# การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยใช้ของเหลือทิ้งเปลือกกุ้งเป็นแหล่งอาหาร

# THE CHITIN-OLIGOMERS PRODUCTION BY THE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA CULTIVATED ON SHRIMP WASTE AS MEDIUM SOURCE


นายนพสิทธิ์ ตุณทกิจ
นางสาวเบญญาภา ตอกำลัง
นายพงษ์สุพร เกิดชนะ
นางสาววรวลัญช์ สกุลชัยธนานันท์


โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

วิทยาศาสตร์ พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง โดยใช้ของเหลือทิ้งเปลือกกุ้งเป็นแหล่งอาหาร

# THE CHITIN-OLIGOMERS PRODUCTION BY THE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA CULTIVATED ON SHRIMP WASTE AS MEDIUM SOURCE

นายนพสิทธิ์ ตุณทกิจ
นางสาวเบญญาภา ตอกำลัง
นายพงษ์สุพร เกิดชนะ
นางสาววรวลัญช์ สกุลชัยธนานันท์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 148960
วัน,เดือน,ปี..... 18 ธ.ค. 2560

b.12877305
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

# THE CHITIN-OLIGOMERS PRODUCTION BY THE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA CULTIVATED ON SHRIMP WASTE AS MEDIUM SOURCE


NOPPASIT TUNTAKIT

BENYAPA TOKAMLANG

PONGSUPORN KERDCHANA

WORAWALAN SAKOONCHAITANANAN


A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY


DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



ACADEMIC YEAR 2558

| | | | |
|---|---|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้ของเหลือทิ้งเปลือกกุ้งเป็นแหล่งอาหาร<br>The chitin-oligomers production by the photosynthetic bacteria cultivated on shrimp waste as medium source | | |
| **ชื่อนักศึกษา** | นายนพสิทธิ์ | ตุณทกิจ | รหัส 55051109 |
| | นางสาวเบญญาภา | ตอกำลัง | รหัส 55051122 |
| | นายพงษ์สุพร | เกิดชนะ | รหัส 55051130 |
| | นางสาววรวลัญช์ | สกุลชัยธนานันท์ | รหัส 55051160 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) | | |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา | | |
| **ปีการศึกษา** | 2558 | | |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ | | |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

| | | | |
|---|---|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงโดยใช้ของเหลือทิ้งเปลือกกุ้งเป็นแหล่งอาหาร | | |
| **ชื่อนักศึกษา** | นายนพสิทธิ์ | ตุณทกิจ | รหัส 55051109 |
| | นางสาวเบญญาภา | ตอกำลัง | รหัส 55051122 |
| | นายพงษ์สุพร | เกิดชนะ | รหัส 55051130 |
| | นางสาววรวลัญช์ | สกุลชัยธนานันท์ | รหัส 55051160 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตร์บัณฑิต | | |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยาประยุกษ์ | | |
| **สาขา** | เทคโนโลยีชีวภาพ | | |
| **ปีการศึกษา** | 2558 | | |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ | | |

## บทคัดย่อ

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. S12 และสายพันธุ์กลาย 13 และ14 ในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งขาวบด เปลือกกุ้งขาวกำจัดโปรตีน ไคตินจากเปลือกกุ้งขาว ไคตินสำเร็จรูป และ colloidal chitin จากเปลือกกุ้งขาว (ตามลำดับ) เป็นแหล่งคาร์บอนผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในแหล่งคาร์บอนเปลือกกุ้งบด ให้การผลิต N-acetyl glucosamine (G1) และ Chitotetraose (G4) สูงสุด (6.7925 และ 0.8456 มิลลิโมลาร์) ในวันที่ 2 ของการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน ให้การผลิต Chitohexaose (G6) ที่ปริมาณ 0.6801 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 สำหรับ Chitobiose (G2) พบการผลิตสูงสุด (7.0184 มิลลิโมลาร์) โดยการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ในแหล่งคาร์บอนไคตินสาเร็จรูป เป็นเวลา 14 วัน ขณะที่การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. S12 ในแหล่งคาร์บอนเปลือกกุ้งกำจัดโปรตีน และเปลือกกุ้งบด ให้ผลิตภัณฑ์ Chitotriose (G3) และ Chitopentose (G5) ที่ระดับ 1.6474 และ 0.5367 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 10 และ 12 ตามลำดับ เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้การเจริญสูงสุดในแหล่งคาร์บอน colloidal chitin เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้อย่างดี แต่เจริญต่ำสุดในแหล่งคาร์บอนเปลือกกุ้งกำจัดโปรตีน อาจเป็นเพราะโครงสร้างมีความซับซ้อนและยากต่อการย่อยสลายนอกจากนี้เชื้อทั้ง 3 ชนิด สามารถย่อยสลายไคตินสำเร็จรูปได้ดีกว่าไคตินจากเปลือกกุ้งขาว อาจเป็นเพราะแหล่งที่มาของไคตินแตกต่างกันไป

**คำสำคัญ :** ไคตินโอลิโกเมอร์, เปลือกกุ้งขาว, *Rhodopseudomonas* sp.

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Title** | The chitin-oligomers production by the photosynthetic bacteria cultivated on shrimp waste as medium source | | | |
| **Student** | Mister | Nappasit | Tuntakit | Student ID 55051246 |
| | Miss | Benyapa | Tokamlang | Student ID 55051246 |
| | Mister | Pongsuporn | Kerdchana | Student ID 55051246 |
| | Miss | Worawalan | Sakoonchaitananan | Student ID 55051246 |
| **Degree** | Bachelor of Science | | | |
| **Department** | Applied Biology | | | |
| **Major** | Biotechnology | | | |
| **Academic Year** | 2015 | | | |
| **Advisor** | Assist.professor Dr. Somchai Krairak | | | |


## Abstract

The chitin-oligomers product was investigated by the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. S12 (wild type) and 13 and 14 (mutants) in A medium with shrimp shell powder, deproteinized shrimp shell, white shrimp chitin, commercial chitin and colloidal chitin (respectively) as c-source. The result was found that, the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. 14 in shrimp shell powder presented the maximal N-acetyl glucosamine (G1) and Chitotetraose (G4) (6.7925 and 0.8456 mM) in 2-day cultivation. When one was cultivated in deproteinized shrimp shell powder as c-source, the maximum Chitohexaose (G6) (0.6801 mM) was observed on 14 days of cultivation. In case of Chitobiose (G2), the maximal production (7.0184 mM) was found when cultivated *Rhodopseudomonas* sp. 13 with commercial chitin as c-source for 14 days of cultivation. Meanwhile, the cultivation of *Rhodopseudomonas* sp. S12 in deproteinized shrimp shell powder and shrimp shell powder gave Chitotriose (G3) and Chitopentose (G5) production at 1.6474 mM and 0.5367 mM within 10-day and 12-day cultivation, respectively. Among c-sources, all three strains gave the highest growth in colloidal chitin due to the maximal chitin digestibility. In case of deproteinized shrimp shell powder, the lowest growth was found. It could be the complexity of deproteinized shrimp shell powder was difficult to digest. Therefore, all 3 strains showed the higher utilization on commercial chitin than the white shrimp chitin.



**Keywords :** chitin oligomer, shrimp waste, *Rhodopseudomonas* sp.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลหลากหลายท่าน ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่คณะผู้วิจัยของกล่าวถึงคือ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยท่านได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ในเรื่องของการดำเนินงานวิจัยรวมถึงเทคนิคต่างๆ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด อีกทั้งท่านยังช่วยตรวจทางและแก้ไขข้อบกพร่องของรูปเล่มวิทยานิพนธ์เล่มนี้ด้วยความใส่ใจให้เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้จัดทำใครขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ บริษัท เกาะสมุทร โฟรเซ่น ฟู้ดส์จำกัด จังหวัด สมุทรสาคร ที่กรุณาให้เปลือกกุ้งในการทำการทดลองครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ พนักงานสำนักงานหอสมุดกลางสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มีส่วนช่วยอำนวยความสะดวก รวมทั้งแนะนำวิธีการค้นหาเนื้อหาสาระสำคัญเพื่อนำมาประกอบวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนมีความถูกต้องสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกษ์ ที่ช่วยจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยรวมถึงอำนวยความสะดวก ในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมีอีกทั้งยังติดต่อประสานงานเอกสาร

ขอขอบพระคุณเพื่อนภาควิชาชีววิทยาประยุกษ์ชั้นปีที่ 4 ทั้งสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ ให้กำลังใจ รวมทั้งแสดงความคิดเห็นในด้านต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการดำเนินงานวิจัยมาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

และที่สำคัญ ขอกราบขอบพระคุณ คุณบิดา คุณมารดา และทุกคนในครอบครัว ของคณะวิจัย ที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ ให้ความสนับสนุนส่งเสริมมาโดยตลอด ซึ่งคุณค่าและประโยชน์ทั้งหมดของวิทยานิพนธ์เล่นนี้ คณะผู้วิจัยมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการช่วยเหลือจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความครบถ้วนสมบูรณ์

นพสิทธิ์ ตุณทกิจ
เบญญาภา ตอกำลัง
พงษ์สุพร เกิดชนะ
วรวลัญช์ สกุลชัยธนานันท์

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ฌ

**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ..... 2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย ..... 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2

**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3

2.1 โครงสร้าและคุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน ..... 3

2.1.1 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน ..... 3

2.1.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคติน ..... 5

2.2 ประโยชน์ของไคติน ไคโตซาน ..... 8

2.3 Purple Phototrophic Bacteria ..... 8

2.3.1 เชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* ..... 9

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 9

2.4.1 การผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า (เซลลูเลสและเพคทิเนส) และผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ..... 9

2.4.2 การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง ..... 10

2.4.3 ผลของการใช้เอนไซม์ในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ ..... 10

2.4.4 ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของไคตินโอลิโกเมอร์ ..... 11

2.4.5 การผลิตเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (NAG) และไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน ..... 11

# สารบัญ(ต่อ)


หน้า

**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 12

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี ..... 12

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ..... 12

3.1.2 เคมีภัณฑ์และวัสดุ ..... 13

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 14

3.3 วิธีการทดลอง ..... 14

3.3. การเตรียมหัวเชื้อ ..... 14

3.4. การเตรียมแหล่งคาร์บอน ..... 14

3.4.1 เปลือกกุ้งบด ..... 14

3.4.2. เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน ..... 14

3.4.3 ไคตินจากเปลือกกุ้ง ..... 14

3.4.4 ไคตินสำเร็จรูป ..... 15

3.4.5 Colloidal chitin ..... 15

3.5 การเลี้ยงเชื้อ ..... 15

3.6 วิธีการทดลอง ..... 16

3.6.1 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 16

3.6.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน ..... 16

3.6.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน. ..... 17

3.6.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน. ..... 17

3.6.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน. ..... 18

# สารบัญ(ต่อ)


หน้า

**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล** ..... 19

4.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 19

4.2 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 25

4.3 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 31

4.4 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 37

4.5 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ..... 43

**บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง** ..... 50

**บทที่ 6 วิจารณ์ผลการทดลอง** ..... 53

เอกสารอ้างอิง ..... 54

ภาคผนวก ..... 58

ภาคผนวก ก ..... 58

ภาคผนวก ข ..... 60

ภาคผนวก ค ..... 63

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

4.1 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 20

4.2 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 21

4.3 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 22

4.4 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 26

4.5 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 27

4.6 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 28

4.7 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 32

4.8 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 33

4.9 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 34

4.10 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 38

4.11 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 39

4.12 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 40

4.13 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มี ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ..... 44

4.14 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ..... 45

# สารบัญตาราง(ต่อ)


**ตารางที่** **หน้า**

4.15 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ..... 46

5.1 สรุปการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ทั้ง 6 รูปแบบ ..... 51

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.15 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน | 67 |
| 4.16 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน | 68 |
| 4.17 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน | 69 |
| 4.18 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน | 70 |
| 4.19 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน | 71 |
| 4.20 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน | 72 |
| 4.21 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน | 73 |
| 4.22 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน | 74 |
| 4.23 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน | 75 |
| 4.24 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน | 76 |
| 4.25 | ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน | 77 |

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | ลักษณะโครงสร้างของไคติน-ไคโตซาน | 3 |
| 2.2 | ลักษณะการเรียงตัวโครงสร้างของไคตินในแบบต่างๆ | 4 |
| 2.3 | ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส | 6 |
| 2.4 | รูปแบบการย่อยสลายไคตินให้เป็นสารอื่น | 7 |
| 2.5 | ลักษณะของเชื้อ *Rhodopseudomonas palustris* ในรูปแบบต่างๆ | 9 |
| 4.1 | การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน (▲) pH (●) OD | 23 |
| 4.2 | ปริมาณเปลือกกุ้งบดที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ (■) ปริมาณที่หายไป (■) ปริมาณที่เหลือ | 24 |
| 4.3 | การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งคาร์บอน (▲) pH (●) OD | 29 |
| 4.4 | ปริมาณเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน ที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ (■) ปริมาณที่หายไป (■) ปริมาณที่เหลือ | 30 |
| 4.5 | การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน (▲) pH (●) OD | 35 |

# สารบัญรูป


**รูปที่** **หน้า**

4.6 ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้งที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ (■) ปริมาณที่หายไป (■) ปริมาณที่เหลือ ..... 36

4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน (▲) pH (●) OD ..... 41

4.8 ปริมาณไคตินสำเร็จรูปที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ (■) ปริมาณที่หายไป (■) ปริมาณที่เหลือ ..... 42

4.9 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน (▲) pH (●) OD ..... 47

4.10 ปริมาณ colloidal chitin ที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ (■) ปริมาณที่หายไป (■) ปริมาณที่เหลือ ..... 48

4.11 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 63

4.12 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 64

4.13 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 65

4.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ..... 66

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในแต่ละปีอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีการผลิตและส่งออกเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีกากของเหลือจากการผลิต เช่น เปลือกกุ้ง ในปริมาณสูง แนวทางหนึ่งในการแปรรูปกากของเหลือ ให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้นทำโดยการแปรรูปเป็นไคตินไคโตซาน (สุพจน์ และคณะ, 2546)

กุ้งทะเลเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลักที่สร้างรายได้จากการส่งออกสินค้าสัตว์น้ำให้กับประเทศไทยมาก เนื่องจากเป็นสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมบริโภคทั้งในประเทศและ ต่างประเทศทั่วโลก โดยในปัจจุบันกุ้งที่เลี้ยงส่วนใหญ่เป็นกุ้งแวนนาไม ซึ่งการเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างมาก โดยมีเนื้อที่การเลี้ยงกุ้งเพิ่มขึ้นจากปี 2530 ถึง 22.36 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 136.07 เปอร์เซ็นต์ นับเป็นช่วงการเปลี่ยนแปลง โดยในปี 2556 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ปริมาณ 362,308 ตัน เป็นกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งทะเล 325,395 ตัน เป็นกุ้งจากธรรมชาติ 36,913 ตัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 89.81 และ 10.19 ของปริมาณกุ้งทะเลที่ผลิตได้ตามลำดับ และในปี 2557 สามารถผลิตกุ้งได้ปริมาณ 322,796 ตัน เป็นกุ้งทะเลจากฟาร์มเลี้ยง 279,907 ตัน เป็นกุ้งทะเลจากธรรมชาติ 42,889 ตัน คิดเป็น 86.71 เปอร์เซ็นต์ และ 13.29 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกุ้งทะเลที่ผลิตได้ตามลำดับ (กรมประมง และกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557)

โดยส่วนประกอบของน้ำหนักกุ้งจากทั้งตัวนั้นในลำตัวรวม 57 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น 3 ส่วน 1. เนื้อช่วงลำตัว 50 เปอร์เซ็นต์ 2. เปลือกกุ้งช่วงลำตัว 7 เปอร์เซ็นต์ หัวกุ้ง 38 เปอร์เซ็นต์ และหางกุ้ง 5 เปอร์เซ็นต์ (รักชนก, 2559)

ไคตินจัดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่ประกอบจากหน่วยย่อยอนุพันธ์ของกลูโคส ซึ่งมีศักยภาพทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ ซึ่งมีขอบเขตการใช้งานกว้างขวาง ไคตินมีคุณสมบัติที่สนใจหลายอย่าง เช่น เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ย่อยสลายได้ไม่เป็นพิษ มีลักษณะและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ สารสกัดไคติน พบได้ใน แมลง แกนหมึก เปลือกกุ้ง และ เส้นใยของเชื้อรา (Dziril และคณะ, 2015)

ไคตินโอลิโกเมอร์ จัดเป็นอนุพันธ์หนึ่งของไคติน โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การเป็นสารยับยั้งแบคทีเรียในอาหาร สารต่อต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง และยังมีฤทธิ์ในการสร้างภูมิต้านทาน เป็นต้น (Park และคณะ, 2004)

มีหลายวิธีการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ เช่น การใช้กรดย่อยสลาย ไฮโดรไลซิสออกซิเดชั่น การย่อยสลายอนุมูลอิสระ การใช้เอนไซม์ การใช้ความดันย่อยสลาย การฉายรังสีด้วยคลื่นไมโครเวฟ คลื่นเสียงความถี่สูง และการฉายรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า แต่ในการย่อยสลายโดยกระบวนการทางกายภาพและกระบวนการทางเคมีจำเป็นต้องใช้สภาวะรุนแรง ทำให้ควบคุมปริมาณผลิตภัณฑ์ได้ยากแต่ในการย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพใช้สภาวะรุนแรงน้อยกว่าทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีประสิทธิภาพ

มากกว่า ซึ่งในกระบวนการทางชีวภาพ ได้แก่ การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายไคตินเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่เนื่องจากเอนไซม์มีราคาสูง และยังสูญเสียความสามารถในการย่อยสลายไคตินได้เร็วในการกลับกันยังมีอีกแนวทางการย่อยสลายไคตินด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ การใช้เซลล์จุลินทรีย์ซึ่งทำการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วแต่ได้ช้ากว่าเอนไซม์ เนื่องจากมีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและสามารถประหยัดงบประมาณในการใช้งาน แต่เนื่องจากจุลินทรีย์อาจนำผลิตภัณฑ์ไคตินโอลิโกเมอร์ไปใช้ในการเจริญเติบโตทำให้ผลผลิตลดลง ดังนั้นสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้โดยการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ (Dziril และคณะ, 2015)

**1.2. วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ**

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยไคตินได้ของ *Rhodopseudomonas* sp. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ที่ย่อยสลายได้
2. เพื่อศึกษาความเหมาะสมของแหล่งคาร์บอนโดยใช้เปลือกกุ้งปรับสภาพในรูปแบบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและการเจริญสูงสุดของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp.

**1.3. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ**

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำ *Rhodopseudomonas* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ เพื่อทำการย่อยสลายไคตินให้ได้โอลิโกเมอร์หลากหลายรูปแบบ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไป และปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ในรูปแบบต่างๆ

**1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

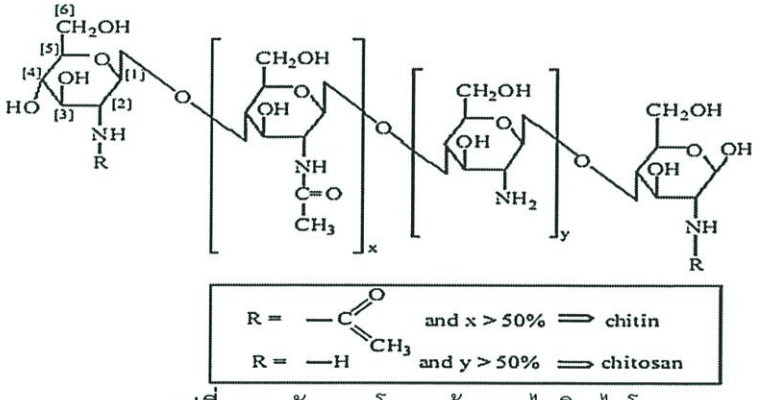
1. สามารถใช้ *Rhodopseudomonas* sp. ย่อยสลายไคตินจากเปลือกกุ้งได้
2. สามารถย่อยสลายไคตินจากเปลือกกุ้งให้เป็นไคตินโอลิโกเมอร์ได้หลากหลายรูปแบบ
3. สามารถใช้วัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตกุ้งแช่แข็งให้เป็นประโยชน์และเพิ่มมูลค่า
4. สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อเนื่องและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ต่อไป

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน

### 2.1.1 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประกอบด้วยเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน และ กลูโคซามีน (Glucosamine) เป็นหน่วยย่อย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (1,4) สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไคโตซาน ไคตินโอลิโกเมอร์ และ กลูโคซามีน ไคตินนั้นได้จากเปลือกกุ้ง เปลือกของแมลง และอาจจะพบในผนังเซลล์ของจุลลินทรีย์ (Bowman และ Free, 2006) ดังรูปที่ 2.1




**รูปที่ 2.1** ลักษณะโครงสร้างของไคติน-ไคโตซาน

ที่มา : Dziril และคณะ (2015)

- กรณีที่สายพอลิเมอร์ประกอบไปด้วยหมู่อะซิติลมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นไคติน
- กรณีที่หมู่อะซิติลน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นไคโตซาน (Dziril และคณะ, 2015)

ไคตินโอลิโกเมอร์ สามารถละลายในน้ำได้ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติ เป็นยาปฏิชีวนะ ป้องกันมะเร็ง และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Nidheesh และคณะ, 2015)

**ลักษณะการเรียงตัว**

ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่งมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกัน โดยแบ่งตามลักษณะการเรียงตัวของเส้นโพลิเมอร์ได้ 3 กลุ่ม คือ

ก. แบบอัลฟา (alpha) มีการเรียงตัวของสายโพลิเมอร์ในลักษณะสวนทางกัน มีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู

ข. แบบเบตา (beta) มีการเรียงตัวของสายโพลิเมอร์ในทิศทางเดียวกัน จึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนปลาหมึก

ค. แบบแกมมา (gamma) มีการเรียงตัวของสายโพลิเมอร์ในลักษณะที่ไม่แน่นอน (สวนทางกัน สลับทิศทางเดียวกัน) มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ด รา และพืชชั้นต่ำ (ศิริกรณ์, 2545) ดังรูปที่ 2.2

**รูปที่ 2.2** ลักษณะการเรียงตัวโครงสร้างของไคตินในแบบต่างๆ
ที่มา : ศิริกรณ์ (2545)

**คุณสมบัติการละลาย**

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างเจือจาง และแอลกอฮอล์เข้มข้นและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์แก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก และกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิกเข้มข้น และ กรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ (ปิยะบุตร, 2544) นอกจากนี้ไคตินยังละลายได้ในสารละลายเกลือ ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารละลายลิเธียมคลอไรด์ (Lithium chloride) ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-dimethylformamide) และ เมธิไพโรลิโด (N-methyl pyrolidone) (Austin และ Zikakis, 1981)

ไคโตซานไม่ละลายในน้ำ กรดเข้มข้น ด่าง แอลกอฮอล์ และอะซิโตน แต่ ละลายได้ในกรดอินทรีย์เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก กรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริกเจือจาง และละลายได้เล็กน้อยในกรดฟอสฟอริกเจือจาง ความสามารถในการละลายของไคโตซานเกี่ยวข้องกับการแตกตัวของหมู่อะมิโนกลายเป็นไอออนบวก และสร้างพันธะไอออนิกกับสารละลายต่างๆ ได้ (สุวบุญ และคณะ, 2544)

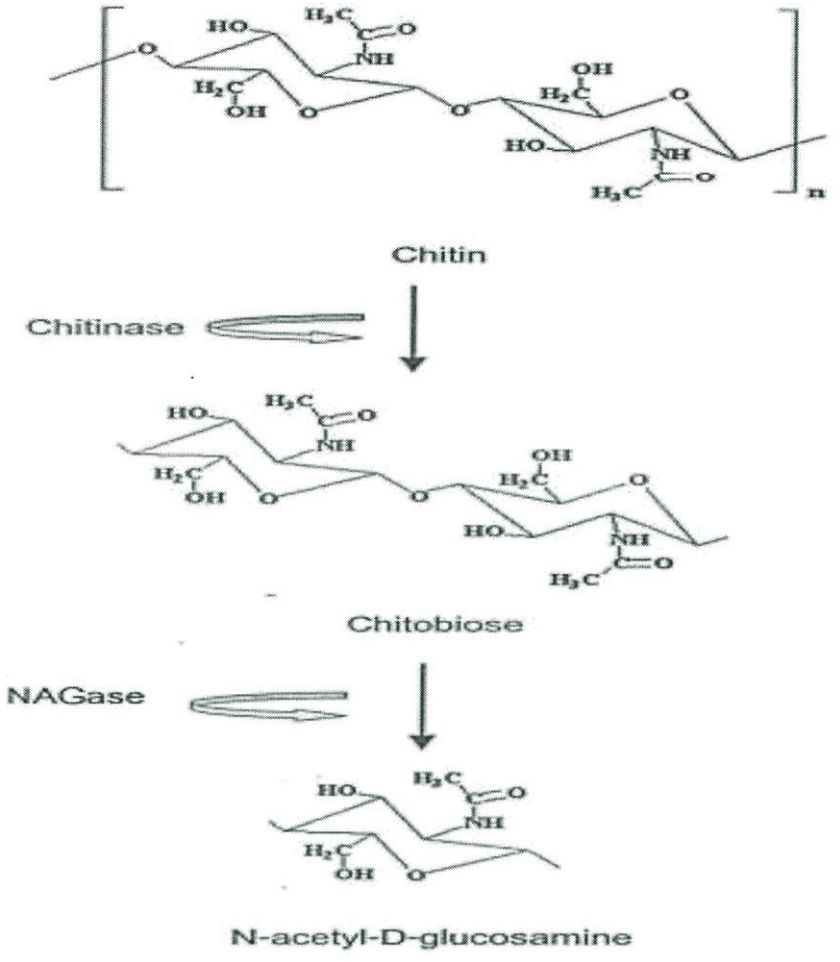
ไคโตซาน (Chitosan) จัดเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งเตรียมได้จากกระบวนกำจัดดีอะซิติลเลชั่น (Deacetylation) ของไคติน สามารถสกัดได้จากเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้ง และปู ไคโตซาน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย (Antibacterial) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Antifungal) (อนันต์ และคณะ, 2554)

เนื่องจากกระบวนกำจัดดีอะซิติลเลชั่น (Deacetylation) ในการสร้างไคโตซานจากไคตินขึ้นมานั้น จะไม่สามารถเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานได้ทั้งหมดร้อยเปอร์เซ้นต์สิ่งที่ได้จึงเป็นพอลิเมอร์ระหว่าง monomer ของ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน และกลูโคซามีน (Glucosamine) ถ้าสัดส่วนของ monomer แรกมีมากกว่าจะแสดงว่าเป็นไคติน แต่ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของ monomer หลังมีมากกว่าจะแสดงว่าเป็นไคโตซาน (Dziril และคณะ, 2015)

ดังนั้นสำหรับไคโตซานที่ปรากฏให้เห็นก็จะมีส่วนผสมของไคตินอยู่บ้างขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของไคโตซาน และเนื่องจากความเกี่ยวพันที่ใกล้ชิดระหว่างสารทั้งสอง และสภาพที่อยู่ปะปนกันในรูปโคโพลิเมอร์ ในบางครั้งเมื่อกล่าวถึงคุณสมบัติและลักษณะจึงมีผู้นิยมเรียกชื่อสารนี้ว่า "ไคติน-ไคโตซาน" (ศิริกรณ์, 2545)

### 2.1.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคติน

ไคติโนไลติกเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายไคตินในธรรมชาติให้เป็นหน่วยย่อย เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน ซึ่งมีลักษณะการทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่องเป็นระบบ โดยทั่วไปเอนไซม์ย่อยไคตินจะถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งออกมาเป็นกลุ่มรวมกันในลักษณะ multi-enzyme complex ซึ่งส่วนมากประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ เอนไซม์ไคติเนส (Chitinase) และ เอนไซม์ไคโตไบเอส (Chitobiase) หรือ เอนไซม์เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส (NAGase) Lindsay (1984) โดยไคติเนสจะทำหน้าที่ย่อยไคตินที่เป็นโพลิเมอร์ของ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน จนกระทั่งเป็นไคโตไบเอสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลังจากนั้นเอนไซม์เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดสจะทำงานต่อโดยย่อยไคโตไบโอสให้เป็นโมโนเมอร์ (monomer) เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (Shaikh และ Deshpende, 1993) ดังรูปที่ 2.3




**รูปที่ 2.3** ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส

ที่มา : Brine (1984)

**การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติอาจเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ**

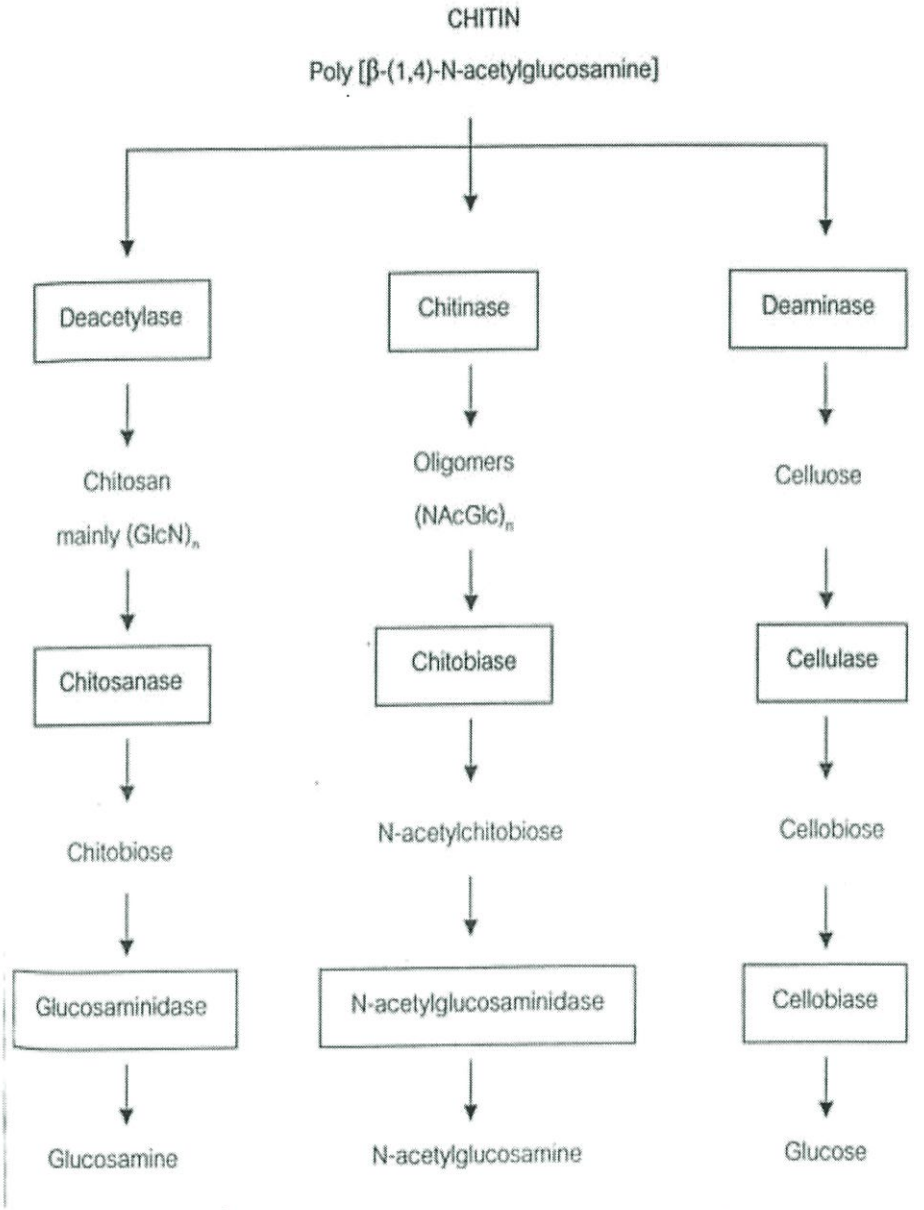
1. การย่อยสลายไคตินให้เป็นหน่วยย่อยของ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน โดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส

2. เกิดโดยการใช้เอนไซม์ดีแอซีไทเลส (Deacetylase) โดยดึงหมู่เอ็นอะซิทิล (N-acetyl) ออกจากไคตินเพื่อให้ได้เป็นไคโตซาน ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ไคโตซาเนส (chitosanase) และเอนไซม์กลูโคซามินิเดส (glucosaminidase) ให้ผลผลิตเป็นไคโตไบโอส และกลูโคซามีน ตามลำดับ ไคโตซานคืออนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่เอ็น-อะซิทิลออกของหน่วยย่อยเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน บางส่วนกลายไปเป็นกลูโคซามีน ซึ่งมีสมบัติการละลายในกรดอ่อนได้ดีกว่าไคติน

3. เกิดขึ้นโดยการใช้เอนไซม์ดีอะมิเนส (Deamidase) ดึงหมู่เอ็น-อะซิตามิโด ออกจากโมเลกุลของไคตินให้เป็นเซลลูโลส ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไคโตไบโอสได้ด้วยเอนไซม์

เซลลูเลส (Cellulase) จากนั้นเอนไซม์เซลลูไบเอส (Cellobiase) จะทำการย่อยต่อจนเป็นกลูโคสในที่สุด

การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติทั้ง 3 วิธีล้วนมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลไคตินกลับมาเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศน์อีกครั้ง (ศิริกรณ์, 2545) ดังรูป 2.4




**รูปที่ 2.4** รูปแบบการย่อยสลายไคตินให้เป็นสารอื่น

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Cabib (1987)

## 2.2 ประโยชน์ของไคติน ไคโตซาน

- ในอุตสาหกรรมไข่ไก่นั้น ได้มีการนำไคโตซานทำการฉายรังสีแกมม่าทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง ซึ่งเมื่อนำไคโตซานที่ผ่านการฉายรังสีแกมม่าแล้วมาเคลือบบนผิวของไข่ไก่ทำให้สามารถยืดอายุไข่ไก่ได้นานถึง 6 สัปดาห์ (สุกัญญา, 2554)

- ในด้านอุตสาหกรรมน้ำเสีย เรซินไคโตซานสามารถดูดซึม ไอออนทองแดงและไอออนตะกั่วได้ ซึ่งเลือกใช้ทั้งหมด 4 เรซินไคโตซานดังนี้ กลูตาราวดีไฮด์เรซินไคโตซาน เรซินไคโตซานไม่ดัดแปลง คาร์บอกซิเลตเรซินไคโตซาน และไทร์โอไกลโคลิกเรซินไคโตซาน ซึ่งผลก็คือกลูตาราวดีไฮด์เรซินไคโตซาน มีความสามารถที่สามารถดูดซับ ไอออนทองแดงและไอออนตะกั่วได้ดีที่สุด (สุภาพร, 2548)

- ในด้านการแพทย์ ไคตินสามารถช่วยทำให้เกิด T-helper-2 cell คือ eosinophils และ basophils ซึ่งมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งสามารถป้องกันพยาธิได้ (Reese และคณะ, 2007)

- การทดลองในหนูโดยแผลที่เปิดในหนูที่ใส่ไคตินลงไปจะถูกเร่งให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่เร็วขึ้น และยังมีประโยชน์ในด้านเครื่องสำอางและด้านผลิตภัณฑ์ทางด้านสุขภาพอีกมากมาย (Mori และคณะ, 1997)

## 2.3 Purple Phototrophic Bacteria

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน (Rods) ขนาด 1.5-4 x 4-40 μm บางชนิดมีรูปร่างเป็นเกลียว (spirals) รูปไข่ (ovoid) หรือคล้ายเมล็ดถั่ว (bean-shaped) บางชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัยpolar flagella แบคทีเรียในไฟลัมนี้พบอาศัยในทะเลสาบ และ ตะกอนที่ทับถมของทะเลสาบโดยเฉพาะในบริเวณที่มี sulfide อยู่ในปริมาณที่สูง Purple phototrophic bacteria มีกระบวนการเมตาบอลิสึมแบบ strictly anaerobic anoxygenic phototrophy แหล่งคาร์บอนที่สำคัญ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) โดยอาศัย วัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) ในการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ($CO_2$) แหล่งของอิเล็กตรอนมักเป็น hydrogen sulfide, sulfur, thiosulfate และhydrogen นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มนี้พบมี Bacteriochlorophyll ด้วย แบคทีเรียในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 Purple sulfur bacteria ซึ่งมีกระบวนการเมตาบอลิสึมแบบ Photolithoautotrophy พบได้ในหลายสกุลเช่น *Chromatium*, *Halorhodospira*, *Thiocapsa*, *Thiococcus*, *Thiopedia* และ *Thiospirillum* กลุ่มย่อยที่ 2 Purple non-sulfur bacteria ที่พบกระบวนการเมตาบอลิสึมแบบ Photoorganoautotrophy ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มย่อยนี้คือ *Rhodobacter*, *Rhodocyclus*, *Rhodopseudomonas* และ *Rhodophila* (ธวัชชัย, 2559)

**2.3.1 เชื้อ *Rhodopseudomonas palustris***

*Rhodopseudomonas Palustris* อยู่ในชั้น Rhodospirillales วงศ์ Rhodospirillaceae โดยมีสายพันธุ์อื่นๆ อีกเช่น *Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas viridls, Rhodopseudomonas acidophilia, Rhodopseudomonas gelatinosa, Rhodopseudomonas capsulata* และ *Rhodopseudomonas sphaeroldes* (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2559)

เป็นแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมกำมะถัน (purple non sulfur bacteria) พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติในชั้นน้ำที่มีแสงสว่างส่องถึง มีสารอินทรีย์และพบการรวมตัวกันเป็นกลุ่มในแหล่งน้ำที่ไม่มีออกซิเจน มีแสงเล็กน้อย ในแหล่งน้ำจืดที่มีซัลไฟด์อยู่จะพบน้อยมากแต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ได้ในที่ที่มีปริมาณซัลไฟด์อยู่สูง (Imhoff, 1992) นอกจากนี้ยังพบได้ในพื้นดินสระน้ำ คลอง หรือ แหล่งน้ำที่สกปรก เช่น บ่อบำบัดน้ำเสีย ซึ่งมีปริมาณสารอินทรีย์สูง จึงเป็นแหล่ง ที่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มนี้เจริญได้ดี (Pfenning และ Truper, 1992 ; Olliver, 1994) ดังในรูปที่ 2.5

*Rhodopseudomonas Palustris*

Electron micrograph of *R. palustris*

**รูปที่ 2.5** ลักษณะของเชื้อ *Rhodopseudomonas Palustris* ในรูปแบบต่าง
ที่มา : Toni (2014) และ Satya (2010)

**2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

**2.4.1 การผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า (เซลลูเลสและเพคทิเนส) และผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์** (Samaporn Boonviset และ Tantawan Pirak, 2554)

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ จากการไฮโดรไลซิสสายไคติน และไคโตซานด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เซลลูเลส (Cellulase) และเพคทิเนส (Pectinase) โดยแปร pH ของสภาวะที่ศึกษาเป็น 4.0 4.5 และ 5.0 และ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานเท่ากับ 1:1 1:2 และ 1:4 สำหรับเพคทิเนส และ 1:2 1:3 และ 1:4 สำหรับเซลลูเลส เก็บตัวอย่างหลังบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 180 นาที พบว่าเอนไซม์เพคทิเนสให้

ไคตินโอลิโกเมอร์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) สูงและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด โดยสภาวะการผลิตที่ให้น้ำหนักโมเลกุล และ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด (1.91 x $10^5$ Da และ 97.35 เปอร์เซ็นต์) คือ pH 4.5 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน 1:4 ในขณะที่เซลลูเลสจะตัดสายไคโตซานได้จำเพาะเป็นผลให้ไคตินโอลิโกเมอร์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าแต่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ต่ำลงด้วย และสภาวะที่ให้น้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด (1.08 x $10^4$ Da) คือ สภาวะการผลิตด้วยเซลลูเลส ที่ pH 4.0 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อ ไคโตซาน 1:2 ปัจจัยที่ศึกษาไม่มีผลต่อ วอเตอร์แอคทีวิตี้ (aw) ของไคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตได้ ($p<0.05$) การทดสอบด้วยวิธี disc diffusion แสดงให้เห็นว่าไคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เพคทิเนสสามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella thyphimurium* ได้ดี ในขณะที่ไคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เซลลูเลสสามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดี

**2.4.2 การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง** (Tolaimate และคณะ, 2003)

การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งขั้นตอนในการเตรียมโดยเริ่มจากการนำเอาเปลือกกุ้ง มาสกัดแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2 ครั้ง) แยกแร่ธาตุต่างๆ ออก โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2 ครั้ง) ได้ไคตินจากนั้นนำไคตินแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อสกัดสีออก และในขั้นตอนสุดท้ายกำจัดหมู่อะซิทิลออกจากสายโมเลกุลของไคติน โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก (w/w) อีกครั้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**2.4.3 ผลของการใช้เอนไซม์ในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์** (Sashiwa และคณะ, 2003)

การใช้เอนไซม์ เช่น ไลเปส (Lipase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulases) เซลลูเลส (Cellulase) และเพคทิเนส (Pectinase) ในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์พบว่า ปัจจัยของการใช้เอนไซม์และสภาวะ ในการผลิตที่แตกต่างจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การผลิตที่แตกต่างกัน โดยการใช้เอนไซม์เพคทิเนสจะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์ของการผลิตมากกว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส

**2.4.4 ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของไคตินโอลิโกเมอร์**

Kim และ Rajapakse (2005) ได้รายงานถึงการใช้ไคตินโอลิโกเมอร์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกพบว่าน้ำหนักโมเลกุล และ เปอร์เซ็นต์ DD มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ Jeon และคณะ (2001) ได้กล่าวว่าไคตินโอลิโกเมอร์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก ไคตินนั้นจะต้องมีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 10,000 Da ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Park และคณะ (2004) ที่พบว่าเมื่อไคตินโอลิโกเมอร์ที่มี น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มสูงขึ้นจะมีแนวโน้มที่จะสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น

**2.4.5 การผลิตเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (NAG) และไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน** (สมชาย และธีระพันธ์, 2549)

เชื้อแบคทีเรียย่อยสลายไคตินไอโซเลท 6.0 และ 6.1 นำมาผ่านการจัดจำแนก พบว่าได้เป็นเชื้อในสกุล Sphingobacterium และ Brevundimonas ตามลำดับผลศึกษาการผลิตเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน และ ไคตินโอลิโกเมอร์โดย *Sphingobacterium* sp. 6.0 และ *Brevundimonas* sp. 6.1 ให้การย่อยสลายไคตินในอาหารเหลวไคติน ประกอบด้วยไคติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 150 มิลลิลิตร พบการสะสมเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วน *Brevundimonas* sp. 6.1 พบสภาวะเหมาะสมต่อการย่อยสลายไคตินคล้ายกับ *Sphingobacterium* sp. 6.0 แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียสการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการเจริญส่งผลกระทบต่อการสะสม เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน ชนิดและสัดส่วนของไคตินโอลิโกเมอร์ โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *Sphingobacterium* sp. 6.0 และ *Brevundimonas* sp. 6.1 พบการสะสม เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีนเพิ่มขึ้น ขณะที่การสะสมไคตินโอลิโกเมอร์ลดน้อยลง

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินงานวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

### 3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) Hirayama รุ่น HV-50

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Hermle ; Z383K, Germany

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) ISSCO รุ่น BVT 123

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu ; UV 1201 V , Japan

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง AG 204 , Switzerland

เครื่องผสมสาร (Vortex) Scientific industries รุ่น Vortex-2 genie

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

ตู้อบความร้อน (Hot air oven) Memmert ; 600 , Germany

เครื่องบด Retsch : SK100 , Germany

โถดูดความชื้น (Desiccator)

กล้องจุลทรรศน์

ปิเปต (Pipette)

ออโต้ปิเปต (Autopipette)

กระบอกตวง (Cylinder)

เพลท (Plate)

บีกเกอร์ (Beaker)

แผ่นสไลด์ (Slide) แผ่นปิดสไลด์ (CoverSlip)

ขวดดูแรน (Duran)

ชุดกรอง (Filter)

เมมเบรนขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร และ 0.45 ไมโครเมตร

กระดาษกรองเบอร์ 1 Whatman International Ltd. UK

คิวเวต (Semimicro rectangular 10 mm) Hellma , USA

เครื่อง High performance liquid chromatography(HPLC)

Shimadzu ; Japan ประกอบด้วย

ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ;

ConstaMetric 3500 Solvent Delivery System

ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-6 A VP

ส่วนประเมินผลและบันทึกผล ; C-R7 Ae Plus

คอลัมน์ที่ใช้ Asahipak Shodex $NH_2P$-50 4E

**3.1.2. เคมีภัณฑ์และวัสดุ**

- อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

  อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี เปลือกกุ้งบด

  อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน

  อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี ไคตินจากเปลือกกุ้งบด

  อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี ไคตินสำเร็จรูป

  อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี Colloidal chitin

  สารตั้งต้นที่ใช้ทำแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ

  - เปลือกกุ้งจาก บริษัท เกาะสมุทร โฟรเซ่น ฟู้ดส์จำกัด จังหวัด สมุทรสาคร
  - ไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน (ไคตินที่ได้จากบริษัทในจังหวัดชลบุรี)

- เคมีภัณฑ์สำหรับการจำแนกชนิดแบคทีเรีย (ภาคผนวก ข)

  แกรมส์ไอโอดีน (Gram's iodine)

  ซาฟานีน-โอ (Safanin-O)

  คริสตัล ไวโอเลต (Crystal violet)

- เคมีภัณฑ์สำหรับการเตรียมแหล่งคาร์บอน

  ไฮโดรคลอริก (HCl)

  โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

- เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ข)

  อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

  น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)

  เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine)

  ไคโตไบโอส (Chitobiose)

  ไคโตไตรโอส (Chitotriose)

  ไคโตเตตระโอส (Chitotetraose)

  ไคโตเพนโอส (Chitopenose)

ไคโตเฮกซะโอส (Chitohexaose)

## 3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14

## 3.3 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ที่ได้จากการคัดแยกบนอาหารแข็ง A medium ลงในอาหารเหลวสูตร A medium นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วันเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

## 3.4 การเตรียมแหล่งคาร์บอน

### 3.4.1. เปลือกกุ้งบด

นำเปลือกกุ้งขาวจาก บริษัท เกาะสมุทร โฟรเซ่น ฟู้ดส์จำกัด จังหวัด สมุทรสาคร มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ตากแดดให้แห้งสนิท นำมาบดให้มีขนาดที่ละเอียดโดยใช้เครื่องบด Retsch : SK100 , Germany ในการปั่นเปลือกกุ้ง และเก็บเปลือกกุ้งที่บดละเอียดแล้วในกล่องที่มีฝาปิดสนิท เพื่อง่ายต่อการเก็บและใช้ในครั้งต่อไป

### 3.4.2 เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน

นำเปลือกกุ้งที่บดไว้มา ใส่ใน Duran โดยแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 8 พร้อมกับให้ความร้อนและกวนโดยนำมาวางบนเครื่อง Hot plate Stirrer ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็น 7 จากนั้นนำไปกรองและอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน ได้เป็นเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน (Musarrat H. Mohammed และคณะ, 2013)

### 3.4.3 ไคตินจากเปลือกกุ้งบด

นำเปลือกกุ้งที่บดไว้มา ใส่ใน Duran โดยแช่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 : 8 พร้อมกับให้ความร้อนและกวนโดยนำมาวางบนเครื่อง Hot plate Stirrer ไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็น 7 แล้วนำไปกรองแล้วอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน พอแห้งแล้วนำมาแช่ต่อใน Duran ด้วย ไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1 : 10 นำมาวางบน Stirrer ที่อุณหภูมิห้องปกติ 1 วัน ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็น 7 แล้วนำกรองแล้วอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนได้เป็นไคตินจากเปลือกกุ้ง (Musarrat H. Mohammed และคณะ, 2013)

### 3.4.4 ไคตินสำเร็จรูป

ตัวอย่างไคตินสำเร็จรูปที่ได้จากบริษัทที่ผลิตไคตินในจังหวัดชลบุรี โดยไคตินนี้ผลิตมาจากแกนหมึก มาในรูปแบบผงละเอียดเนื้อเนียน จึงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เลย

### 3.4.5 Colloidal chitin

นำไคตินมาละลายใน DURAN ด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น (ไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์) อัตราส่วน 1 : 20 ทำการกวนเป็นเวลา 1 - 2 ชั่วโมงพอละลายแล้วจึงค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อป้องกันไม่ให้ไคตินถูกย่อยด้วยความร้อน (ควบคุมอุณหภูมิเพื่อป้องกันการย่อยสลายจากความร้อน) จนสังเกตุเห็นตะกอนไคตินสีขาวขุ่น ให้นำออกมากรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จนมีค่า pH เป็น 7 จากนั้นนำไปทำให้แห้ง จะได้เป็น colloidal chitin

## 3.5 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ มีเปลือกกุ้งบด เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน ไคตินจากเปลือกกุ้ง ไคตินสำเร็จรูป และ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเหลวสูตร A medium

เลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ ถ่ายเชื้อลงในแต่ละฟลาสก์เลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเศลเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 – 3,500 ลักซ์ ทำการเพาะเลี้ยง 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำมาวัด pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) และเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ไคตินโอลิโกเมอร์ (วิเคราะห์ด้วย HPLC) (ทำการทดลองเชื้อละ 3 ฟลาสก์ ในแต่ละแหล่งคาร์บอน)

## 3.6 วิธีการทดลอง

### 3.6.1 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) เตรียมโดย ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว A medium 150 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็นเปลือกกุ้งบด 1.5 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำเชื้อละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 - 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่าง ทุก 2 วัน ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน นำอาหารมากรองแล้วนำมาอบทำจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข)

### 3.6.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) เตรียมโดย ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว A medium 150 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็นเปลือกกุ้แช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ 1.5 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำเชื้อละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500-3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน นำอาหารมากรองแล้วนำมาอบทำจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


**3.6.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน**

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) เตรียมโดย ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว A medium 150 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็นไคตินจากเปลือกกุ้ง 1.5 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำเชื้อละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 - 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน นำอาหารมากรองแล้วนำมาอบทำจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข)

**3.6.4 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน**

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) เตรียมโดย ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว A medium 150 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็นไคตินสำเร็จรูป 1.5 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำเชื้อละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 - 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน นำอาหารมากรองแล้วนำมาอบทำจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข)

148960

**3.6.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน**

นำเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) เตรียมโดย ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารเหลว A medium 150 มิลลิลิตร และแหล่งคาร์บอนเป็น colloidal chitin 1.5 กรัม ปรับ pH เป็น 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 โดยทำเชื้อละ 3 ฟลาสก์ (3 ซ้ำ) (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1500 - 3,500 ลักซ์ เป็นเวลา 14 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของ pH วัดปริมาณเซลล์ (โดยการสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 14 วัน นำอาหารมากรองแล้วนำมาอบทำจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข)

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปลายผล

## 4.1 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลอง การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ ในสภาวะที่ไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งส่วนผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ และการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละไคตินโอลิโกเมอร์ ดังตารางที่ 4.1 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ตารางที่ 4.2 *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และตารางที่ 4.3 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ซึ่งจะมีรูปที่ 4.1 แสดงการแจริญและการเปลี่ยนแปลงของ pH ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และรูปที่ 4.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเปลือกกุ้งบดที่เหลือสิ้นสุดจากการที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.28 | 0.151 | 2.9846 | 3.0000 | - | 0.4950 | - | 0.3611 | - |
| 4 | 7.37 | 0.101 | 4.1517 | 1.4508 | 0.3089 | 0.7092 | - | 0.5861 | - |
| 6 | 7.36 | 0.114 | 1.4110 | - | 0.3796 | - | - | 0.4623 | - |
| 8 | 7.44 | 0.229 | - | - | 1.0440 | - | - | 0.3422 | - |
| 10 | 7.54 | 0.229 | - | - | - | 0.7294 | - | 0.5176 | - |
| 12 | 7.42 | 0.290 | 0.5970 | - | 0.3181 | - | 0.5367 | 0.3557 | - |
| 14 | 7.55 | 0.315 | - | - | - | 0.6599 | 0.3692 | 0.3668 | 1.154 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6.85 | 0.032 | 0.9253 | - | 0.5495 | - | - | 0.4940 | - |
| 4 | 6.90 | 0.007 | 1.7437 | - | - | 0.5597 | 0.3812 | 0.3988 | - |
| 6 | 6.98 | 0.063 | - | 0.9081 | 0.3375 | 0.5306 | - | 0.4502 | - |
| 8 | 6.88 | 0.160 | 0.4208 | - | - | 0.7135 | 0.3928 | 0.3833 | - |
| 10 | 7.15 | 0.228 | - | - | 0.3339 | - | - | 0.5656 | - |
| 12 | 6.89 | 0.207 | 1.5573 | 0.7146 | 0.3459 | 0.6306 | 0.3972 | 0.4635 | - |
| 14 | 7.23 | 0.323 | - | - | - | 0.5736 | 0.4379 | 0.6062 | 1.235 |

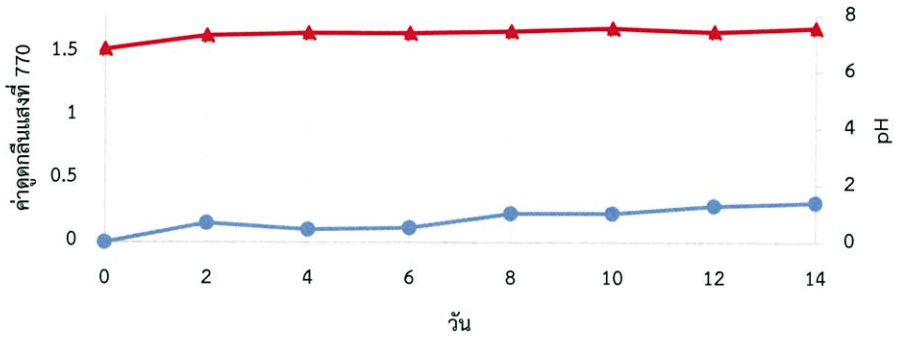
**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

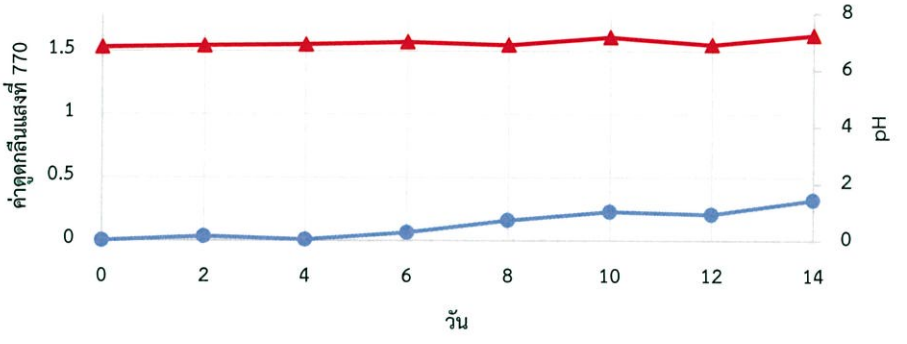
| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6.87 | 0.021 | 6.7925 | 0.6660 | 0.4456 | 0.8456 | - | 0.4478 | - |
| 4 | 6.86 | 0.058 | - | - | 0.2269 | 0.1821 | 0.2704 | 0.3997 | - |
| 6 | 7.04 | 0.146 | 0.3360 | - | 0.2369 | - | - | 0.3690 | - |
| 8 | 7.41 | 0.225 | 0.4023 | - | - | 0.3821 | - | 0.4484 | - |
| 10 | 6.95 | 0.309 | - | - | - | 0.3982 | 0.1062 | 0.4494 | - |
| 12 | 7.00 | 0.239 | - | - | 0.3873 | - | 0.2603 | 0.2972 | - |
| 14 | 7.22 | 0.334 | - | - | 0.2811 | 0.6173 | 0.0801 | 0.5532 | 1.228 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

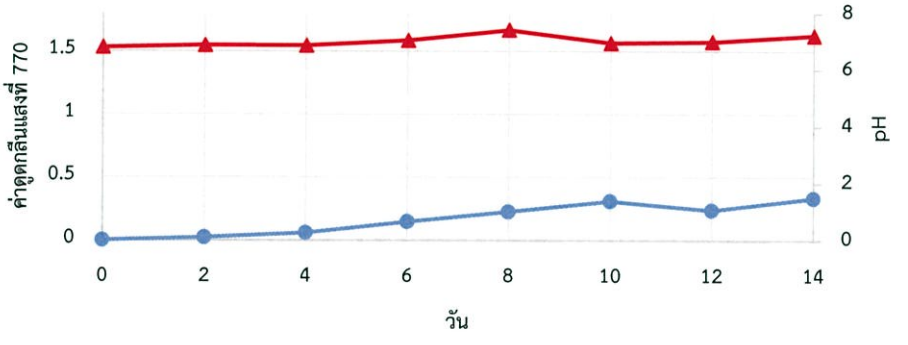
(ก)




(ข)

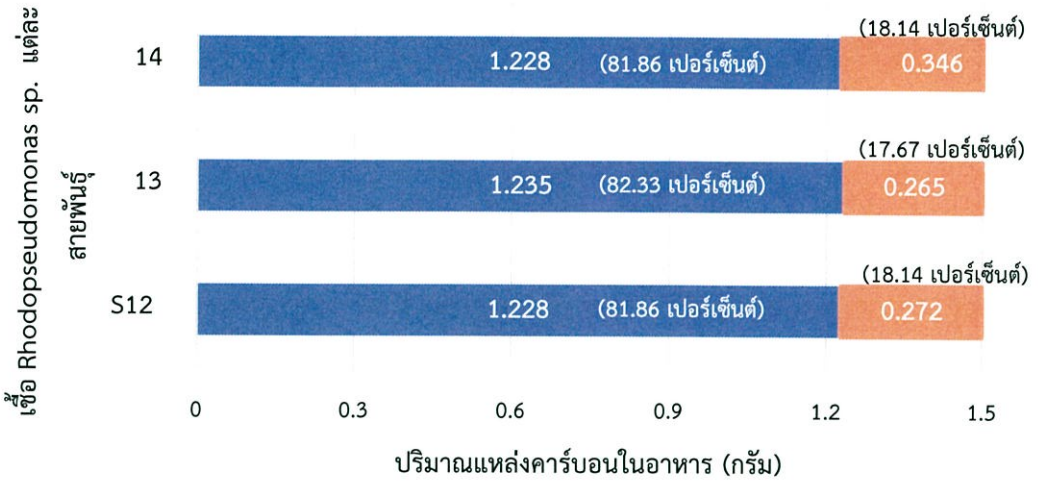



(ค)




**รูปที่ 4.1** การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 (ก *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน

▲ pH ● OD




**รูปที่ 4.2** ปริมาณเปลือกกุ้งบดที่เหลือสิ้นสุดจากการที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ปริมาณที่หายไป ปริมาณที่เหลือ

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ของการนำเปลือกกุ้งบดมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นเชื้อมีการเจริญต่อเนื่องไปถึงวันที่ 14 โดยเชื้อที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 770 ค่าที่ 0.334 รองลงมาเป็นของเชื้อเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 .ในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.323 และสุดท้าย เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.315 แต่แนวโน้มในการเชื้อของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 จะเจริญได้ดีที่กว่า *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ในช่วงวันที่ 2 – 6 ของการทดลองและจะได้ค่า OD ในวันที่ 8 – 14 ใกล้เคียงกันของทั้ง 3 เชื้อ ซึ่งในการเจริญเติบโตค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงประมาณที่ 6.8 – 7.2 ทั้ง 2 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ กลาย 13 และ 14 แต่ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันสุดท้ายมีการเปลี่ยนแปลง pH สูงสุดที่ 7.55 ในปริมาณเปลือกกุ้งบดที่หายไปในการทดลองวันที่ 14 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 0.346 กรัม และในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์นั้นจะมีทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์อยู่ 6 รูปแบบคือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1) มากที่สุด 6.7925 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14, ไคโตไบโอส (G2) มากที่สุด 3.000 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตไตรโอส (G3) มากที่สุด 1.0440 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 8 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตเตตระโอส (G4)

มากที่สุด 0.8456 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตเพสโอส (G5) มากที่สุด 0.5367 มิลลิโมลาร์ในวันที่ 12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และไคโตเฮกซะโอส (G6) มากที่สุด 0.6062 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13

## 4.2 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน

### เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลอง การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ ในสภาวะที่ไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งส่วนผลการเจริญเติบโตของเชื้อ และการทดลองการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละไคตินโอลิโกเมอร์ ดังตารางที่ 4.4 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ตารางที่ 4.5 *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และตารางที่ 4.6 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ซึ่งจะมีรูปที่ 4.3 แสดงการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของ pH ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และรูปที่ 4.4 ปริมาณเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนที่เหลือสิ้นสุดจากการที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

**ตารางที่ 4.4** ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.74 | 0 | 0.2111 | - | - | 0.1329 | 0.0693 | 0.3359 | - |
| 4 | 7.80 | 0 | - | - | - | 0.1525 | - | 0.3362 | - |
| 6 | 7.59 | 0.002 | 0.2619 | - | - | - | 0.4637 | 0.5037 | - |
| 8 | 7.90 | 0.068 | - | - | 0.1118 | - | 0.0886 | 0.3822 | - |
| 10 | 7.94 | 0.054 | - | 0.1975 | 1.6474 | 0.2496 | 0.2769 | 0.4789 | - |
| 12 | 7.88 | 0.150 | - | - | 0.2333 | 0.2306 | 0.0995 | 0.4529 | - |
| 14 | 7.92 | 0.084 | 0.1380 | - | 0.0951 | 0.3924 | 0.2358 | 0.5275 | 1.354 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.5 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.83 | 0 | 0.3203 | - | - | - | 0.1187 | 0.4529 | - |
| 4 | 7.82 | 0 | 0.4537 | 0.2377 | - | 0.1326 | - | 0.4529 | - |
| 6 | 7.71 | 0.065 | - | - | - | - | - | 0.6278 | - |
| 8 | 7.75 | 0.176 | - | - | 0.1243 | - | 0.2091 | 0.1840 | - |
| 10 | 7.85 | 0.103 | - | - | 0.1046 | 0.1591 | - | 0.3802 | - |
| 12 | 7.66 | 0.232 | - | 0.2168 | 0.0990 | 0.1791 | - | 0.2802 | - |
| 14 | 7.71 | 0.194 | - | - | 0.1625 | 0.1744 | - | 0.3961 | 1.317 |

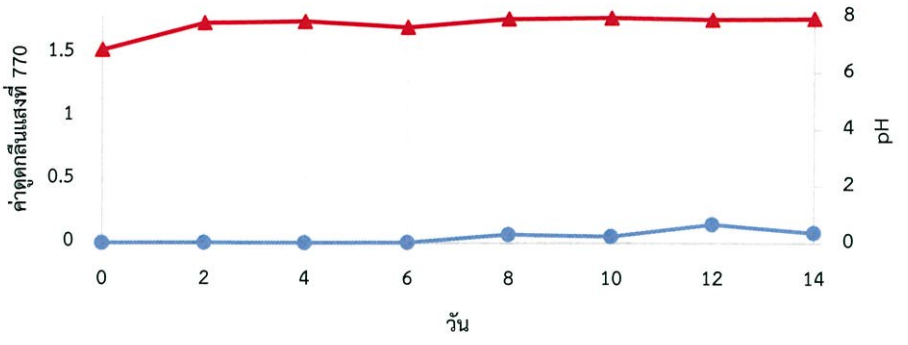
**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.6 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน

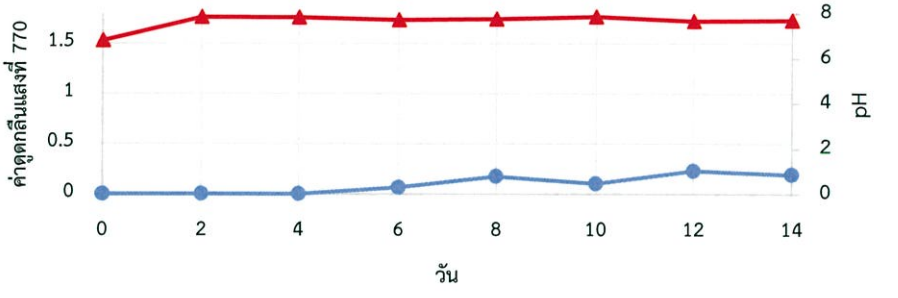
| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.77 | 0 | 0.6572 | - | - | 0.4310 | - | 0.4786 | - |
| 4 | 7.96 | 0 | 0.6627 | 0.2045 | 0.2017 | - | 0.1105 | 0.4587 | - |
| 6 | 7.79 | 0.099 | 0.1236 | - | 0.2051 | 0.3249 | 0.0756 | 0.5753 | - |
| 8 | 7.88 | 0.097 | 0.2107 | 0.2103 | 0.0957 | 0.1514 | 0.1035 | 0.4050 | - |
| 10 | 7.90 | 0.085 | - | - | - | - | 0.0800 | 0.6494 | - |
| 12 | 7.73 | 0.161 | - | - | 0.1027 | - | 0.0747 | 0.4193 | - |
| 14 | 7.86 | 0.140 | - | 0.2270 | 0.0923 | - | 0.1944 | 0.6801 | 1.317 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

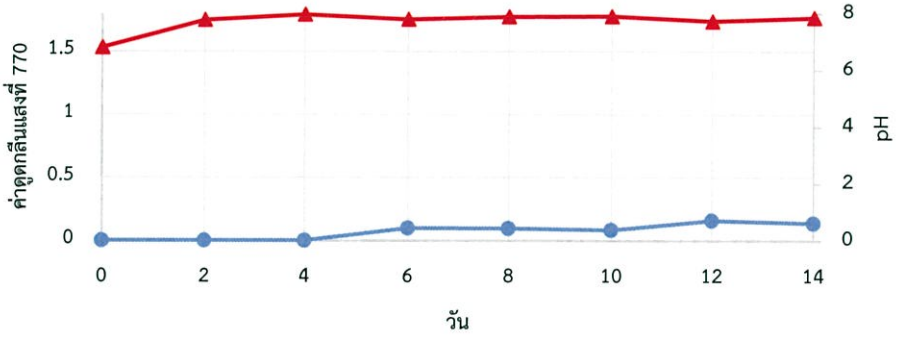
(ก)




(ข)

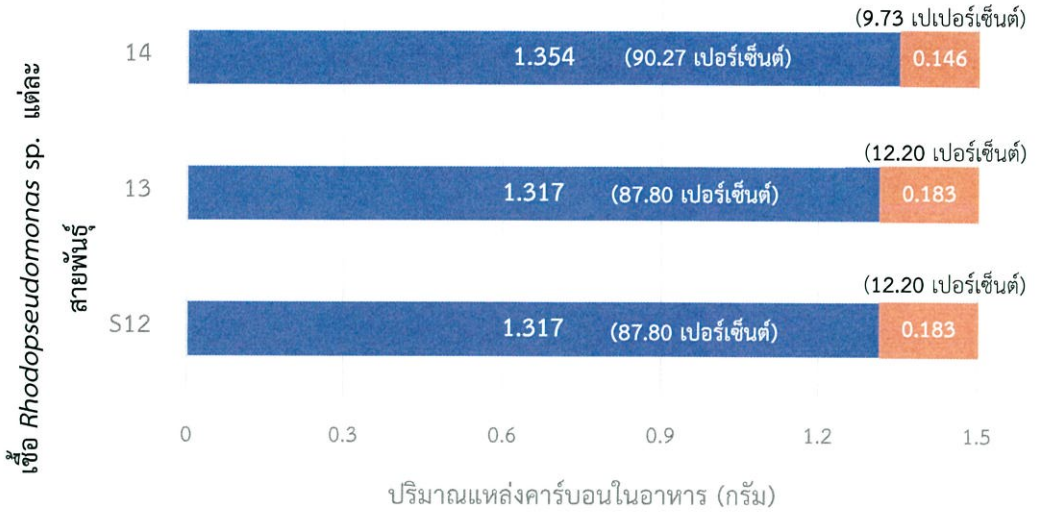



(ค)




**รูปที่ 4.3** การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน เป็นแหล่งคาร์บอน

▲ pH ● OD




**รูปที่ 4.4** ปริมาณเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนที่เหลือสิ้นสุดจากการที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ปริมาณที่หายไป ปริมาณที่เหลือ

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ของการนำเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ โดยจะมีการเจริญสูงสุดของทั้ง 3 เชื้อซึ่งมีเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด ในวันที่ 12 OD อยู่ที่ 0.232 รองลงมา *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 12 OD อยู่ที่ 0.161 และสุดท้ายน้อยที่สุดเป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 12 OD อยู่ที่ 0.150 ซึ่งในการเจริญเติบโตนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงของ pH มีค่าที่สูงตั้งแต่วันแรกที่ทำการเลี้ยงโดยประมาณประมาณที่ 7.7-7.9 โดยที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 จะมีการเปลี่ยนแปลง pH จากน้อยไปมากจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองแต่ในส่วนของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 นั้นในช่วงวันแรกของกการทดลองจะมีค่า pH สูงจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองค่า pH มีค่าลดลง ในปริมาณเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนหายไปในการทดลองวันที่ 14 เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 0.186 กรัม และในการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์นั้นจะมีทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์อยู่ 6 รูปแบบคือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1) มากที่สุด 0.6627 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตไบโอส (G2) มากที่สุด 0.2377 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 , ไคโตไตรโอส (G3) มากที่สุด 1.6474 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 10 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตเตตระโอส (G4) มากที่สุด 0.4310 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp.

สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตเพสโอส (G5) มากที่สุด 0.4637 มิลลิโมลาร์ในวันที่ 6 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และไคโตเฮกซะโอส (G6) มากที่สุด 0.6801 มิลลิโมลาร์ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14

## 4.3 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลอง การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารสูตร A medium ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ ในสภาวะที่ไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งส่วนผลการเจริญเติบโตของเชื้อ และการทดลองการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละไคตินโอลิโกเมอร์ ดังตารางที่ 4.7 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ตารางที่ 4.8 *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และตารางที่ 4.9 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ซึ่งจะมีรูปที่ 4.14 แสดงการแจริญและการเปลี่ยนแปลงของ pH ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 4.6 และรูปที่ 4.5 ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้งที่เหลือสิ้นสุดจากการเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ตารางที่ 4.7 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.06 | 0.012 | - | 0.1961 | 0.1231 | - | 0.3179 | 0.2074 | - |
| 4 | 6.93 | 0.005 | 0.4356 | - | 0.2507 | 0.1389 | 0.0978 | 0.2283 | - |
| 6 | 7.03 | 0.024 | - | - | - | - | - | 0.2682 | - |
| 8 | 7.02 | 0.011 | 0.1256 | - | 0.2128 | 0.6629 | 0.1072 | 0.2336 | - |
| 10 | 7.10 | 0.089 | - | - | 0.3519 | - | 0.2244 | 0.0980 | - |
| 12 | 7.18 | 0.118 | - | 0.1799 | 0.3230 | 0.1593 | - | 0.0514 | - |
| 14 | 7.36 | 0.104 | - | - | 0.2025 | 0.3708 | 0.3301 | 0.0477 | 1.183 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.08 | 0.019 | - | - | - | - | 0.2410 | 0.1892 | - |
| 4 | 6.94 | 0.004 | 0.5824 | - | - | 0.3920 | - | 0.0857 | - |
| 6 | 7.00 | 0.029 | 0.1107 | 0.1799 | 0.2332 | 0.1428 | 0.0953 | 0.2997 | - |
| 8 | 7.12 | 0.029 | 0.3345 | - | 0.1054 | 0.4348 | 0.2649 | 0.1898 | - |
| 10 | 7.15 | 0.059 | - | - | 0.1318 | 0.7947 | 0.0874 | - | - |
| 12 | 7.05 | 0.193 | - | 0.2103 | 0.2441 | - | 0.0688 | 0.0479 | - |
| 14 | 7.14 | 0.134 | - | 0.2729 | - | 0.5889 | 0.4659 | 0.3027 | 1.211 |

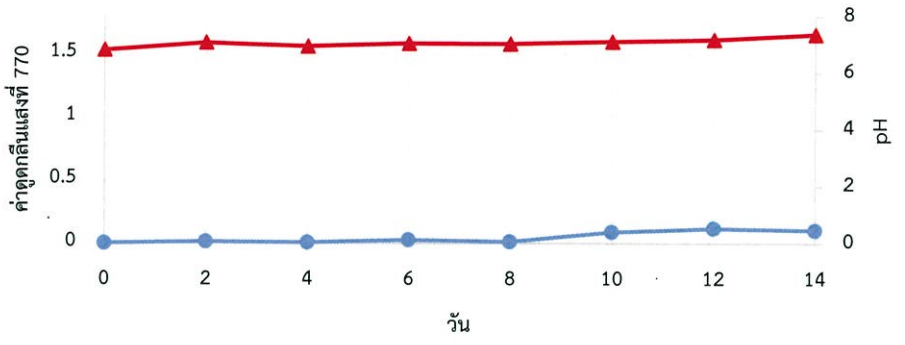
**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.9 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

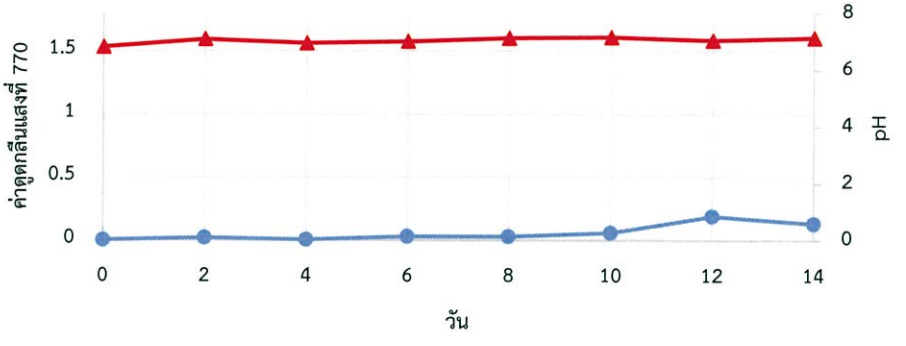
| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.07 | 0.005 | 0.4376 | - | - | 0.1866 | 0.4648 | 0.4699 | - |
| 4 | 7.01 | 0.030 | 0.9965 | 0.5067 | 0.2515 | - | 0.1362 | 0.0719 | - |
| 6 | 7.06 | 0.028 | 0.1898 | 0.8754 | 0.3241 | 0.7156 | 0.2117 | 0.0734 | - |
| 8 | 7.13 | 0.059 | - | 0.2094 | 0.1116 | 0.2230 | 0.1147 | 0.0752 | - |
| 10 | 7.12 | 0.071 | - | - | 0.0936 | 0.2921 | 0.2903 | 0.2712 | - |
| 12 | 6.95 | 0.158 | 0.1589 | 0.2513 | 0.3352 | - | 0.0809 | 0.2066 | - |
| 14 | 7.28 | 0.167 | - | 0.3037 | 0.1127 | 0.1920 | 0.2576 | 0.1400 | 1.171 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

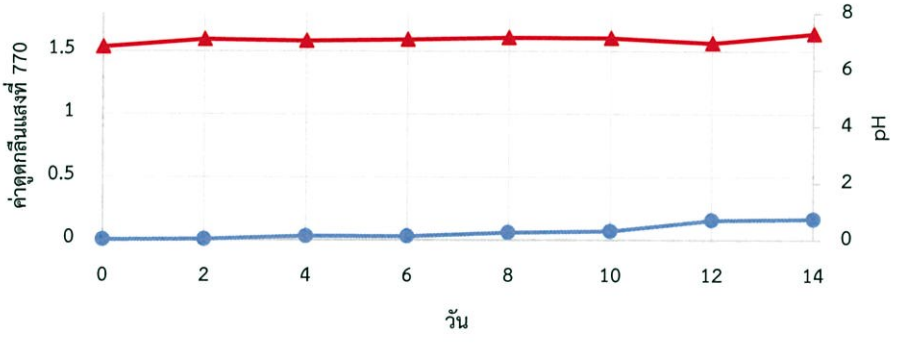
(ก)




(ข)

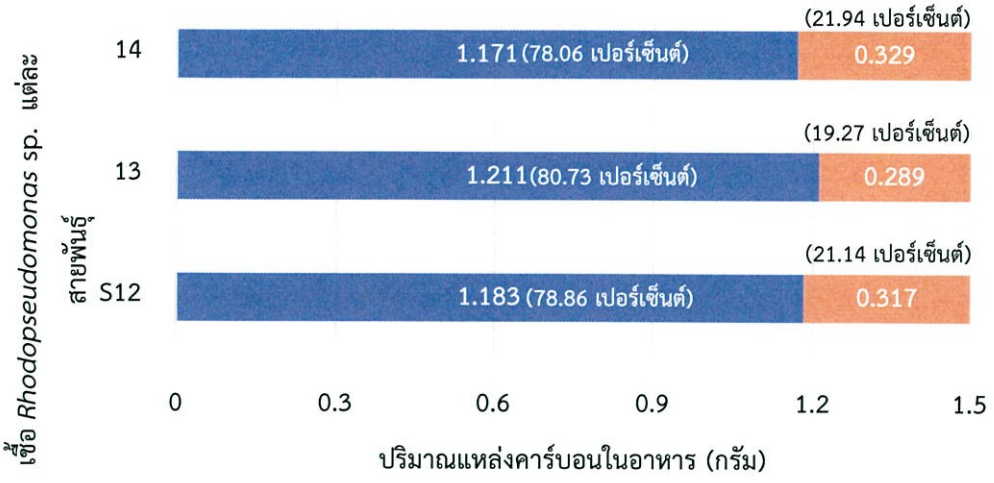



(ค)




**รูปที่ 4.5** การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน

▲ pH ● OD




**รูปที่ 4.6** ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้งที่เหลือสิ้นสุดจากการเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ปริมาณที่หายไป ปริมาณที่เหลือ

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ของการนำไคตินจากเปลือกกุ้งมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ โดยจะมีการเจริญสูงที่สุดของเชื้อ สายพันธุ์กลาย 13 ในวันที่ 12 OD อยู่ที่ 0.193 รองลงมาเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 0.118 เจริญได้น้อยที่สุดเป็นเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.167 ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงของค่า pH จะมีการเปลี่ยนแปลงประมาณที่ 7.0 - 7.3 ของทั้ง 3 เชื้อโดย *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มากที่สุดในวันที่ 14 pH อยู่ที่ 7.36 ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของท pH ในทุกเชื้อนั้นจะตกเล็กน้อยในวันที่ 4 เพิ่มขึ้นแล้วต่อไปเรื่อยๆ ในส่วนปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้ง หายไปในการทดลองวันที่ 14 เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 0.329 กรัม และในส่วนการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์นั้นจะมีทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์อยู่ 6 รูปแบบคือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1) มากที่สุด 0.9965 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตไบโอส (G2) มากที่สุด 0.8754 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตไตรโอส (G3) มากที่สุด 0.3519 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 10 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตเตตระโอส (G4) มากที่สุด 0.7947 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 10 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 , ไคโตเพสโอส (G5) มากที่สุด 0.4648 มิลลิโมลาร์ใน

วันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และไคโตเฮกซะโอส (G6) มากที่สุด 0.4699 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14

## 4.4 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลอง การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารสูตร A medium ที่มีไคตินสำเร็จรูปแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ ในสภาวะที่ไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งส่วนผลการเจริญเติบโตของเชื้อ และการทดลองการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละไคตินโอลิโกเมอร์ ดังตารางที่ 4.10 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ตารางที่ 4.11 *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และตารางที่ 4.12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ซึ่งจะมีรูปที่ 4.7 แสดงการแจริญและการเปลี่ยนแปลงของ pH ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และรูปที่ 4.8 ปริมาณไคตินสำเร็จรูปที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อ ใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้เจริญ

ตารางที่ 4.10 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.25 | 0.009 | 0.3092 | 1.9556 | 0.1234 | 0.0981 | - | 0.2932 | - |
| 4 | 7.15 | 0.011 | - | 3.3254 | 0.2072 | 0.3937 | - | - | - |
| 6 | 7.24 | 0.020 | 0.3463 | 2.3034 | 0.2046 | 0.2578 | - | 0.2732 | - |
| 8 | 7.31 | 0.034 | 0.2665 | 0.8988 | 0.5772 | 0.1059 | 0.0989 | 0.3468 | - |
| 10 | 7.26 | 0.039 | 0.3904 | 2.2136 | 0.2419 | 0.2015 | 0.0795 | 0.0894 | - |
| 12 | 7.09 | 0.029 | 2.1610 | 2.2136 | 0.1494 | - | - | - | - |
| 14 | 7.50 | 0.054 | 2.2956 | 2.8437 | 0.0759 | - | 0.1172 | 0.1384 | 0.716 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.11 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.22 | 0.056 | - | 2.4037 | 0.1016 | 0.2208 | 0.1397 | - | - |
| 4 | 7.15 | 0.031 | 1.0731 | 3.3262 | 0.2267 | 0.6221 | 0.3514 | - | - |
| 6 | 7.28 | 0.050 | - | 2.2532 | 0.1154 | 0.3016 | 0.2068 | - | - |
| 8 | 7.37 | 0.087 | - | 2.7964 | 0.1631 | 0.1679 | 0.2509 | 0.0497 | - |
| 10 | 7.34 | 0.091 | - | 2.4111 | 0.2274 | 0.1486 | 0.3956 | 0.0478 | - |
| 12 | 7.00 | 0.281 | - | 2.2363 | 0.1000 | 0.5830 | 0.1637 | 0.2235 | - |
| 14 | 7.43 | 0.336 | - | 7.0184 | 0.1006 | 0.1332 | 0.0985 | 0.0968 | 0.603 |

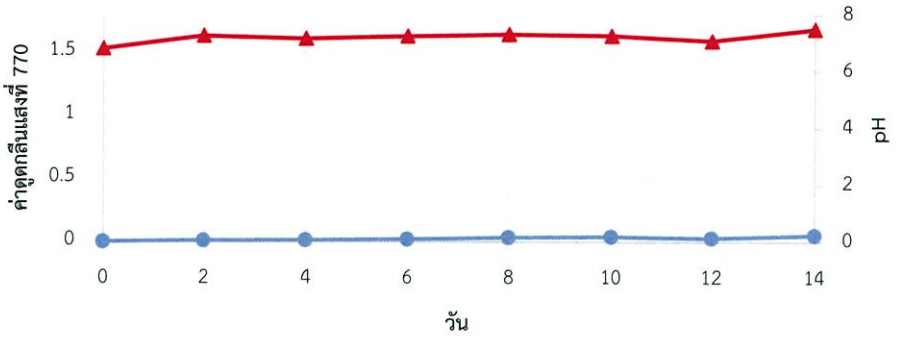
**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.12 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน

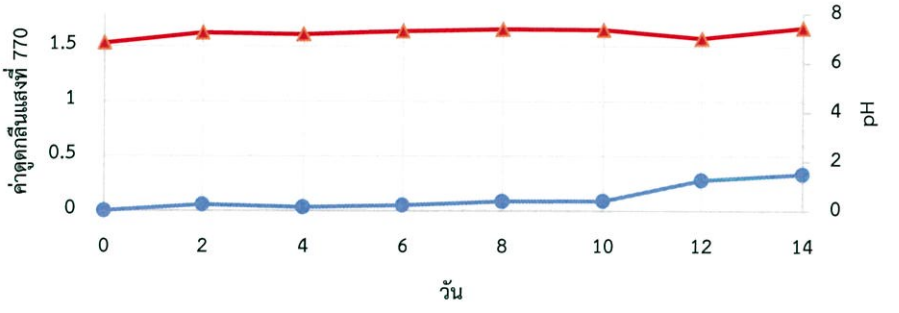
| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7.25 | 0.082 | - | 3.1966 | 0.1462 | 0.1534 | - | 0.2300 | - |
| 4 | 7.26 | 0.036 | - | 2.1354 | 0.0951 | 0.4802 | 0.3788 | 0.4504 | - |
| 6 | 7.34 | 0.074 | - | 3.2195 | 0.1013 | 0.5692 | 0.0740 | 0.2179 | - |
| 8 | 7.00 | 0.109 | - | 2.2187 | 0.3310 | 0.3367 | 0.0927 | 0.0407 | - |
| 10 | 7.12 | 0.138 | - | 4.1517 | 0.1939 | 0.3547 | - | 0.2079 | - |
| 12 | 7.15 | 0.273 | - | 2.3395 | 0.0915 | 0.2630 | 0.3894 | 0.2123 | - |
| 14 | 7.46 | 0.364 | - | 2.4548 | 0.2389 | 0.5410 | 0.4487 | 0.4747 | 0.708 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

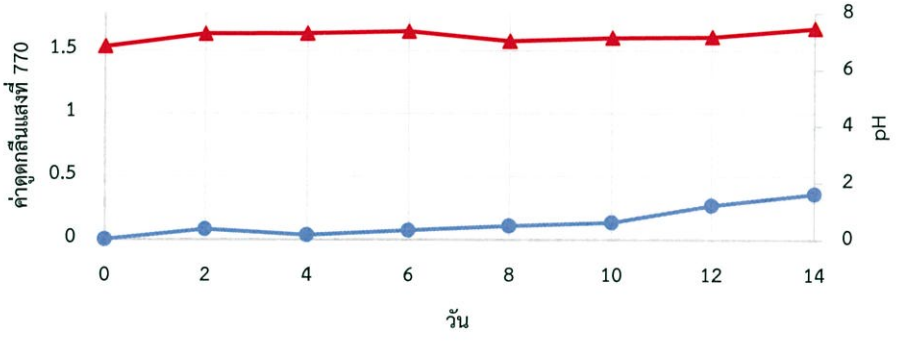
(ก)




(ข)

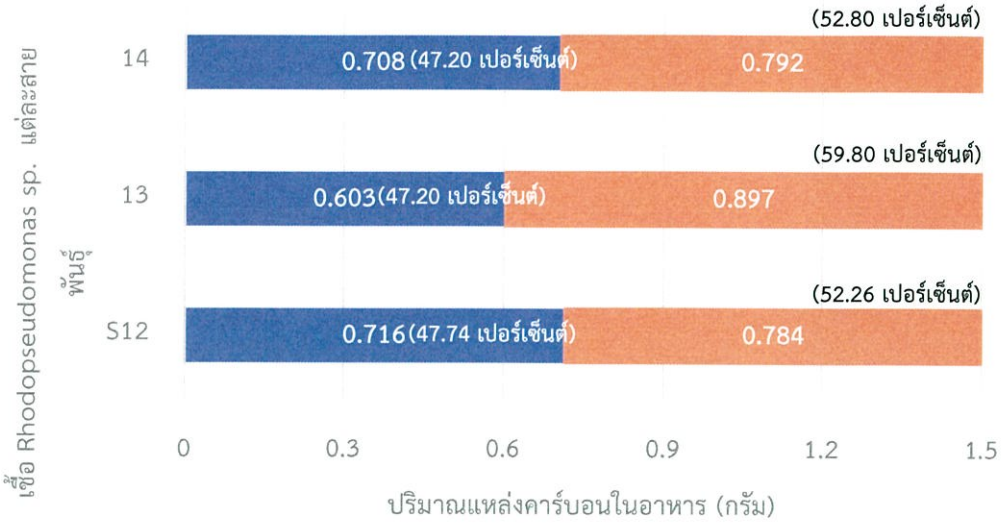



(ค)




**รูปที่ 4.7** การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน

▲ pH ● OD




**รูปที่ 4.8** ปริมาณไคตินสำเร็จรูปที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อ ใน 14 วัน ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้เจริญ ปริมาณที่หายไป ปริมาณที่เหลือ

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ของการนำไคตินสำเร็จรูปมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องโดยจะมีการเจริญสูงสุดของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.364 รองลงมาของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ในวันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.336 เจริญได้น้อยที่สุดเป็นเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มีการเจริญน้อยที่สุด OD อยู่ที่ 0.054 ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงของค่า pH จะมีการเปลี่ยนแปลงประมาณอยู่ที่ 7.2 - 7.4 ของทั้ง 3 เชื้อโดย *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มากที่สุดในวันที่ 14 pH อยู่ที่ 7.50 ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ pH ในทุกเชื้อนั้นจะตกเล็กน้อยในวันที่ 4 และวันที่ 12 แล้วเพิ่มขึ้น ในส่วนปริมาณไคตินสำเร็จรูปที่เหลือในการทดลองวันที่ 14 เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 0.897 กรัม และในส่วนการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์นั้นจะมีทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์อยู่ 6 รูปแบบคือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1) มากที่สุด 2.2956 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตไบโอส (G2) มากที่สุด 7.0184 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 , ไคโตไตรโอส (G3) มากที่สุด 0.5772 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 8 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตเตตระโอส (G4) มากที่สุด 0.6221 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 4 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 , ไคโตเพสโอส (G5) มากที่สุด

0.4487 มิลลิโมลาร์ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และไคโตเฮกซะโอส (G6) มากที่สุด 0.4747 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14

## 4.5 ศึกษาการเจริญและการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลอง การเลี้ยงเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ลงในอาหารสูตร A medium ที่มี colloidal chitin แหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณอาหาร 150 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 1,500 - 3,500 ลักซ์ ในสภาวะที่ไร้อากาศ (ปิดทับอาหารเหลวด้วยน้ำมันพืชที่ปลอดเชื้อ) เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งส่วนผลการเจริญเติบโตของเชื้อ และการทดลองการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละไคตินโอลิโกเมอร์ ดังตารางที่ 4.13 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ตารางที่ 4.14 *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และตารางที่ 4.15 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ซึ่งจะมีรูปที่ 4.9 แสดงการแจริญและการเปลี่ยนแปลงของ pH ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 และรูปที่ 4.10 ปริมาณ colloidal chitin ที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของ ที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ

ตารางที่ 4.13 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6.64 | 0.024 | 2.0900 | - | 0.1293 | - | - | 0.6187 | - |
| 4 | 7.02 | 0.602 | - | 0.3063 | - | 0.1433 | 0.2766 | 0.3330 | - |
| 6 | 6.95 | 1.587 | 0.9038 | 0.4257 | 0.2713 | 0.1642 | 0.1008 | 0.0730 | - |
| 8 | 6.98 | 0.290 | - | 0.2880 | - | 0.1656 | 0.2788 | 0.2133 | - |
| 10 | 6.88 | 0.244 | - | - | 0.2080 | - | 0.2585 | 0.3053 | - |
| 12 | 6.93 | 0.275 | 0.1084 | 0.1610 | 0.0996 | 0.1746 | 0.2333 | 0.3806 | - |
| 14 | 7.32 | 1.058 | 1.0527 | 0.3538 | - | 0.4331 | 0.2445 | 0.3624 | 0.362 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

**ตารางที่ 4.14** ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6.70 | 0.013 | 0.4761 | 0.1710 | - | 0.7552 | 0.2850 | 0.0771 | - |
| 4 | 6.97 | 0.672 | 1.2785 | 0.7113 | 0.2125 | 0.3910 | 0.1836 | 0.3397 | - |
| 6 | 6.84 | 0.588 | - | 0.2002 | 0.1274 | - | 0.0760 | 0.3107 | - |
| 8 | 6.87 | 0.361 | 0.3279 | - | 0.2621 | 0.2139 | 0.2079 | 0.0530 | - |
| 10 | 6.60 | 0.402 | 0.8781 | - | 0.0997 | 0.1379 | - | 0.1833 | - |
| 12 | 6.82 | 0.570 | 0.3456 | - | 0.0956 | - | 0.2167 | 0.4418 | - |
| 14 | 7.17 | 0.819 | 0.3410 | - | 0.0937 | - | 0.2567 | 0.2424 | 0.363 |

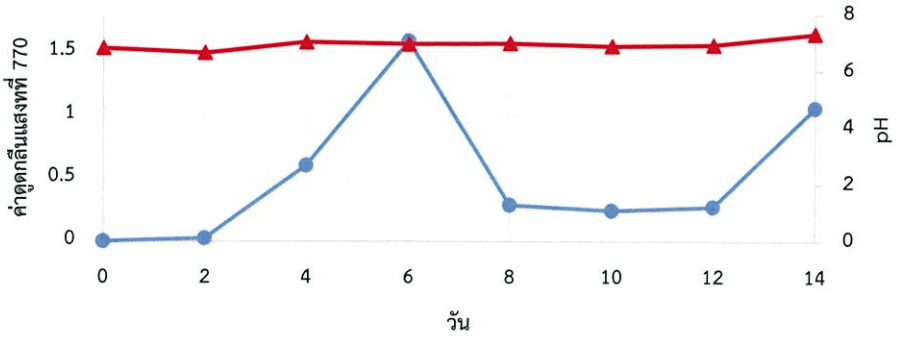
**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

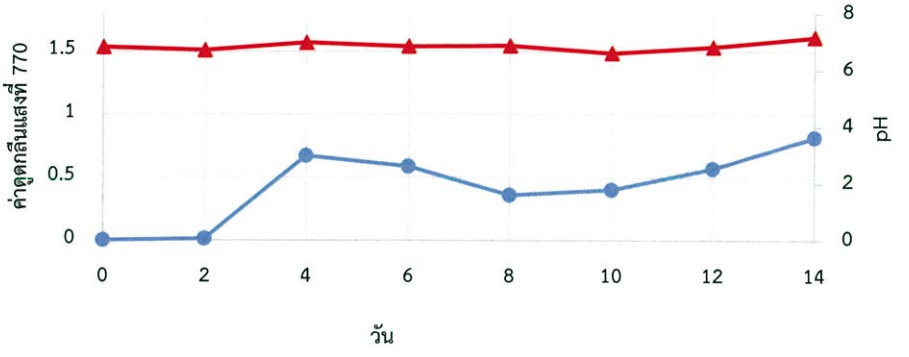
| วันที่ | pH | OD | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | ปริมาณที่เหลือ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 6.82 | 0.084 | 0.1254 | - | 0.1072 | 0.3230 | 0.2389 | 0.1581 | - |
| 4 | 6.93 | 0.350 | 0.2900 | 0.1989 | 0.0932 | - | 0.1616 | 0.2052 | - |
| 6 | 6.88 | 0.890 | - | 0.2642 | 0.0958 | 0.4143 | 0.2258 | 0.4082 | - |
| 8 | 6.90 | 0.511 | - | 0.1850 | 0.1213 | 0.7163 | - | 0.3342 | - |
| 10 | 6.86 | 0.672 | - | 0.2014 | 0.1410 | 0.1294 | 0.0971 | 0.2972 | - |
| 12 | 6.89 | 0.605 | - | 0.4649 | 0.2535 | 0.1726 | 0.0770 | 0.2968 | - |
| 14 | 7.30 | 1.350 | - | 0.7703 | - | 0.1293 | 0.2784 | 0.4422 | 0.495 |

**หมายเหตุ ความยาวคลื่นที่ 770 (OD), เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1), ไคโตไบโอส (G2), ไคโตไตรโอส (G3), ไคโตเตตระโอส (G4), ไคโตเพสโอส (G5), ไคโตเฮกซะโอส (G6) และ G1-G6 มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์

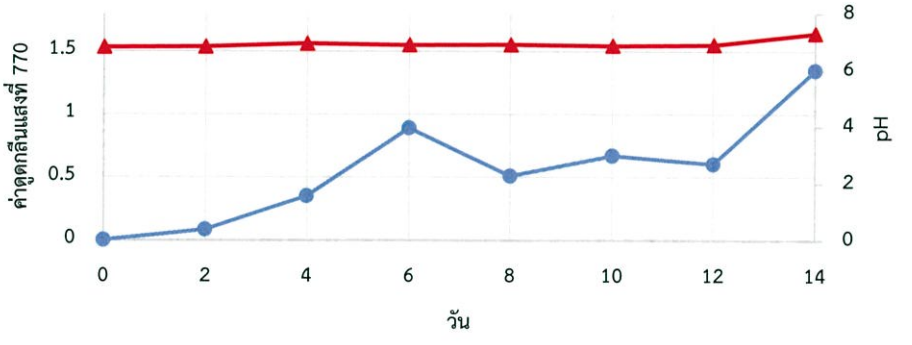
(ก)




(ข)

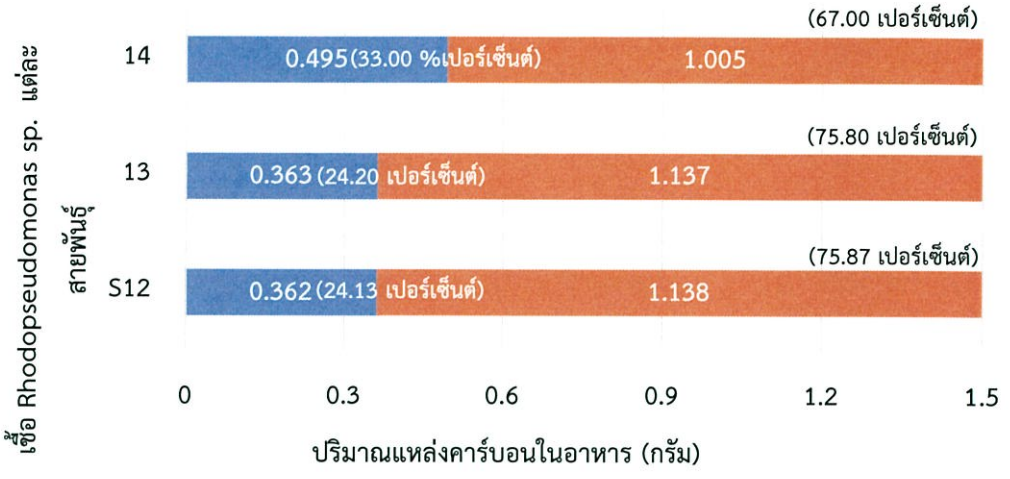



(ค)




**รูปที่ 4.9** การเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 (ก) *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 (ข) และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 (ค) ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน

▲ pH ● OD




**รูปที่ 4.10** ปริมาณ colloidal chitin ที่เหลือสิ้นสุดจากการเลี้ยงเชื้อใน 14 วัน ของ ที่เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่นำไปใช้ในการเจริญ ปริมาณที่หายไป ปริมาณที่เหลือ

จากผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ของการนำ colloidal chitin มาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอโดยจะมีการเจริญสูงในวันที่ 6 และ 14 โดยเชื้อที่เจริญดีที่สุดคือเป็นเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 6 OD อยู่ที่ 1.587 รองลงมา เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 วันที่ 14 OD อยู่ที่ 0.815 และเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 OD อยู่ที่ 1.350 ซึ่งค่า pH มีการเปลี่ยนแปลงประมาณที่ 6.6 – 7.3 ทั้ง 3 เชื้อโดยค่า pH จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากน้อยไปมากซึ่งเชื้อที่มี pH มากที่สุดคือเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 14 อยู่ที่ 7.32 ในส่วนปริมาณ colloidal chitin ที่เหลือในการทดลองวันที่ 14 เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 1.138 กรัม และในส่วนการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์นั้นจะมีทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์อยู่ 6 รูปแบบคือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (G1) มากที่สุด 2.0900 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตไบโอส (G2) มากที่สุด 0.7703 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 14 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 , ไคโตไตรโอส (G3) มากที่สุด 0.2713 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 6 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 , ไคโตเตตระโอส (G4) มากที่สุด 0.7552 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 , ไคโตเพสโอส (G5) มากที่สุด 0.2850 มิลลิโมลาร์

ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และไคโตเฮกซะโอส (G6) มากที่สุด 0.6187 มิลลิโมลาร์ ในวันที่ 2 ของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12

# บทที่ 5

# สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และสายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ เปลือกกุ้งบด เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน ไคตินจากเปลือกกุ้ง ไคตินสำเร็จรูป และ colloidal chitin โดยใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนทั้ง 5 ชนิด เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะไร้อากาศ ให้แสง 1,500-3,500 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงด้วยวิธีสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ (ภาคผนวก ข) และการเปลี่ยนแปลงค่า pH จากผลการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และสายพันธุ์กลาย 13 และ 14 ที่แตกต่างกันไปในแต่ละแหล่งคาร์บอน โดยในส่วนการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 1.587 ในวันที่ 6 เจริญได้ดีรองลงมาเป็นอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.3150 ในวันที่ 14 รองลงมาเป็นอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.118 ในวันที่ 12 รองลงมาในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน OD อยู่ที่ 0.084 ในวันที่ 14 และเจริญได้น้อยที่สุดเป็นของอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.054 ในวันที่ 14 ต่อมาในส่วนการเจริญของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.819 ในวันที่ 14 เจริญได้ดีรองลงมาเป็นอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.336 ในวันที่ 14 รองลงมาเป็นในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.323 ในวันที่ 14 รองลงมาเป็นอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.232 ในวันที่ 12 และเจริญได้น้อยที่สุดเป็นอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.193 ในวันที่ 12 และสุดท้ายในส่วนของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี colloidal chitin เป็ฯแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 1.35 ในวันที่ 14 เจริญได้ดีรองลงมาเป็นอาหารที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.364 ในวันที่ 14 รองลงมาเป็นอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.334 ในวันที่ 14 รองลงมาเป็นอาหารที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน OD อยู่ที่ 0.167 ในวันที่ 14 และเจริญได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอนค่า OD อยู่ที่ 0.161 ในวันที่ 12

ในการเปลี่ยนแปลงของ pH มีแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงจากน้อยในช่วงวันแรก และเพิ่มขึ้นจนเรื่อยๆ ในวันสุดท้ายของการทดลองในแหล่งคาร์บอนที่มีเปลือกกุ้งบด ไคตินจากเปลือกกุ้ง ไคตินสำเร็จรูป และ colloidal chitin ซึ่งค่า pH อยู่ในช่วง 6.6 - 7.5 แต่ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งบด

กำจัดโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่สูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น ในช่วง pH ประมาณ 7.7 – 7.9 โดย ค่า pH ที่สูงสุดอยู่ที่ 7.96 เป็นของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 4

ในส่วนปริมาณที่หายไปของแหล่งคาร์บอนนั้นแหล่งคาร์บอนที่หายไปมากที่สุดเป็นของ colloidal chitin จากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 มีปริมาณที่หายไปมากที่สุด 1.138 กรัม ต่อมาในไคตินสำเร็จรูปปริมาณที่หายไปมากที่สุด จากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 มีปริมาณที่หายไป 0.897 กรัม ต่อมาในไคตินจากเปลือกกุ้งปริมาณที่หายไปมากที่สุด จากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 มีปริมาณที่หายไป 0.329 กรัม ปริมาณที่หายไปมากที่สุดของเปลือกกุ้งบด จากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 และ สายพันธุ์กลาย 14 มีปริมาณหายไปอยู่ที่ 0.272 กรัม และสุดท้ายในเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนปริมาณที่หายไปมากที่สุดเป็น จากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 และ 14 มีปริมาณที่หายไปอยู่ที่ 0.183 กรัม

เมื่อวิเคราะห์การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ทั้ง 6 รูปแบบด้วยวิธี HPLC จากน้ำหมักที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในอาหารเหลวสูตร A medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่า

**ตารางที่ 5.1** สรุปผลการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ทั้ง 6 รูปแบบ

| | **ปริมาณที่ได้ (มิลลิโมลาร์)** | **สภาวะ** |
|---|---|---|
| G1 | 6.7925 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 2 โดยมีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน |
| G2 | 7.0184 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ในวันที่ 14 โดยมีไคติสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน |
| G3 | 1.6474 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 10 โดยมีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน |
| G4 | 0.8456 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 2 โดยมีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน |
| G5 | 0.5367 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ในวันที่ 12 โดยมีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน |
| G6 | 0.6801 | เชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ในวันที่ 14 โดยมีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน |

ซึ่งผลการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของไคตินโอลิโกเมอร์นั้น ส่งผลมาจากปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อที่มีผลในการผลิตเอนไซม์ และความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณองค์ประกอบภายในแหล่ง

คาร์บอนที่แตกต่างกันทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ในการย่อยสลายไคตินแตกต่างกันออกไป (Shigemasa และคณะ, 1994 ; Svitil และคณะ, 1997) รวมถึงชนิดเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมานั้นอาจมีการตัดแบบสุ่มทำให้ได้ไคตินโอลิโกเมอร์แต่ละรูปแบบที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการย่อยสลายไคตินจากเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์อาจเกิดขึ้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อและแหล่งคาร์บอนที่ใช้

# บทที่ 6
# วิจารณ์ผลการทดลอง

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อนั้นได้เก็บตัวอย่างมาวัดในทุกๆ 2วัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงเชื้อเป็นของแข็งซึ่งทำให้เกิดความขุ่นจึงไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้โดยตรง จึงใช้วิธีการวัดค่าแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์แทน ซึ่งวิธีนี้อาจเกิดความคลาดเคลื่อนของผลได้ เพราะ ปริมาณของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ที่อยู่ภายในเชื้อนั้นอาจสกัดออกมาได้ไม่หมด หรือ อีกประการหนึ่งคือการเสื่อมของแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ ทำให้ผลที่ได้เกิดความคลาดเคลื่อน

จากผลการตรวจวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ไคตินโอลิโกเมอร์ของแต่ละแหล่งคาร์บอน พบว่าแต่ละแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์แตกต่างกัน เช่น ในแหล่งคาร์บอนไคตินจากเปลือกกุ้งที่ผลิตขึ้นเองกับแหล่งคาร์บอนไคตินสำเร็จรูป โดยไคตินสำเร็จรูปจะให้ไคตินโอลิโกเมอร์มากกว่าไคตินจากเปลือกกุ้ง ซึ่งผลแตกต่างกันอย่างชัดเจน อาจเกิดจากกระบวนการในการผลิตที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ผลิตขึ้นเองนั้นอาจกำจัดสารที่ปะปนอยู่ทั้งในเปลือกกุ้งบดและสารเคมีในขั้นตอนต่างๆ ไม่ได้ทั้งหมด จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อย แต่แหล่งคาร์บอนไคตินสำเร็จรูปเป็นการผลิตที่ได้มาตรฐาน ดังนั้นเชื้อจึงสามารถย่อยและได้ผลิตภัณฑ์ไคตินโอลิโกเมอร์ค่อนข้างมาก

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า colloidol chitin เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด (huang และคณะ, 2007) ทำให้เชื้อใช้ไปมากที่สุด แต่กลับได้ผลิตภัณฑ์ไคตินโอลิโกเมอร์ออกมาน้อย เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ไป ซึ่งอาจเกิดจากการที่เชื้อเจริญเติบได้รวดเร็วจึงทำให้เชื้อใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในการเจริญเติบโตด้วย และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ไคตินโอลิโกเมอร์ที่ได้มีปริมาณน้อยนั่นเอง

# เอกสารอ้างอิง


กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2557. สถิติผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทะเล. [Online]. Available:http://www.fisheries.go.th/it-stat/images/stories/marine_shrimp/Shrimp2557.pdf

ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2559. ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์. [Online]. Available: http://www.sci.nu.ac.th/Biology/Biodiversity/%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%97%E0%B8%B5%E0%B9%88%203/chap3.htm

ปิยบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2544. "ไคติน-ไคโตซาน." หน้า 9-10. ใน เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน. กรุงเทพฯ : ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ.

รักชนก ทุยเวียง. 2559. การทำบัญชีสมดุลสินค้าของกุ้งไทย. [Slide]. กรุงเทพฯ : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

วรรณวิษา ชูแดง, ศุภรัตน์ ใจงาม และ สุกัญญา สายสุวรรณ. 2553 “การผลิตเซลล์ไฟฟ้าทางชีวภาพโดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และ *Saccharomy cerevisiae*.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริกรณ์ เจียรพสุอนันต์. 2545. ไคโตซานและการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร. [Online]. Available: http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2/private/picture.asp?temp=15637

สมชาย ไกรรักษ และ ธีระพันธเจริญสาคร. 2549. การผลิตเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีนและไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาพร บุญวิเศษ และ ทานตะวัน พิรักษ์. 2554. การผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า (เซลลูเลสและเพคทิเนส) และผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์. ใน การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2559. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง. [Online]. Available: http://www.nia.or.th/download/activity/20060120_presentation.pdf

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สุกัญญา ยาเสร็จ. 2554. การยืดอายุการเก็บรักษาไข่ไก่โดยเคลือบด้วยไคโตซานที่เตรียมจากการฉายรังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุพจน์ หารหนองบัว, สุวลี จันทร์กระจ่าง, ปราณี เลิศสุทธิวงศ์, กฤษณา ศิรเลิศมุกุล, ปราณี รัตนวลีดิโรจน์ และ สุทธิรัตน์ ลิศนันท์. 2546. การศึกษาวิเคราะห์สถานภาพของโรงงานผู้ผลิตและตลาดการใช้ไคติน และไคโตซาน. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ร่วมกับ สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร ห้วยหงษ์ทอง. 2548. การเตรียมเรซินไคโตซานสำหรับการขจัดไอออนโลหะหนักในน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยกสาน และโกสุม สมัครรัตน. 2544. สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน. หนา 11-40. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสูการประยุกตใช้. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

อนันต์ บุญปาน, สิริแข พงษ์สวัสดิ์, ประภาพร พงษ์ไทย และ ศกุนตลา สายใจ. 2554. ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง ปู ยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้. [Online]. Available: http://www.news.rmutt.ac.th/archives/15676

Austin, P.R. and J.P. Zikakis. 1981. "Chitin: new facets of research." *Science*. 212 : 749-753.

Bowman, S. M. and Free, S. J. 2006. "The structure and synthesis of the fungal cell wall." *BioEssays*. 28(8) : 799-808

Brine. 1984. [Online]. Available : http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2887/7/267336_ch1.pdf

Dziril, M. H. Grib, H. Laribi-Habchi, N. Drouiche, N. Abdi, H. Lounici, A. Pauss, and Mameri, N2015. "Chitin oligomers and monomers production by coupling γ radiation and enzymatic hydrolysis." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015(26) Pages 396-401

Huang, X.J. Ge, D. and Zu, C.K. 2007. "Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization." *Eur. Polym. J.* 43 : 3710-3718

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Imhoff, J. F. 1992. "Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic baeteria" In Mann, N. H. and Carr, N. G. (ed.). Photosynthetic Prokaryotes. Vol.6. Plnum Press, Now York and Londan. pp. 53-92

Jeon, Y.J. Park, P.J. and Kim, S.K. 2001. "Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor." *Carbohydrate Polymers*. 44 : 71-76.

Kim, S.K. and N., Rajapakse. 2005. "Enzymatic production and biological activities of Chitosan oligosaccharides (COS)." Carbohydrate Polymers, 62 : 357-368.

Lindsay, G.J.H. 1984. "Distribution and function of digestive tract chitinolytic enzymes in fish." *J. Fish Biol*. 24, 529 – 536.

Mori, T. Okumura, M. Matsuura, M, Ueno, K. Tokura, S. Okamoto, Y, Minami, S, and Fujinaga, T. 1997. " Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro." *Biomaterials*. 18(13) : 947-951.

Musarrat, H. Mohammed, Peter, A. Williamsa, Olga, Tverezovskaya. 2013. "Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan" *Food Hydrocolloids*. 31(2) : 166–171

Nidheesh T, Suresh PV. 2015. "Optimization of conditions for isolation of high quality chitin from shrimp processing raw byproducts using response surface methodology and its characterization." *Journal of Food Science and Technology*.52(6) : 3812–3823.

Olliver, B. 1994. "Anaerobic bacteria from hypersaline environments." *Microbiol*. 58(1) : 27-38.

Park, P.J. Je, J.Y. Byun, H.G. Moon, S.H. and Kim, S. K. 2004. "Antimicrobial activity of heterochitosans and their oligosaccharides with different molecular weights." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14 : 317–323.

Pfenning, N. and Truper, H.G. 1989. "Anoxygenic phototrophic bacteria" pp. 1635-1682. In Staley, J.T. Bryant, M.P. Pfennig, N. and Holt, T.G. (eds.). Bergey's Manual of Systemetic

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Reese, TA. Liang, HE. Tager, AM. Luster, AD. Van Rooijen, N. Voehringer, D. and Locksley RM. 2007. "Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy." *Nature*. 447(7140) : 92-96.

Sashiwa, H. Fujishima, S. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Nuraki, M. Sukwattanasinitt, R. Pichyangkura, R. and Aiba, S. 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.

Satya Achanta. 2010. *Rhodopseudomonas palustris*. [Online]. Available : http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2010/R_palustris.html.

Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. 1993. "Chitinolyticenzymes : their contribution to basic and applied research." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9 : 468-475.

Shigemasa, Y. Saito, K. Sashiwa, H. and Saimoto, H. 1994. "Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins." *J. Biol*. 16 : 43-49.

Svitil, AL. Chadhain, S. Moore, JA. Kirchman, DL. 1997. "Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin." *Environ Microbiol*.63(2) : 408-13.

Tolaimate, A. Desbrieres, J. Rhazi, M. and Alagui, A. 2003. "Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties." *Polymer*. 44 : 7939–7952

Toni Gabaldón. 2013. [Online]. Available : http://big.crg.cat/comparative_genomics

# ภาคผนวก ก
# อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเหลวสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| เปลือกกุ้งบด | 10 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 10 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (Yeast extract) | 1 | กรัม |
| โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate) | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 1,000 | กรัม |

1.2 อาหารเหลวสูตร A medium ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน ประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| เปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีน | 10 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 10 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (Yeast extract) | 1 | กรัม |
| โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate) | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 1,000 | กรัม |

1.3 อาหารเหลวสูตร A medium ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| ไคตินจากเปลือกกุ้ง | 10 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 10 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (Yeast extract) | 1 | กรัม |
| โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate) | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 1,000 | กรัม |

1.4 อาหารเหลวสูตร A medium ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| ไคตินสำเร็จรูป | 10 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 10 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (Yeast extract) | 1 | กรัม |
| โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate) | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 1,000 | กรัม |

1.5 อาหารเหลวสูตร A medium ที่มี Colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| Colloidal chitin | 10 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4$) | 10 | กรัม |
| ยีสต์สกัด (Yeast extract) | 1 | กรัม |
| โมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate) | 10 | กรัม |
| น้ำกลั่น (Distilled water) | 1,000 | กรัม |

## 2. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ (แบคเทอริโอคลอโรฟิลล์)

**สารละลายอะซิโตนต่อเมทานอล 7 ต่อ 2**

นำสารละลายอะซิโตนมา 7 ส่วน มาผสมกับสารละลายเมทานอล 2 ส่วน

## 3. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

**อะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์**

| | | |
|---|---|---|
| อะซิโตไนไตรล์ | 700 | มิลลิลิตร |
| น้ำปราศจากไอออน (Deionization water) | 300 | มิลลิลิตร |

ผสมแล้วกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตรขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิลิตร (สมชาย และธีระพันธ์, 2549)

# ภาคผนวก ข

# วิธีทดสอบและการวิเคราะห์

## 1. การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

### การย้อมแกรมแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมา สเมียร์ (smear) เซลล์แบคทีเรียบนสไลด์ และตรึงเซลล์ (fixing) เซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2 ถึง 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมคริสตัล ไวโอเลต 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 ซับด้วยกระดาษหรือวางเอียง 45 องศา ปล่อยไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10×100 เท่า

## 2. การสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก แล้วนำไปสกัดแบคเทอริโอคลอโรฟิลล์ โดยการเติมสารผสมระหว่างอะซิโตนต่อเมทานอลอัตราส่วน 7 : 2 กับปริมาณของตัวอย่าง 1 : 1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องหมุนผสมสารในที่มืดเป็นเวลา 150 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 770 นาโมเมตร บันทึกผลการทดลอง (วรรณวิษา และคณะ, 2553)

## 3. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์และสับสเตรต

### การวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส 3 ส่วนผสมกับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Asahipak Shodex $NH_2P$-50 4E โดยมีอะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 210 นาโมเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

**การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนและไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC**

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

เตรียมสารละลายเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 2.042 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาณเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไคโตไบโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยชั่งไคโตไบโอส 4.246 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาณ

เตรียมสารละลายไคโตไตรโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยชั่งไคโตไตรโอส 6.276 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาณ

เตรียมสารละลายไคโตเตตระโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตเตตระโอส 8.31 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาณ

เตรียมสารละลายไคโตเพนโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรโดยชั่งไคโตเพนโอส 10.34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาณ

เตรียมสารละลายไคโตเฮกซะโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตเตตระโอส 12.37 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาณ

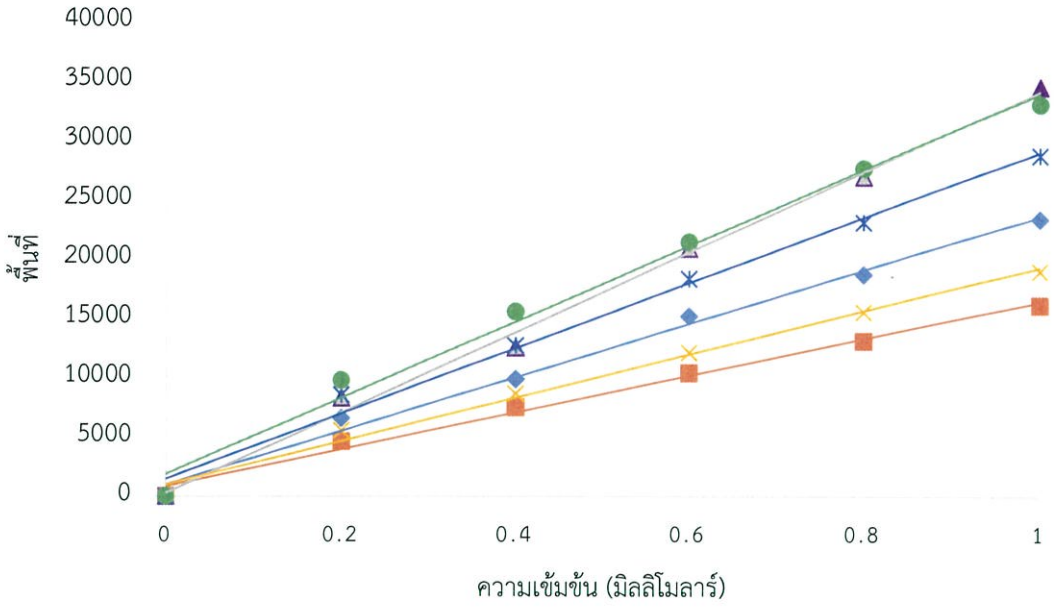
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

3. ผสมสารละลายมาตรฐานที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 3 ส่วนกับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน

4. กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

5. วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

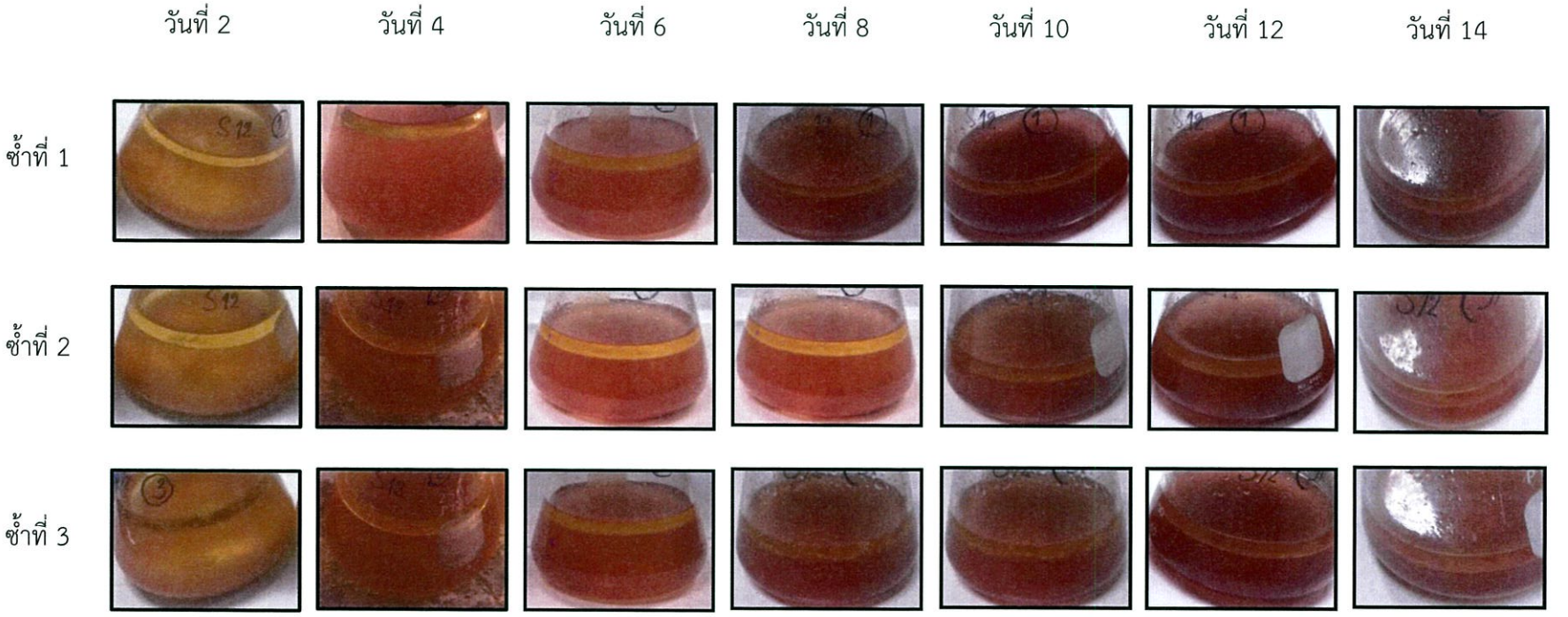
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y)



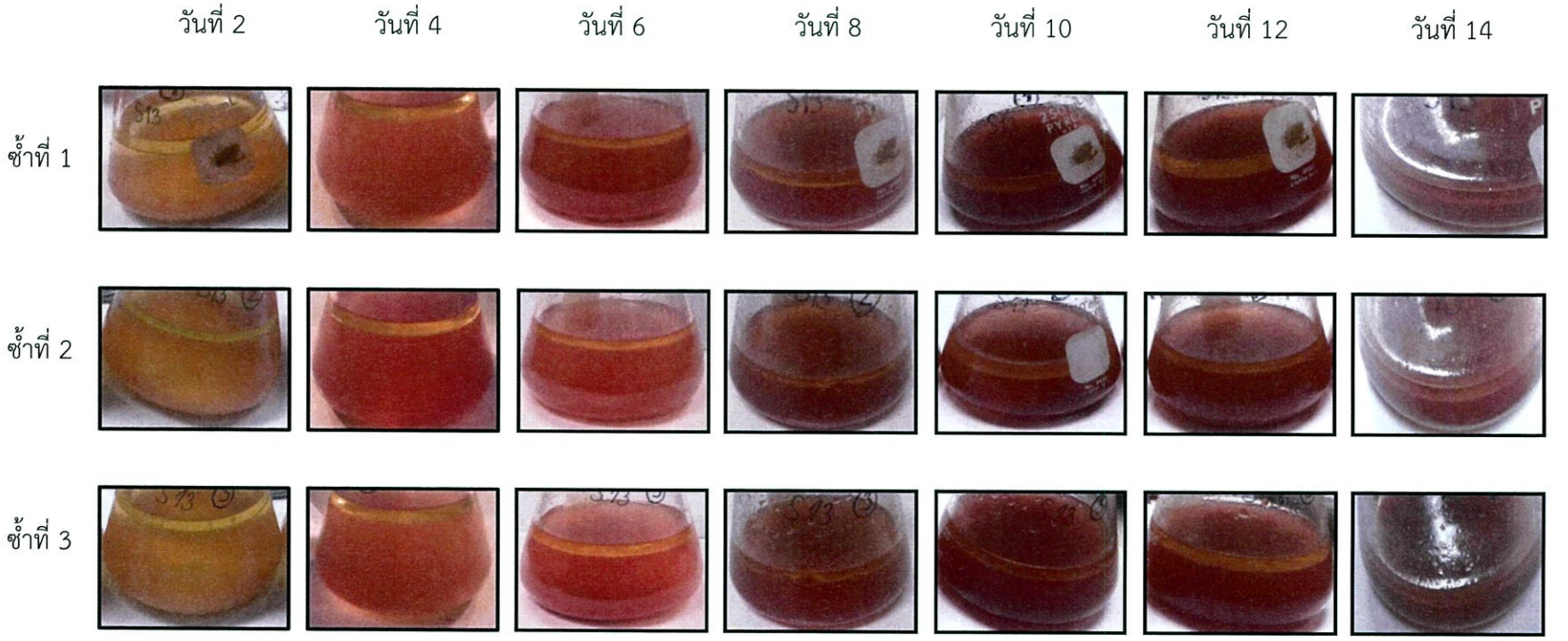

| | | |
|---|---|---|
| เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน | สมการเส้นตรง | (Y) = 22644x + 959.35 |
| | | $R^2$ = 0.9925 |
| ไคโตไบโอส | สมการเส้นตรง | (Y) = 15553x + 831.24 |
| | | $R^2$ = 0.9914 |
| ไคโตไตรโอส | สมการเส้นตรง | (Y) = 33856x + 259.46 |
| | | $R^2$ = 0.9955 |
| ไคโตเตเตระโอส | สมการเส้นตรง | (Y) = 18314x + 967.17 |
| | | $R^2$ = 0.9915 |
| ไคโตเพนโตส | สมการเส้นตรง | (Y) = 27574x + 1440 |
| | | $R^2$ = 0.9908 |
| ไคโตเฮกโซส | สมการเส้นตรง | (Y) = 32121x + 1847.7 |
| | | $R^2$ = 0.9900 |

# ภาคผนวก ค

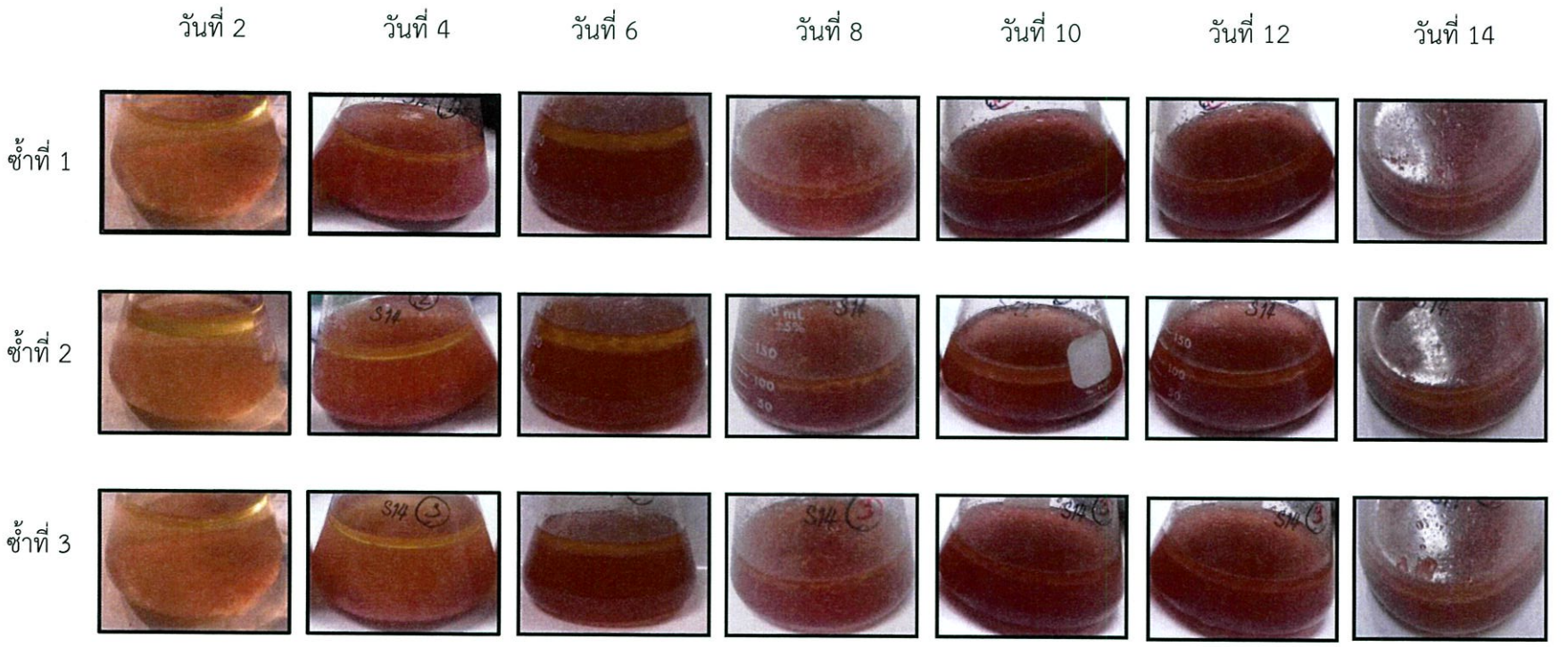
## รูปแสดงการทดลอง



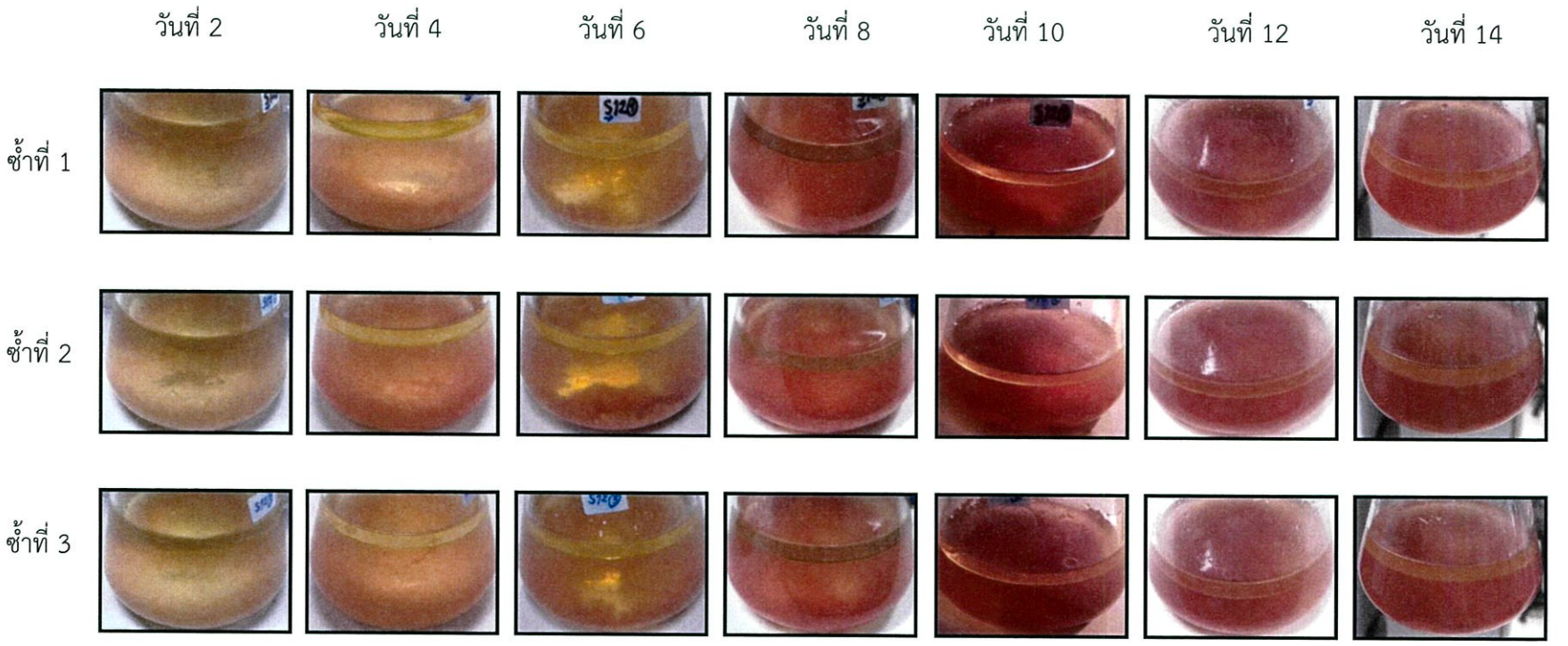

**รูปที่ 4.11** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน



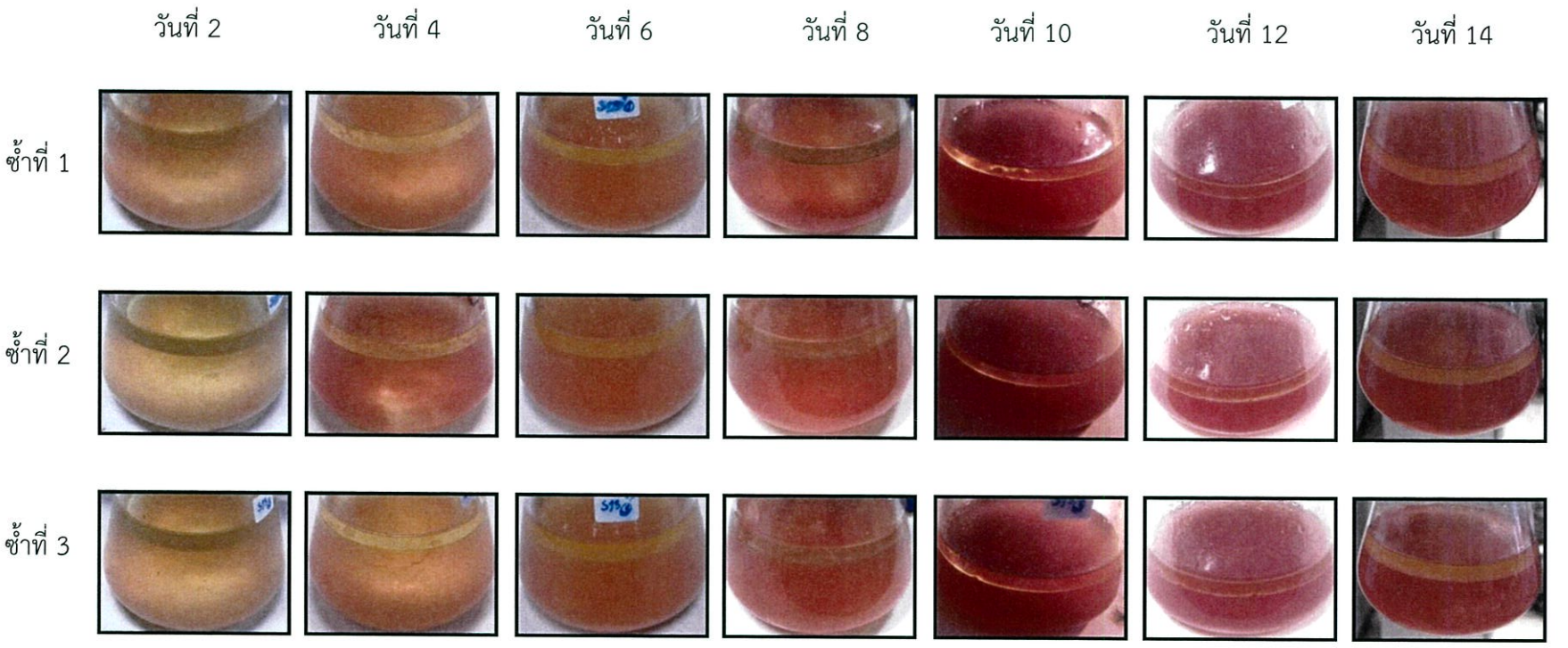

**รูปที่ 4.12** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน



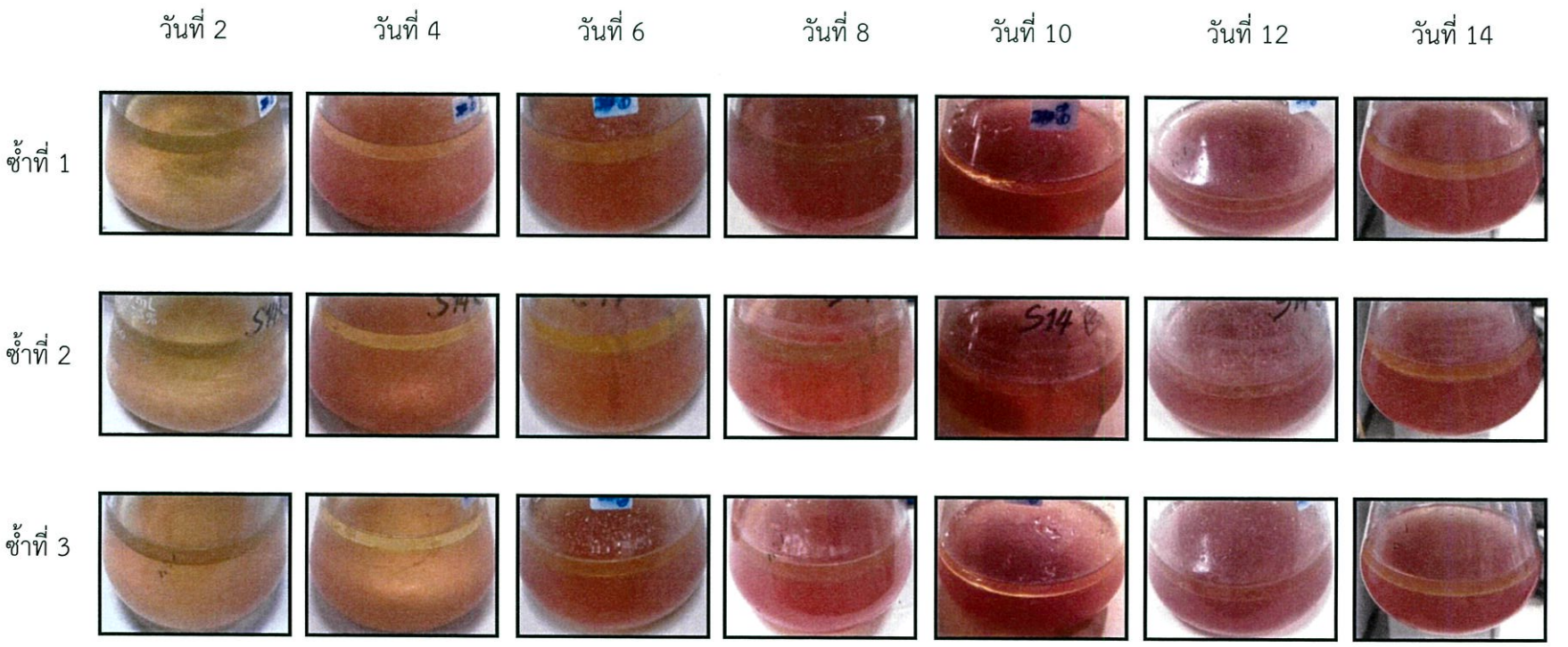

**รูปที่ 4.13** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน



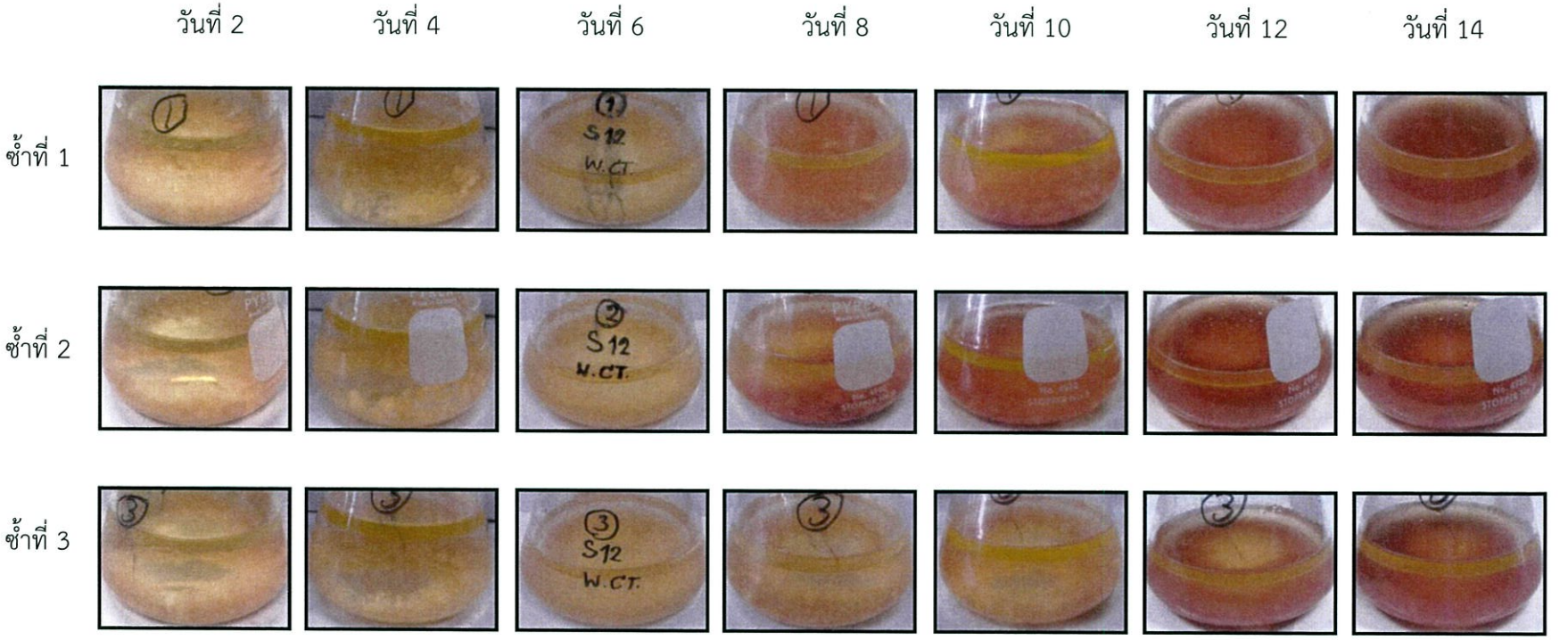

**รูปที่ 4.14** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน



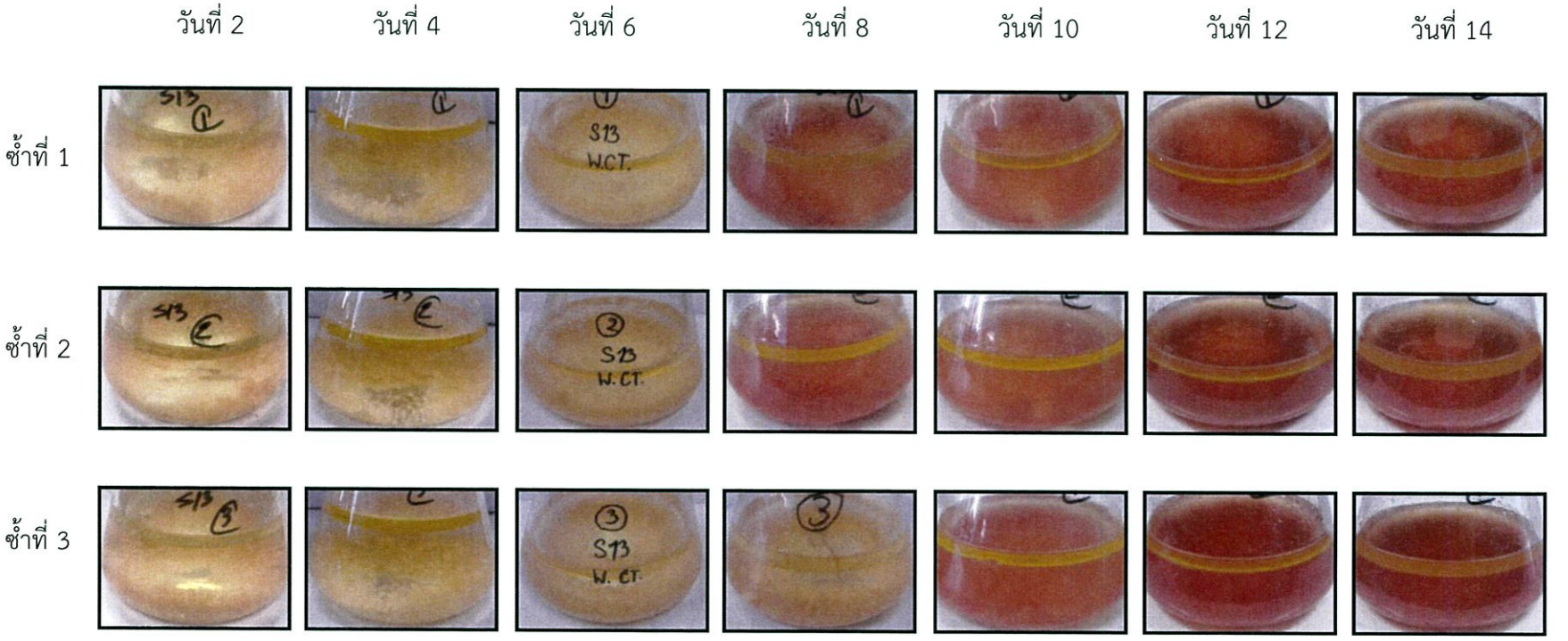

**รูปที่ 4.15** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน



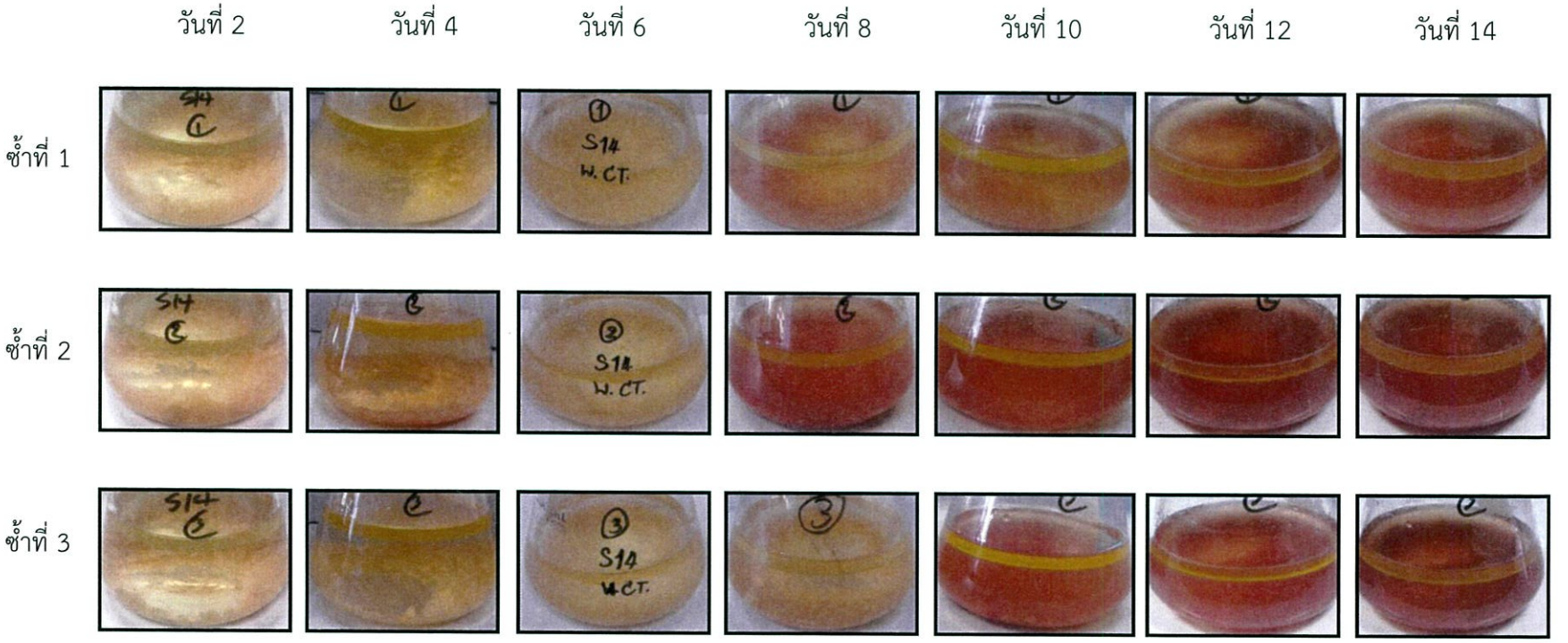

**รูปที่ 4.16** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีเปลือกกุ้งบดกำจัดโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน



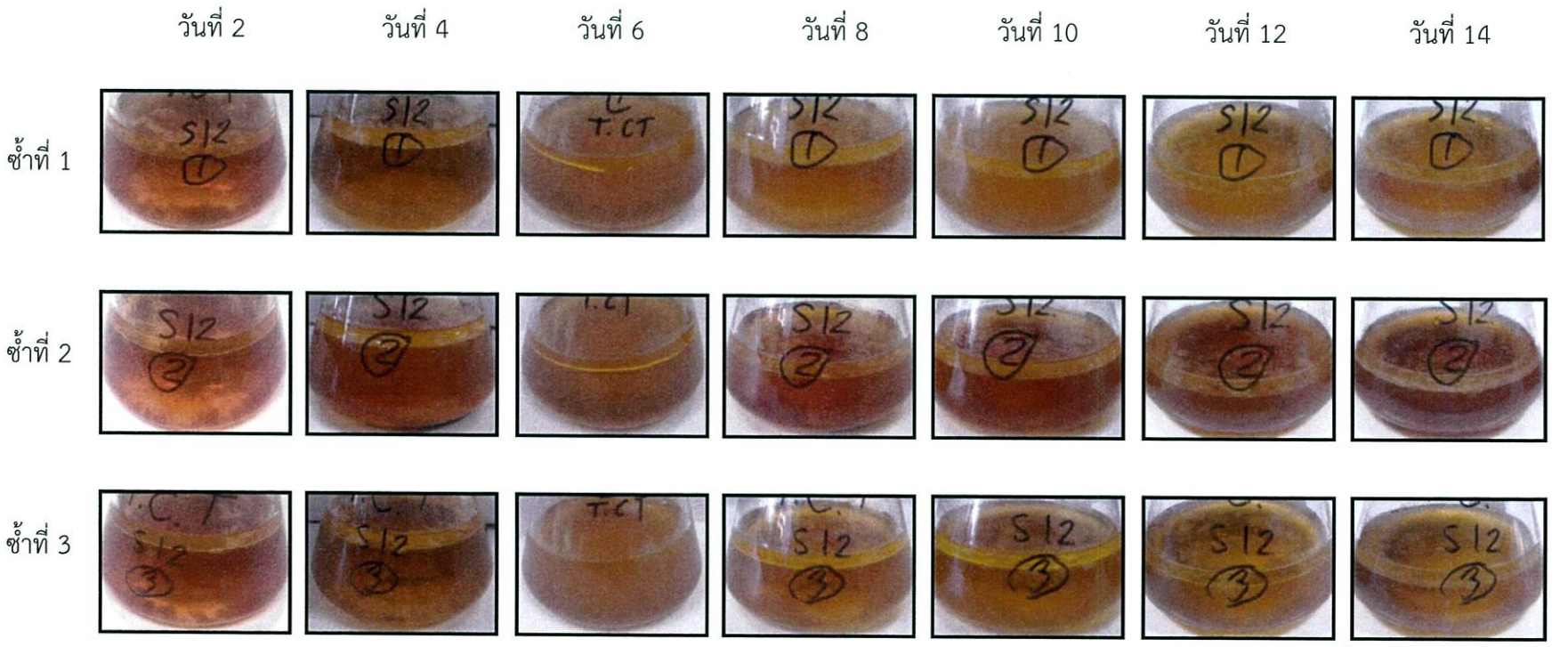

**รูปที่ 4.17** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน



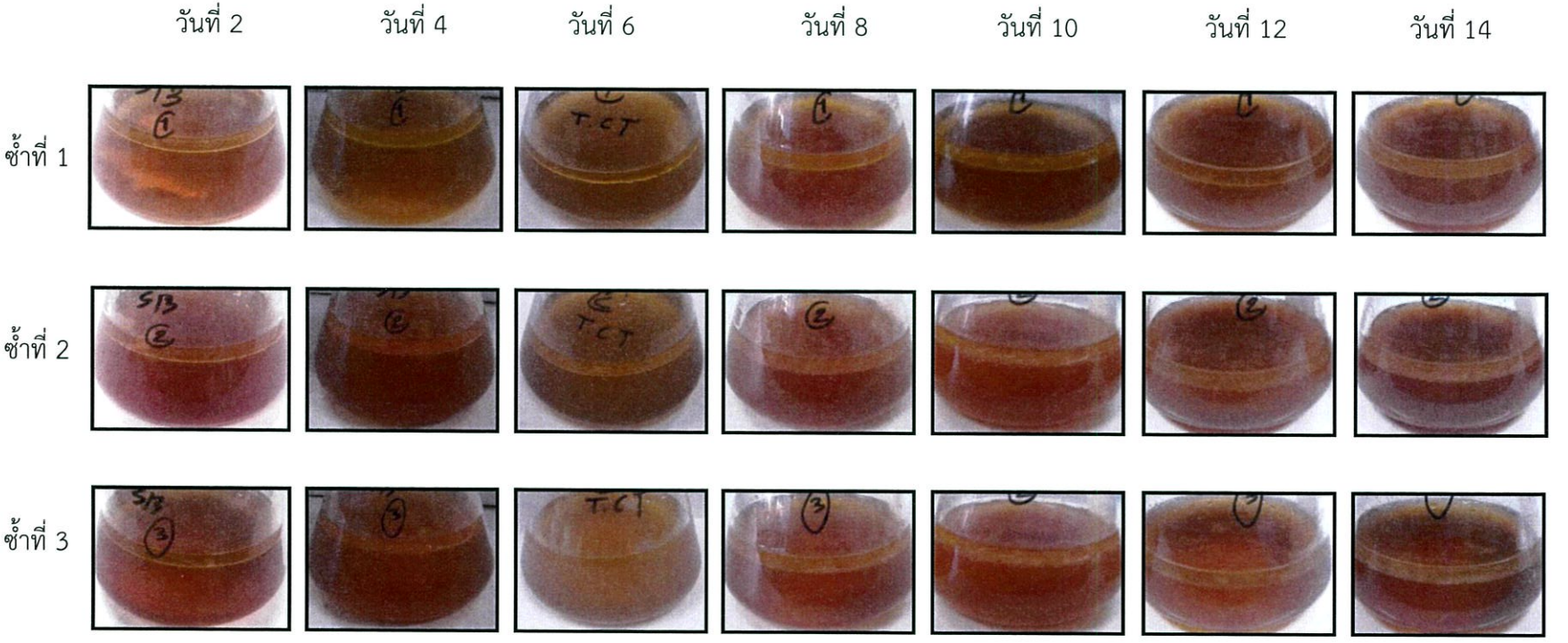

**รูปที่ 4.18** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน



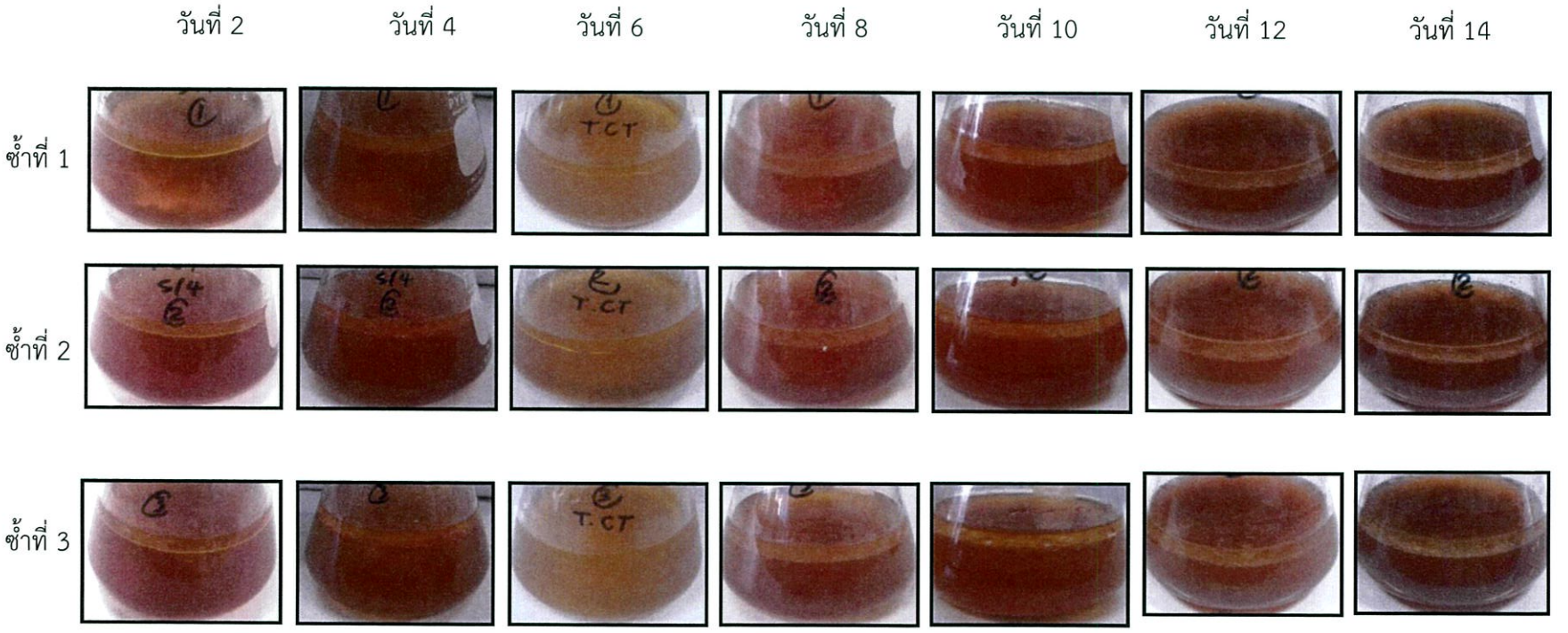

**รูปที่ 4.19** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีไคตินจากเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอน



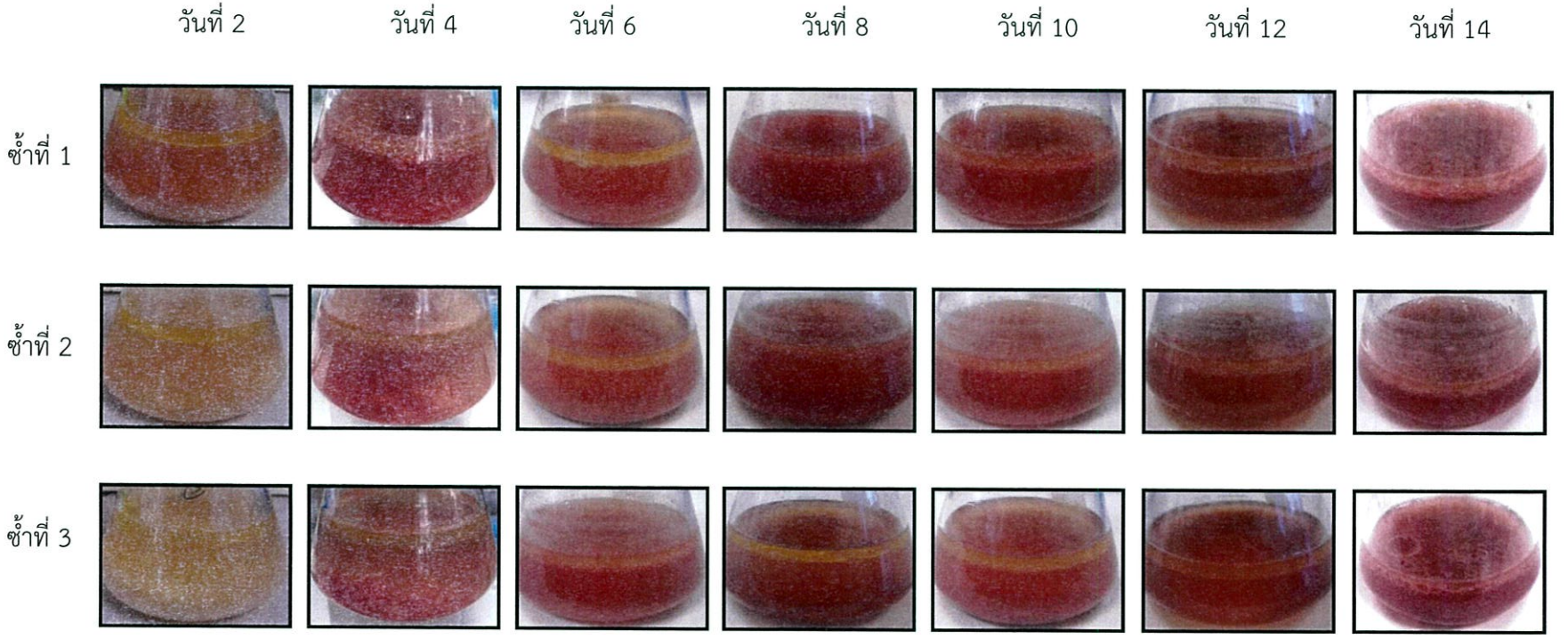

**รูปที่ 4.20** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน



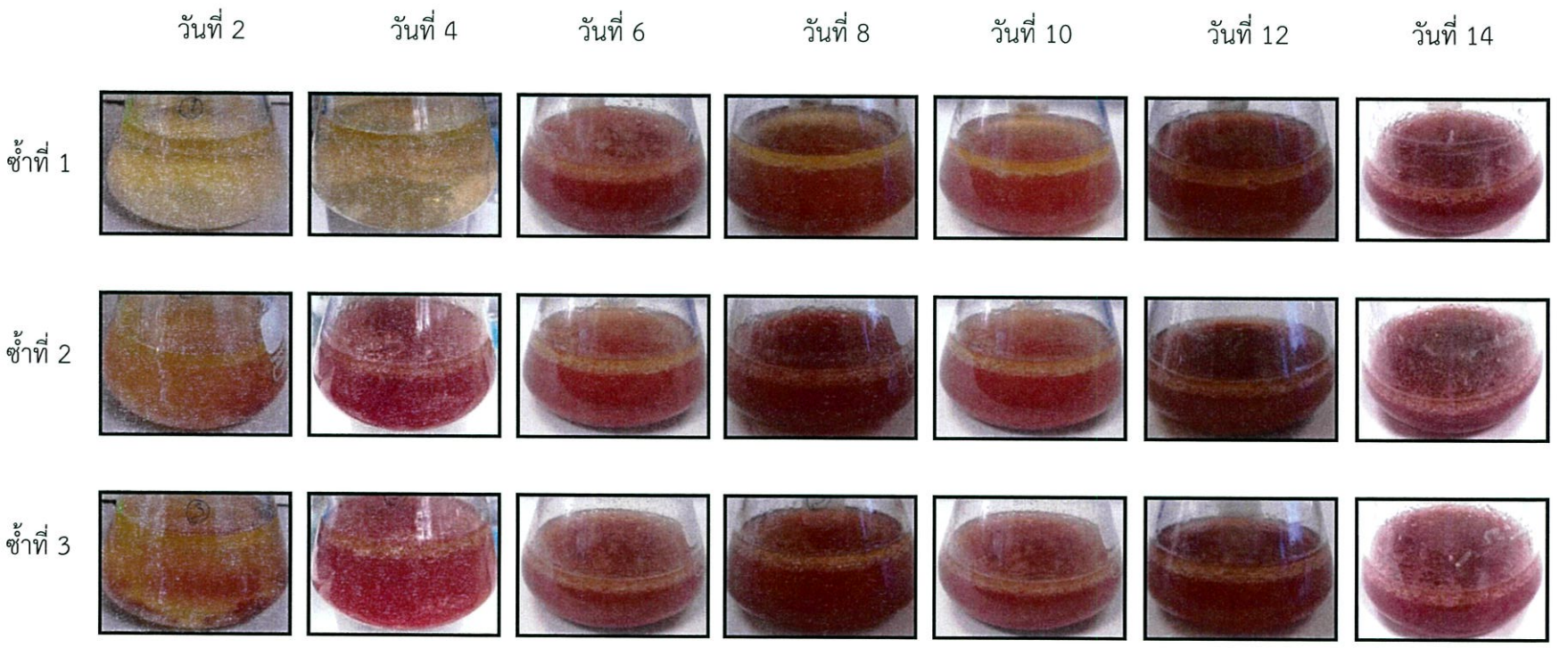

**รูปที่ 4.21** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน



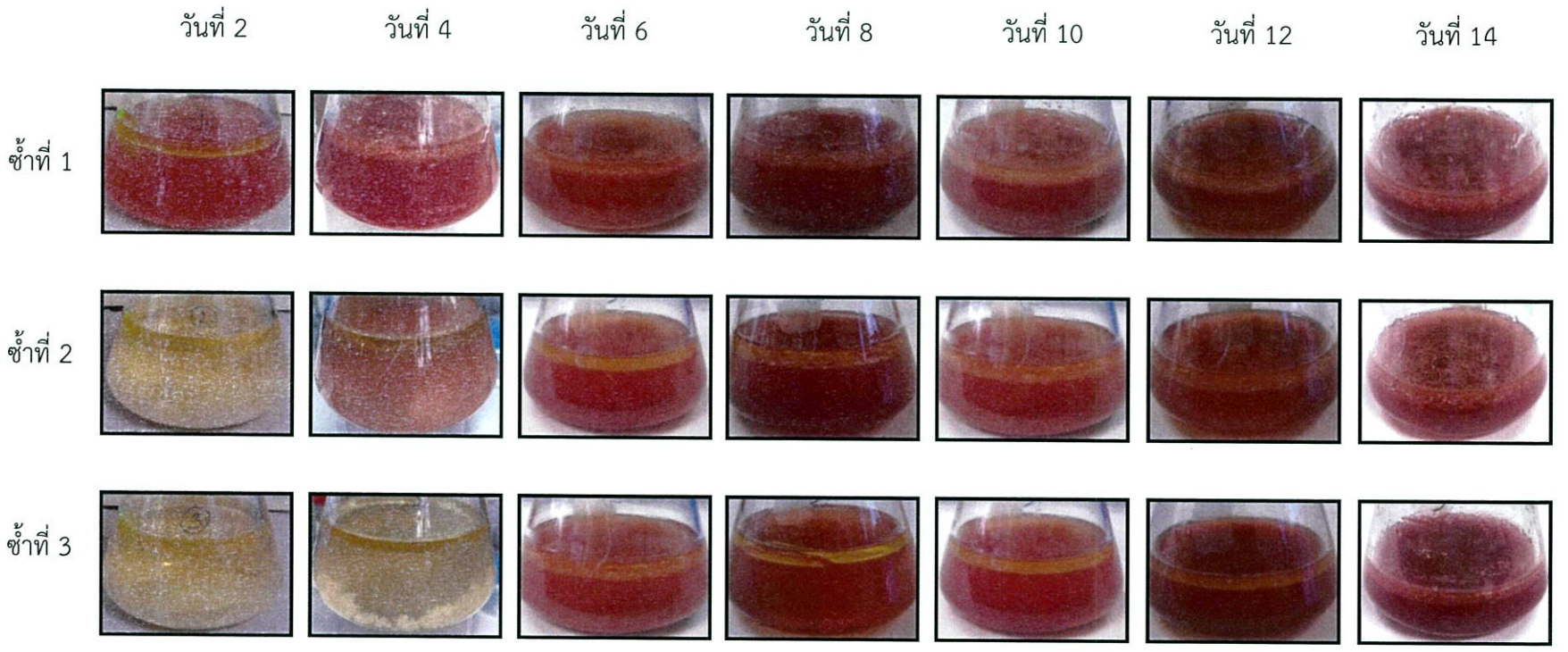

**รูปที่ 4.22** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มีไคตินสำเร็จรูปเป็นแหล่งคาร์บอน




**รูปที่ 4.23** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์ S12 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน




**รูปที่ 4.24** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 13 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน




**รูปที่ 4.25** ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rhodopseudomonas* sp. สายพันธุ์กลาย 14 ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน