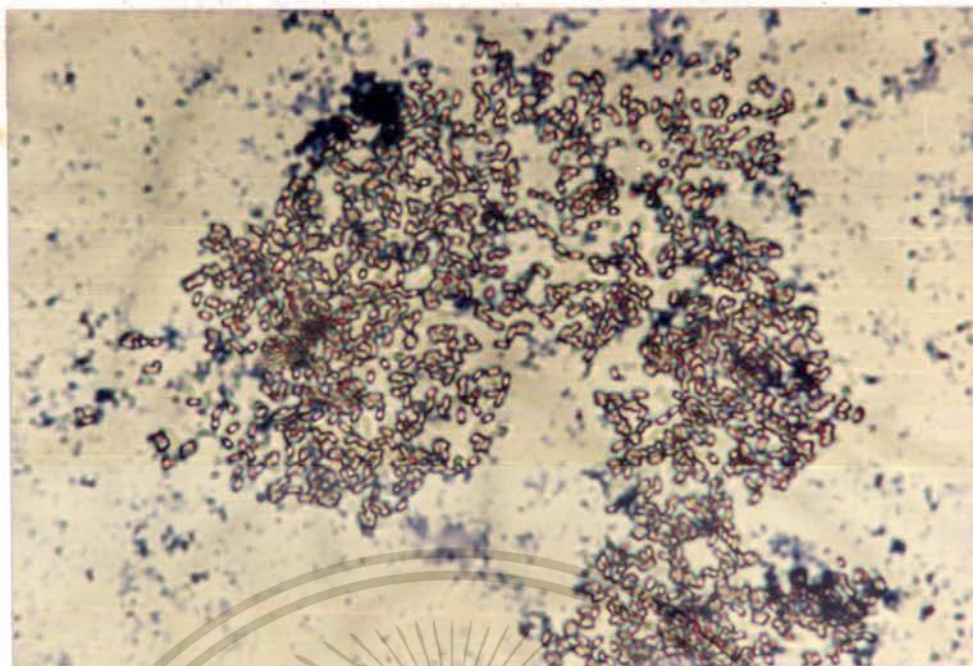
2. การตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย

สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไคตินโดยใช้วิธีวัดระดับที่ลดลงของไคตินในเวลา 1 สัปดาห์สามารถใช้ไคตินได้ 4.5 มิลลิกรัม ในเวลา 1 สัปดาห์ เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมลบ สร้างสปอร์ได้ (ดังภาพที่ 3)

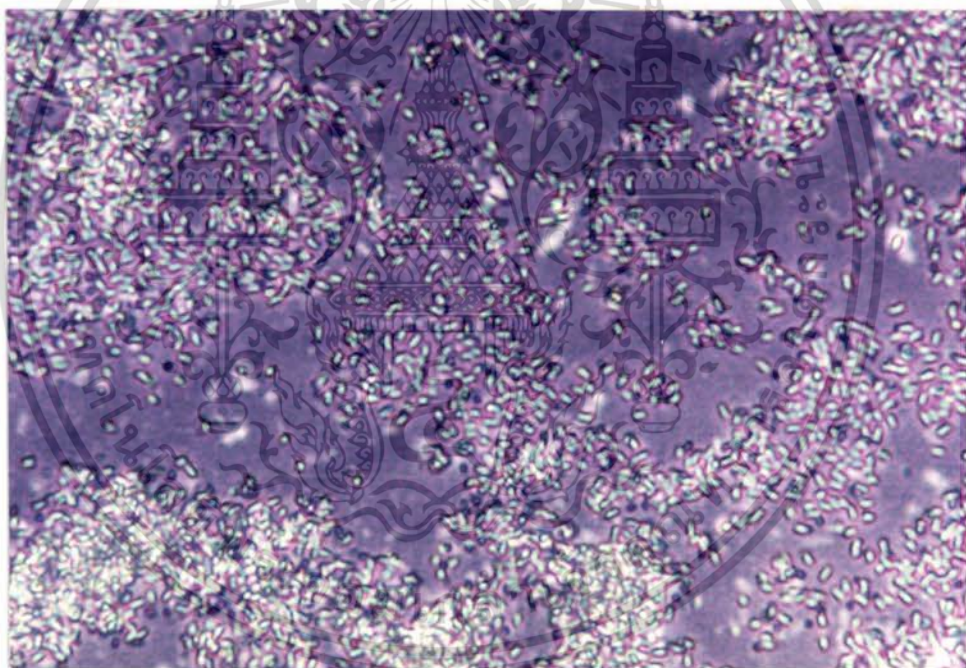
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดต้องการอากาศกลุ่มที่สามารถย่อยสลายไคตินได้จากแหล่งสำรวจจำนวน 14 แหล่ง สามารถแยกเชื้อจำนวนนี้ออกมาได้จำนวน 21 ชนิดจากแหล่งสำรวจแหล่งที่ 1, 2 และ 3 ได้แก่ ทำน้ำสมุทรปราการ (น้ำกร่อย), ทางไปทางปู (น้ำจืด) และทำน้ำทางปู (น้ำกร่อย) ตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเชื้อ (Chitinase assay) เหล่านี้พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไคตินมาจากแหล่งสำรวจที่ 1 มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมลบ สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสามารถใช้ไคติน 4.5 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นส่วนผสมในอาหารเหลว Nutrient broth ได้หมดในเวลา 1 สัปดาห์

การตรวจวัดประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายไคติน (chitinase assay) ที่นำมาใช้ในการทำปัญหาพิเศษนี้เป็นวิธีการอย่างคร่าว ๆ ซึ่งเกิดความคิดพลาดได้ สำหรับวิธีที่ละเอียดและเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางได้แก่ The conventional standard agar plate method



(a)



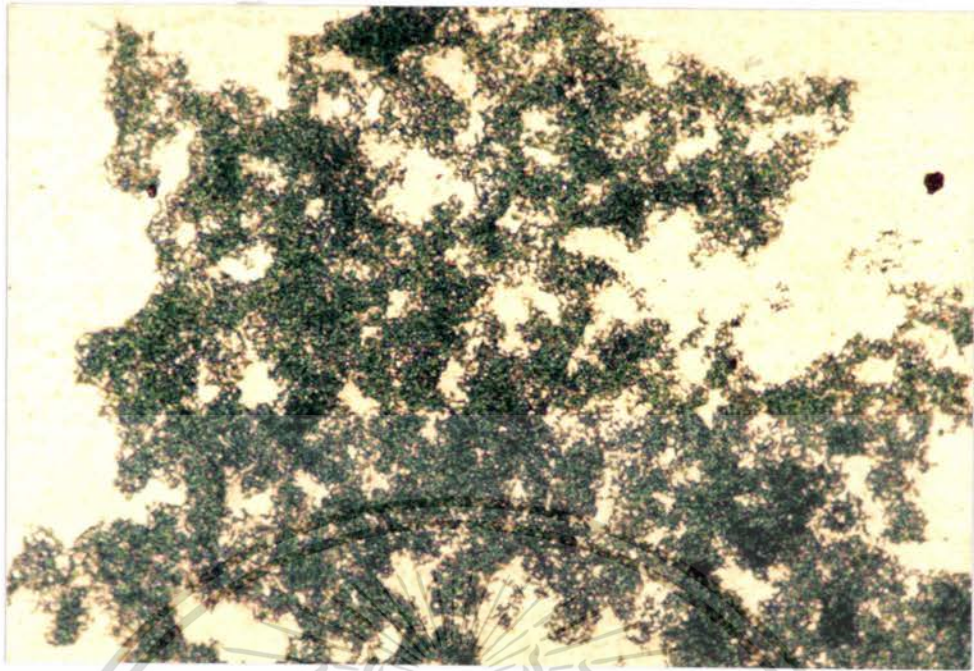
(b)

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของแบคทีเรียเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x

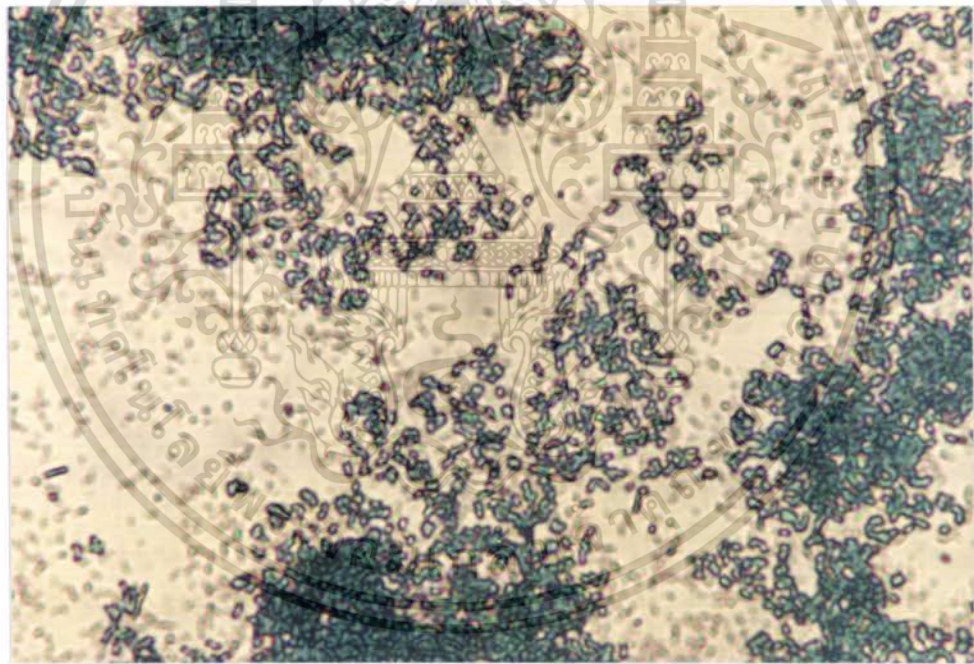
(a) ย้อมสีแบบ gram stain

(b) ย้อมสีแบบ negative stain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(c)



(d)

(c) การย้อมสีสปอร์ กำลังขยาย 10x

(d) การย้อมสีสปอร์ กำลังขยาย 40x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. NB (Nutrient broth)

Bacto-Beef extract 3.0 ๑.

Bacto-Peptone 5.0 ๑.

H₂O 1000.0 ๑.

Yeast extract 5.0 ๑.

2. BH-CHA (Bushnell Haas-chitin Agar)

Bacto Bushnell Haas Agar base 3.25 ๑.

(Difco, Detroit, Michigan)

Glucose 1.0 ๑.

Yeast extract (Difco) 0.5 ๑.

Swollen chitin 10.0 ๑.

น้ำกลั่น 1000.0 มล.

ปรับ พีเอช เป็น 6.8-7.2 ینگฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 lb

Psi นาน 20 นาที

ภาคผนวก ข.

สารเคมี

สีที่ใช้ย้อมเซล

1. Crystal violet

สารละลาย ก.

Crystal violet 8.0 ๕.

95% ethanol 20.0 ml.

สารละลาย ข.

Ammonium oxalate 0.8 ๕.

น้ำกลั่น 80.0 มล.

ผสมสารละลาย ก. และ ข. เก็บไว้ 24 ชม. ก่อนนำมาใช้กรองผ่านกระดาษกรองลง

ขวดสีชา

2. Iodine (Gram's)

ไอโอดีน 1.0 ๕.

โพแทสเซียมไอโอไดด์ 2.0 ๕.

น้ำกลั่น 300.0 ml.

3. Saffranine O

Saffranine O 0.25 ๕.

95% ethanol 10.0 ml.

น้ำกลั่น 90.0 ml.

เตรียมสารละลาย Saffranine O ในเอทานอล 2.5 % แล้วเติมน้ำ

ภาคผนวก ค.

วิธีตรวจวัดประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายไคติน

The conventional standard agar plate method

นำ กล้าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 3×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในแต่ละสายพันธุ์ ไปเลี้ยงไว้ตรงกลางของ dry BH-CHA plate (ภาคผนวก ก) และทิ้งไว้ 20-30 นาที หรือ จนกล้าเชื้อ กระจายไปทั่วอาหาร หลังจากนั้นนำ BH-CHA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หรือ ที่อุณหภูมิพอเหมาะต่อการเจริญของเชื้อทดสอบนั้น เป็นเวลา 2 วัน ซึ่งจะเป็ระยะพักตัวหลังจากนั้นอีก 10 วัน ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและเคลียร์โซน (clear zone) และคำนวณหา CZ/CS และใช้ค่านี้มาเปรียบเทียบหา Chitinase hydrolysis Determination of reducing sugar หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) จาก culture filtrates of Bushnell Hasa broth (BH-CHB) โดยใช้ The colorimetric method of Reissig et al ใช้ 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) และเทียบความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (standard curve for NAG)

การทำการมาตรฐานโดยวิธี Nelson-somojyi

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน : ละลาย 1 กรัมของสารละลายกลูโคสใน
น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนการทำเริ่มโดย นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสมาทำให้มีความ
เข้มข้น 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตูตแต่ละ
ความเข้มข้นมาใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มล. เติม somojyi reagent 1 มล.
นำหลอดที่ผสมสารเรียบร้อยแล้วมาต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที หลังจากนั้นนำออกมา
ทำให้เย็น เติม Nelson reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มล.
ผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรทำ
แปลงค์ เพื่อตั้งค่า 0 นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่อ่าน
ได้กับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

การทำกราฟมาตรฐานโดยวิธี 3,5 dinitrosalicyric acid

เตรียมสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มก./ลบ.ซม

วิธีทำ

1. ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม, 0.06 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล. ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ได้จะเป็น 1.0 และ 0.06 มก./ลบ.ซม.
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.08 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล. ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ได้จะเป็น 0.8 มก./ลบ.ซม.
3. นำสารละลายกลูโคสจากข้อ 2 มาเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเป็น 0.4 มก./ลบ.ซม.
4. นำสารละลายกลูโคสในข้อ 3 มาทำเจือจางในอัตราส่วน 1:1 จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเป็น 0.2 มก./ลบ.ซม.
5. ใส่สารละลายกลูโคสที่เตรียมได้ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มล. ทำการทดลองดังนี้
 - ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มล. ลงในหลอดแก้วขนาด 30 มล.
 - ตูดสารละลาย DNS 2 มล. ลงไปในหลอดแก้วเดียวกัน
 - นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
 - นำไปแช่ในน้ำเย็น 5 นาที
 - เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดแก้วนี้ 20 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย mixer นำไปวัด absorbance ที่ 510 nm. แล้วอ่านค่า OD
 - Blank ทำเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนสารละลายตัวอย่าง โดย Blank นี้ใช้สำหรับปรับเครื่อง Spectronic 21 ให้ได้ % transmittance เป็น 100 (OD=0)
 - เมื่อได้ค่า OD แล้วนำไปหาค่าน้ำตาลกลูโคสเพื่อเทียบกับ Standard

glucose curve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายมาตรฐาน

1. Somojyl reagent

1.1 Copper reagent A

NaCO_3 (anhydrous) 25 กรัม.

Sodium Potassium tartrate 25 กรัม.

NaHCO_3 20 กรัม.

Na_2SO_4 200 กรัม.

น้ำกลั่น 1000 ml.

1.2 Copper reagent B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 15 % ประกอบด้วย 1 หรือ 2 หยดของ

Conc. H_2SO_4 ต่อ 100 มล.

2. Nelson's reagent (Arsenmolybdate color reagent)

Ammonium molybdate 25 กรัม.

Conc. H_2SO_4 21 ml.

$\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม.

วิธีเตรียม

1. ละลาย Ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มล. แล้วเติม

กรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มล. ผสมให้เข้ากัน

2. เติม $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ที่ละลายในน้ำ 25 มล. ผสมให้เข้ากัน

3. นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-28 ชม.

(reagent นี้ควรเก็บไว้ในขวดแก้วสีชา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

3. สารละลาย DNS

3,5 dinitrosalicylic acid 20 ฐ.

NaOH 32 ฐ.

Sodium-Potassium tartrate 600 ฐ.

น้ำกลั่น 2 l.

วิธีเตรียมสารละลาย DNS

1. ชั่ง DNS 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล.
2. เติมสารละลาย NaOH (NaOH 32 กรัมในน้ำกลั่น 300 มล.) ลงไปที่ลชน้อย คนให้เข้ากัน
3. นำไปอังบนอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส
4. เติม KNa-tartrate 600 ฐ. ลงไปที่ลชน้อยจนหมด
5. เติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 2000 มล. ผสมให้เข้ากัน
(reagent นี้ควรเก็บไว้ในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง)

Swollen chitin

-chitin

-Phosphoric acid

-น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

นำไคติน 100 กรัม ละลายในกรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 1200 มล. คนด้วย
แท่งแก้ว ประมาณ 45 นาที จะเกิดเป็น Colloidal suspension แล้วเทลงในน้ำ
กลั่น 4 ลิตรอย่างช้า ๆ จากนั้นถ่ายลงใน 1-m-length dialysis tubes with
a molecular weight cutoff 1200 dialyzed ผ่าน น้ำไหล เป็นเวลา 96 ชม.
แล้วตามด้วยน้ำกลั่น (static) เป็นเวลา 24 ชม.

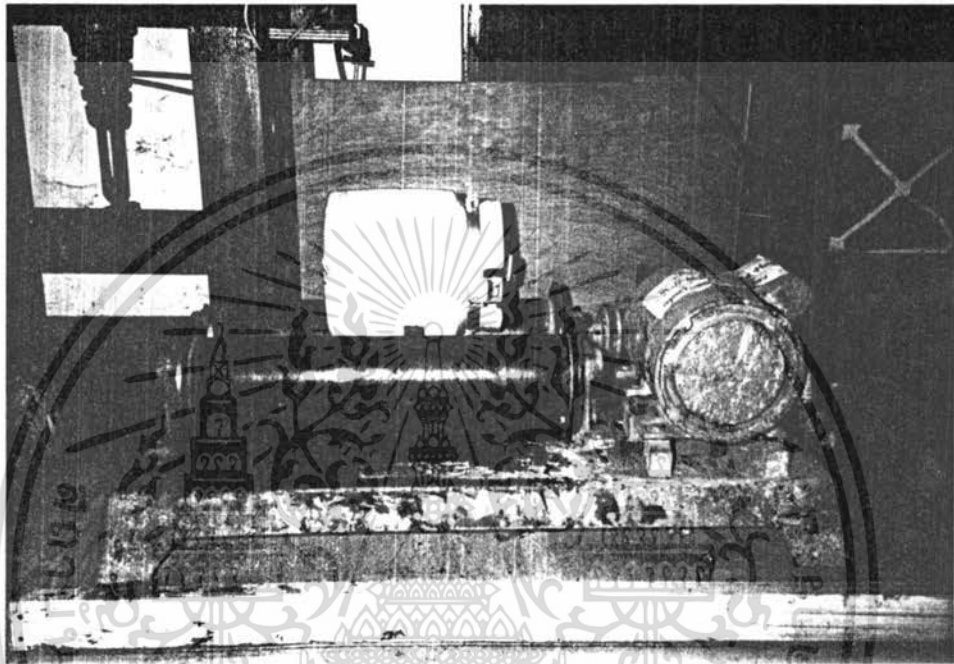
Ball mill chitin

-ไคติน

-น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

นำไคติน 30 กรัม ผสมกับน้ำ 800 มล. นำไปเข้าเครื่อง Ball mill เป็นเวลา
4 วัน 4 คืน จากนั้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำเข้าตู้เย็น



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของเครื่อง บอลมิล (ball mill)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Campbell, L.L. & Williams, O.B., A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.*, 5(1951)894-905
2. Bird, A.F. & McClure, M.A., The tylenchid (Nematode) egg shell structure, composition and permeability. *Parasitology*, 72(1976)19-28.
3. Godoy, G.R., Rodriguez-Kabana, R & Morgan-Jones, G., Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica*, 12(1982)111-19
4. Mazzarelli, R.A.A., *Chitin*. Pergamon Press, Elmsford, NY, 1977, pp. 155-81
5. Ward, H.D., Alroy, J., Lev, B.I., G.T. & Pereira, M.E.A., Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. *Infection and Immunity*, 49(1985)629-34
6. Waterhouse, D.F., Hackman, R.H. & McKellor, J.W., An investigation of chitinase activity in cockroach and termite extracts. *J. Insect. Physiol.*, 6(1961)96-122.
7. Wortman, A.T., Somerville, C.C. & Colwell, R.R., Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning an application of chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(1980)142-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Tom, R.A. & Carroad, P.A., Effect of reaction condition on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB chitinase. *J. Food Sci.*, 46(1981)646-7
9. Jeumaux, C., Chitinase. In *Methods in Enzymology*, Vol. 8, ed. S.P. Colowick & N.O. Kaplan. Academic Press, New York, 1986, pp. 645-50
10. Miller, M., Blum, R., Glennon, W.E & Burton, A.L., Measurement of carboxymethylcellulose activity. *Analytical Biochemistry*, 2(1960)127-32.
11. Molise, E.M. & Drake, C.H., Chitinolysis by serratise including *Serratia liquefaciens* (*Enterobacter liquefaciens*). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23(1973)278-80
12. Clarke, P.H. & Tracey, M.V., The occurrence of chitinase in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 14(1956)188-96
13. Fushs, R.L., McPherson, S.A. & Drahos, D.J., Cloning of *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(1986)504-9.
14. Monreal, J. & Reese, E.T., The chitinase of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, 15(1969)689-96
15. Reynolds, D.M., Exocellular chitinase from *Streptomyces*, sp. *J. Gen. Microbiol.* 11(1954)150-9
16. Stanier, R. Y., Studies on nonfruiting myxobacteria. I. *Cytophaga johnsonae*, n. sp. A chitin decomposing *Myxobacterium*. *J. Bacteriol.*, 53(1947)297

17. Zikakis, J.P. (ed.), *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. Academic Press, New York, 1984.
18. Bennett, C.B. & Hood, M.A., Effects of cultural condition on the modulation of chitinase by *Bacillus megaterium*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 21(1980)357-63
19. Berger, L.R. & Reynolds, D.M., Ter chitinase system of a strain of *Streptomyces griesus*. *Biochim. biophys. Acta.*, 29 (1958)522-34
20. Tsujisaka, Y., Tominaga, Y. & Iwai, M., Purification and some properties of the lytic enzyme from *Bacillus* sp. R-4 which acts on Rhizopus-Delemer cell wall. *Agri. Biol. Chem.*, 339(1974)145-52
21. Zobell, C.E. & Rittenberg, S.C., The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. *J. Bacteriol.*, 35(1938)275-87
22. Reid, C.D. & Ogrydzial, D.M., Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(1981) 664-9
23. Tominaga, Y. & Tsujisaka, Y., Identification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lyses *Rhizopus* cell wall. *Biochim. biophys. Acta*, 410 (1975)145-55

24. Ohtakara , A. , Mitsutomi , M. & Uchida , Y., Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J.Ferment. Technol.*, 51 (1979) 169-77
25. David , B. & Eveleigh , D.E., Chitosanase: occurrence, production and immobilization. in *Chitin, Chitosan and Related Enzymes* , ed. J.P. Zikakis. Academic Press , New York , 1984
26. Magnolato, D. 1978. A process of deacidifying a coffee extract and the deacidified extract obtained . UK Patent Application GB 2029 688A.
27. Galun, M., Keller, P., Malki, D., Feldstein, H., Galun, E., Siegel, S.M., and Siegel, B.Z. 1983. Removal of uranium (VI) from solution by fungal biomass and fungal wall related biopolymers. *Science* 219-285
28. Jha, I.N.I. and Leela Prabhakara Rao, A.V.S. 1988. Removal of cadmium using chitosan. *J. Environ. Eng.* 114-962
29. Van Daele, Y. and Thome, J.P. 1986. Purification of PCB contaminated water by chitosan , A biological test of efficiency using the common barbel *Barbus barbus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37-858
30. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 38-85
31. Fukuda, H. 1979. Polyelectrolyte complexes of sodium carboxymethyl cellulose with chitosan. *Macromol. Chem.* 180:1631.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32. Kikuchi, Y. and Noda, A. 1976. Polyelectrolyte complexes of heparin with chitosan. J. Appl. Polym. Sci. 20:2561
33. Hirano, S., Mizutani, C., Yamaguchi, R., and Miura, O., 1978. Formation of the polyelectrolyte complexes of some acidic glycosaminoglycans with partially N-acylated chitosan. Biopolymers. 17:1805
34. Chavasit, V., Kienzle-Sterzer, C., and Torres, J.A. 1988. Formation and characterization of an insoluble polyelectrolyte complex, Chitosan polyacrylic acid. Polymer Bull. (Berlin) 19:223
35. Daly, M. and Knorr, D. 1988. Chitosan alginate complex coacervate capsules, Effects of calcium chloride, plasticizer and polyelectrolytes on mechanical stability, Biotechnol Prog. 4:176

ประวัติ

นางสาว อารี วัฒนพงษ์วนิช เกิดเมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2513
 เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียน เซนต์แอนโทนีคอนแวนต์ ละแวกเมือง และ
 จบมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียน เขษุมราชรังสฤษฎ์ ละแวกเมือง เข้าศึกษาใน
 ระดับอุดมศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2530 เลขประจำตัว 311024 ที่สถาบันเทคโนโลยีพระ
 จอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง จนจบหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2534

นาย สุนัน วัฒนวิทย์ เกิดเมื่อวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2511 เริ่มศึกษาชั้น
 ประถมศึกษาที่โรงเรียน ไทยวัฒนาประชารัฐ และ จบมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียน
 ราชมังคลาวิทยาลัย เข้าศึกษาในระดับอุดมศึกษาเมื่อ พ.ศ. 2530 เลขประจำตัว 311021
 ที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ในระหว่างศึกษาได้เข้า
 ร่วมกิจกรรมหลายอย่างคือ เป็นหัวหน้านักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ เป็นสมาชิกสภา
 นักศึกษาในนามของคณะวิทยาศาสตร์ เป็นประธานจัดงานรับน้องไบโอเทค สตาฟเชียร์
 จบหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เมื่อ พ.ศ. 2534