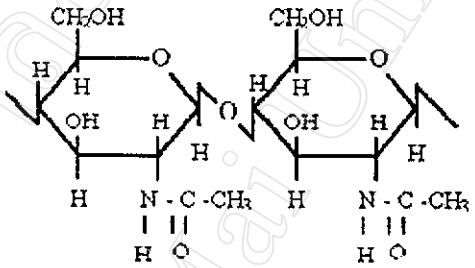
บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

ไคติน (Chitin)

ไคตินเป็นอะมิโนโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคซามีน (glucosamine) แต่ละหน่วยจะจับกันด้วยพันธะ β-(1,4) glucosidic โมเลกุลของไคติน จัดเรียงกันแบบ poly (N-acetyl-D-glucosamine) มีสูตรทางเคมีคือ $(C_8H_{12}O_5N)_n$ (รูป 1) ส่วนไคโตซานคือไคตินที่ดึงเอาหมู่ acetyl group ออก ดังนั้นไคโตซานจะเป็นโพลิเมอร์ของ D-glucosamine



รูป 1 โครงสร้างของไคติน (Shaikh and Despande, 1993)

แหล่งไบโอแมส (Biomass) ที่พบมากที่สุดในโลกคือเซลลูโลส ในแต่ละปีมีเซลลูโลสซึ่งเป็นผลผลิตจากธรรมชาติประมาณ 1×10^{11} ตันต่อปี ซึ่งเซลลูโลสเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับไคติน คือ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) มีรายงานถึงไคตินที่พบในธรรมชาติว่ามีปริมาณมากถึง 1×10^4 ตันต่อปี (Ferrer *et.al.*, 1996) นับว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับเซลลูโลสในธรรมชาติ

ไคติน สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เช่น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ จุลินทรีย์ในกลุ่มของรานั้นมีไคตินอยู่บริเวณผนังเซลล์ ส่วนในสัตว์จะพบไคตินอยู่มากในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปู กุ้ง และ แมลง โดยไคตินจะเป็นองค์ประกอบของเปลือกแข็ง (exoskeleton) นอกจากนี้ยังพบไคตินตามผนังบุระบบย่อยอาหาร และ ระบบขับถ่าย ในทางอุตสาหกรรม นิยมผลิตไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู (ตาราง 1)

ตาราง 1 องค์ประกอบของเปลือกกุ้งและกระดองปู (กรัม/100 กรัม) (วิไล, 2539)

สิ่งมีชีวิต	องค์ประกอบ			
	ไคติน	โปรตีน	Ca	Mg
ปูขน	18.4	10.5	21.3	1.2
กุ้ง Metapenacus	32.4	29.4	15.3	0.6

จากตาราง 1 จะเห็นได้ว่าในเปลือกกุ้งและกระดองปูมีปริมาณไคตินอยู่สูง หากกำจัดหรือทิ้งเป็นของเสียจะเป็นการสูญเสียสารที่มีค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากแต่ละปีมีของเหลือทิ้งที่เป็นไคตินอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งสามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ประมาณ 1.5×10^5 ตัน/ปี (ตาราง 2)

ตาราง 2 ปริมาณไคตินที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (x 10^5 ตัน/ปี) (วิไล, 2539)

แหล่งของไคติน	ปริมาณการเก็บเกี่ยว	ของเสียที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ		ปริมาณไคติน
		น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง	
กุ้งและปู	1,700	468	154	39
คริล (Euphauslis)	18,200	3,640	801	56
หอย	1,390	521	482	22
ปลาหมึก	660	99	21	1
ยีสต์และรา	790	790	182	32
แมลง	ปริมาณน้อย	-	-	-

ไคตินและไคโตซานมีค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและชีวเคมีได้มากมาย เป็นแหล่งที่มีไคตินสูง ในปีหนึ่ง ๆ พบว่ามีของเหลือทิ้งจากเปลือกกุ้งและปูสูงถึง 37,000 เมตริกตัน เปลือกกุ้งและปูประกอบด้วยไคติน โปรตีนและสารอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น calcium carbonate การผลิตไคติน และไคโตซานจากเปลือกกุ้ง มีขั้นตอนใหญ่ ๆ อยู่ 3 ขั้นตอน คือ demineralization, deproteinization และ deacetylization

ในระดับอุตสาหกรรม ขั้นตอนเหล่านี้มักมีการใช้กรดหรือเบสแก่ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีดังกล่าว มีข้อเสียหลายประการ คือ

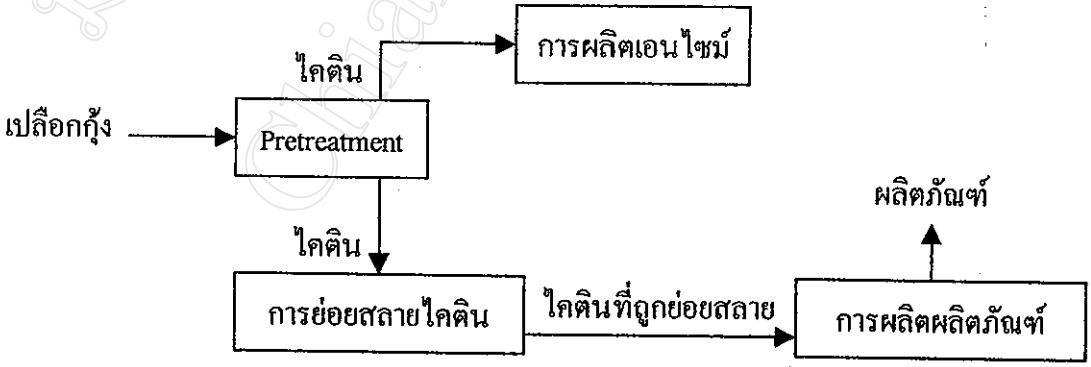
1. ทำให้ acetyl group ของไคตินสลาย คุณสมบัติบางประการของไคตินเปลี่ยนแปลงไป
2. ของเสียจากขบวนการผลิต เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดและด่างสูง
3. โปรตีนที่สกัดได้จากวิธีดังกล่าว มี NaOH ปนเปื้อน

เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว มีการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสหรือไคติเนสมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจากเปลือกกุ้งและปูแทนการใช้สารเคมี นอกจากนี้อาจนำเอนไซม์โปรติเอสหรือไคติเนสที่บริสุทธิ์มาใช้ในการย่อยสลายของเหลือทิ้งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ วิธีนี้เป็นการลดปัญหาการใช้สารเคมีซึ่งมีราคาแพงและก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม

การใช้ประโยชน์จากไคตินและไคโตซาน (Gildberg and Stenberg, 2001)

1. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว สิ่งที่สำคัญ คืออาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ ในเปลือกกุ้งมีไคตินปริมาณมาก จึงสามารถสกัดสารจากเปลือกกุ้ง เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ขณะเดียวกันก็เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตไคติเนส โดยการผสมไคตินกับจุลินทรีย์ ไคติเนสจากจุลินทรีย์จะย่อยสลายไคตินให้เป็น N-acetyl glucosamine เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (รูป 2)



รูป 2 ขบวนการทางชีวภาพในการเปลี่ยนไคตินเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (วิไล, 2539)

2. การใช้ไคตินในรูปเส้นใยอาหาร

ไคตินมีโครงสร้างทางไบโอโพลิเมอร์ มีลักษณะเป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (Mucopolysaccharide) มีอัตราการย่อยสลายและการละลายตัว มีความคงตัว และไม่เป็นพิษจึงนิยมใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด เช่น ขนมปัง จะทำให้ขนมปังฟู ไม่ยุบตัวและให้คุณค่าทางอาหารสูง นอกจากนี้ยังทำให้สีและกลิ่นของขนมปังไม่เปลี่ยนเมื่อมีการอบอีกด้วย (วิไล, 2539)

3. การใช้ไคตินในการบรรจุผลิตภัณฑ์

ไคโตซาน มีลักษณะเป็นฟิล์ม สามารถนำมาเคลือบกระดาษทำให้กระดาษมีคุณสมบัติเหนียว ไม่เปื่อยยุ่ยได้ง่ายเมื่อโดนน้ำ จากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบรรจุผลิตภัณฑ์ เนื่องจากไคโตซานทนความร้อนได้ดีและไม่เป็นพิษ ง่ายต่อการกำจัดและไม่มีสารตกค้างเหมือนพลาสติก สามารถใช้บรรจุผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้อย่างแพร่หลาย เมื่อกำจัดก็ไม่ทำให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

4. ใช้ในด้านการแพทย์

ใช้ไคโตซานในการรักษาบาดแผลหลังการผ่าตัดเพื่อป้องกันการติดเชื้อ ทำเนื้อเยื่อไตเทียม ทำคอนแทกซ์เลนด์ และใช้ในการทำศัลยกรรมตกแต่งผิวหนัง ใช้เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย และ พัฒนาการ PDC (partically deacetylated chitin) ใช้ในการห้ามเลือดและสมานแผล

5. ใช้ในการกำจัดโลหะหนักบางชนิด

ไคตินใช้ในการกำจัดโลหะหนัก เช่น ยูเรเนียม และพลูโตเนียม ในงานผลิตน้ำบริสุทธิ์ (Ultra pure water) นอกจากนี้ยังใช้ไคโตซานในการกำจัดแทนนินและลดความเป็นกรดของผงกาแฟสกัด

6. ใช้ในการสังเคราะห์บุหรี่เทียม

7. ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่น

8. ใช้เป็นโพลิเมอร์ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์พืชและเซลล์สัตว์

9. ใช้เป็นตัวตกตะกอนกำจัดโปรตีนของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและน้ำผลไม้หรือเครื่องดื่มต่าง ๆ

10. ใช้เป็นสารแยกสิ่งเจือปนในกระบวนการผลิตเอนไซม์และโปรตีนเฉพาะทางสำหรับงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมชีวเคมี

11. ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งและกำจัดเชื้อรา ตลอดจนยากำจัดศัตรูพืช

12. ใช้เป็นสารหุ้มเซลล์ (encapsulation) ในเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

13. พัฒนาเป็นสารกรองสำหรับใช้ในการทำบริสุทธิ์วุ้น

14. ใช้เป็นสารเหนียวในการทำกระดาษรีไซเคิลและการปรับปรุงคุณภาพของเยื่อกระดาษต่าง ๆ

สารชนิดอื่น ๆ ที่ได้จากขบวนการผลิตไคโตซาน คือ astaxanthin amino acid และแหล่งไนโตรเจน สามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ดังนี้

ตาราง 3 การใช้ประโยชน์จาก astaxanthin amino acid และ แหล่งไนโตรเจน

Animal	Human
1. Salmon farming ทำให้ปลามีสีส้มแดง เจริญเร็วและขายได้ในราคาสูงขึ้น	1. Food supplement
2. Ornamental fish farming ทำให้ปลามีสีสันสดใน ลดการเกิดโรค และโตเร็ว	2. Cosmetic เช่น ผลิตภัณฑ์ลดรอยเหี่ยวย่นของผิวหนัง (baby face), UV protection
3. สัตว์ปีก มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น โตเร็ว เนื้อเยื่อมีสีชมพูอมแดง ปากและเท้ามีสีเหลืองสวย ไข่แดงมีสีแดงส้ม และเปลือกไข่ไม่แตกง่าย	3. Provitamin A
4. Shrimp farming กุ้งโตเร็ว มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น มีสีสด ขายได้ในราคาสูง	4. ป้องกันการเกิดมะเร็ง

ที่มา : Lorenz and Gerad (2000)

การย่อยสลายไคติน (Shaikh and Dcshpande , 1993)

Chitinolytic enzyme คือ กลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้การย่อยสลายไคติน มักพบในจุลินทรีย์ พืช และ สัตว์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ endo-chitinase อีกกลุ่มหนึ่งคือ exo-chitinase การแบ่งชนิดของไคติเนสจะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท เช่น หากสับสเตรทเป็น colloidal chitin ไคติเนสที่ย่อยจะเป็นชนิด exo-chitinase ได้ผลลัพธ์เป็น oligomer และ diacetylchitobiose เป็นต้น (Haran *et.al.*, 1995)

ไคติเนสมีโครงสร้างที่เป็นผลึก หากประกอบเป็นโครงสร้างภายนอกของแมลงจะอยู่ในรูปของสารเชิงซ้อนโดยจะอยู่รวมกับโปรตีน ถ้าอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะอยู่ในรูปสารประกอบโปรตีนโดยมีโปรตีนรวมกับกลูแคน ถึงแม้ว่าไคติเนสจะตัดพันธะในตำแหน่ง β-1,4-glucosidic bonds แต่หากสิ่งมีชีวิตที่สร้างไคติเนสอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน ทำให้ไคติเนสที่

ผลิตขึ้นแตกต่างกัน มีผลต่อการย่อยสลายสับสเตรทต่างชนิดกัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายสับสเตรทที่จะแตกต่างกันด้วย

สิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิดสามารถผลิตไคติเนสได้ ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์ มีจุลินทรีย์หลายชนิดผลิตไคติเนสออกมาเพื่อย่อยสลายไคตินและไคโตซานซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในผนังเซลล์ของพวก *Zygomycetes* พืชบางชนิดสามารถสร้าง extracellular chitinase หากถูกรุกรานจากเชื้อโรคพืช ไคติเนสที่พบในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ อาจผลิตขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลาในระดับที่ต่ำ เรียกว่า constitutive enzyme หรืออาจมีสารชักนำจึงผลิตเอนไซม์ออกมาได้ที่เรียกว่า inducible enzyme (Jeuniaux, 1996) มีรายงานว่าไคติเนสที่ผลิตจากพืชจะมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 10,000-23,000 ดาลตัน ไคติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 20,000-43,000 ดาลตัน ไคติเนสที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีส มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 30,000-50,000 ดาลตัน และไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อรามีมวลโมเลกุลมากกว่า 100,000 เป็นต้น (Shaikh and Deshpande, 1993)

แหล่งของเอนไซม์ไคติเนส

1. พืช

ปกติแล้วเซลล์พืชจะไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ แต่จะมีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสขึ้นเมื่อพืชถูกรุกรานจากการทำลายของเชื้อก่อโรค หรือ เมื่อเกิดบาดแผล โดยจะเป็นกลไกในการป้องกันตนเองจากแมลงหรือเชื้อราที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบของเซลล์ พืชหลายชนิดเมื่อถูกเชื้อโรคพืชเข้ารุกรานแล้ว ส่วนที่ติดเชื้อนั้นจะมีการผลิตสารเคมีหลายชนิด เช่น β-1 4-glucanase, proteinase และ PR-protein like chitinase สารเคมีเหล่านี้จะผลิตจาก chitinase gene ที่อยู่ในเซลล์พืชนั่นเอง มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ chitinase gene ในถั่วลันเตา เมื่อเกิดการติดเชื้อราและ การกระตุ้นด้วยไคโตซาน พบว่า gene *chi* I ในถั่วลันเตาจะสร้าง endochitinase class I ซึ่งจะมีความต้านทานต่อ *Fusarium solani*, *Phascoli* และ *F. solani* f.sp.*pisi* ที่เป็นสาเหตุของโรค เมื่อถั่วลันเตาถูกรุกรานจากเชื้อดังกล่าวภายใน 2-4 ชั่วโมง จะมีการสะสมของ chitinase RNA และมีการสะสมมากในส่วนล่างของลำต้นและราก ลักษณะนี้ทำให้พืชต้านทานต่อการรุกรานของราโรคพืชได้ (Chang *et. al.*, 1995)

2. สัตว์

สัตว์ในกลุ่มแมลงและสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู จะมีไคตินเป็นองค์ประกอบ สามารถพบไคติเนสได้ สำหรับสัตว์บางชนิดที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ เช่น ปลา และสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดที่ใช้ไคตินเป็นอาหาร สามารถพบไคติเนสได้ในบริเวณตับอ่อนและกระเพาะอาหาร มีการศึกษาไคติเนสในสัตว์หลายชนิด เช่น หมึกกล้วย (squid) พบว่ามีไคติเนสบริเวณกระเพาะอาหาร ลำไส้ และตับ โดยบริเวณตับจะพบไคติเนสสูงกว่าบริเวณอื่น ๆ ในหอยพัด และหอยแมลงภู่ จะพบไคติเนสบริเวณเปลือกหอย และในแมลง *Bombyx mori*, *Manduca sexta* และแมลงสายพันธุ์อื่นจะใช้ไคติเนสเพื่อการลอกคราบ (Matsumiya *et. al.*, 1998)

3. ยีสต์และรา

ไคติเนส มีบทบาทสำคัญในการแบ่งเซลล์ขณะมีการแตกหน่อของยีสต์ พบในยีสต์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และไคติเนสมีความสำคัญต่อราโดยจะเกี่ยวข้องกับการ autolysis เพื่อปล่อยสปอร์ เพื่อให้เกิดการยืดยาวของ stipe (stipe elongation) ใน *Basidiomycetes* มีการสร้างไคติเนสเพื่อสลายเส้นใยอาหาร เพื่อย่อยสลายสารอาหารเพื่อให้อยู่ในรูปที่สามารถใช้ขั้นการเจริญของเส้นใยและเพื่อการ differentiation เชื้อราที่สามารถไคติเนสได้ ได้แก่ *Mucor rouxii, Trichoderma harzianum, Penicillium oxalicum* เป็นต้น (Ulhoa and Peberdy, 1991)

4. แบคทีเรีย

โดยปกติแบคทีเรียมีไคตินเป็นองค์ประกอบในเซลล์ แต่พบไคติเนสได้ในแบคทีเรียที่ใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Bacillus cereus* (Wang *et.al.*, 2001), *Pseudomonase aeruginosa* (Wang *et.al.*, 1999), *Vibrio alginolyticus* (Ohishi *et.al.*, 1996) และ *Serratia marcescens* (Khoury *et.al.*, 1997) เป็นต้น ไคติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลาย ๆ ด้าน ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นสารควบคุมชีวภาพ หรือใช้ย่อยสลายของเหลือทิ้งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น เปลือกกุ้งและปู เพื่อให้ได้ไคตินและไคโตซาน นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

5. แอคติโนมัยซีส

แอคติโนมัยซีสไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แต่พบว่าสามารถผลิตไคติเนสได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม *Streptomyces* sp.ได้มีการศึกษาบทบาทของ *Streptomyces* sp. ในการย่อยสลายไคตินที่มีสภาพเป็นกรด พบว่ามีการย่อยสลายเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก *Streptomyces* ในกลุ่ม acidophile จะย่อยสลายไคตินในดินที่ทำให้เกิด ammonification ต่อจากนั้น *Streptomyces* ในกลุ่ม neutrophile จะย่อยสลายไคตินที่ได้ต่อไป ผลจากการย่อยสลาย

ไคตินในดินจาก *Streptomyces* sp. ทั้ง 2 กลุ่มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH ในดินให้มีสภาพเป็นกลางหรือด่างมากขึ้น (Williams and Robinson, 1981)

การตรวจวัดเอนไซม์ไคติเนส แบ่งออกได้ 5 วิธี คือ

1. Agar plate diffusion

1.1 การใช้ chitinase assay agar

ใช้อาหารแข็งที่มี 1% swollen chitin เป็นแหล่งคาร์บอนและหยดสารละลายเอนไซม์ลงไปในหลุมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 7 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของวงใสรอบ ๆ หลุม เปรียบเทียบขนาดวงใสของตัวอย่างกับขนาดวงใสของสารละลายที่รู้ค่า chitinase activity แล้ว (Reid and Ogrydziak, 1981)

1.2 Paper-dise diffussion

ใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm วางบน agar plate ที่มี 1% chitin เป็นแหล่งคาร์บอนหยดน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษกรอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรอง โดยเปรียบเทียบกับขนาดวงใสของสารละลายที่รู้ค่า chitinase activity แล้ว

2. ตรวจวัดจากปริมาณ end-product ที่เกิดขึ้น

ให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายใต้สภาวะที่กำหนด ไคตินจะถูกย่อยสลายให้มีโมเลกุลที่เล็กลงได้เป็น reducing sugar การวัดอัตราการปลดปล่อย N-acetylglucosamine ทำได้หลายวิธี คือ

2.1 Imoto ang Yagishita method

ตรวจวัด reducing sugar ที่เกิดจากการทำงานของ lysozyme โดยการใช้ glycol chitin เป็นสับสเตรท reaction mixture ประกอบด้วย 0.05% glycol chitin ผสมกับสารละลาย lysozyme 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นเติม color reagent 2 ml ต้มในน้ำเดือด 15 นาที เมื่อสารละลายเย็นตัวลงนำไปวัด absorbance ที่ 420 nm โดยใช้ N-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

2.2 Miller method

ตรวจวัด reducing sugar โดยใช้ dinitrosalicytic acid (DNS) reagent reaction mixture ประกอบด้วย crude enzyme 0.3 ml, 1% swollen chitin 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent 0.75 ml ต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัด absorbance ที่ 575 nm โดยใช้ N-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

2.3 Ressing method

ตรวจวัด N-acetylamino sugar โดยใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde reagent (DMAB) reaction mixture ประกอบด้วย 0.5% swollen chitin 0.2 ml ผสมกับ สารละลายเอนไซม์ 0.2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดย DMAB reagent 3.0 ml ต้มในน้ำเดือด 3 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัด absorbance ที่ 585 nm โดยใช้ N-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

3. Viscometric assay

ตรวจวัด chitinase activity จากความหนืดของสับสเตรท ปกติแล้วไคติน colloidal chitin และ อนุพันธุ์จะไม่ละลายน้ำทำให้สารละลายสับสเตรทที่ได้มีความหนืด การย่อยโดยไคติเนสแบบสุ่มทำให้สายไคตินสั้นลงและความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว การตรวจวัดโดย viscometer อัตราความหนืดของสับสเตรทที่ลดลง คือ การทำงานตามความเข้มข้นของไคติเนส (Jeuniaux, 1996)

4. Chromogenic assay

ตรวจวัด chitinase activity โดยใช้ chromogenic substrate เช่น 3,4-dinitrophynyl-tetra-N-acetylchitotetraose เมื่อสับสเตรทถูกย่อยจะเกิดสีขึ้น ซึ่งปริมาณสีที่เพิ่มขึ้นสามารถวัดโดยการใช้ spectrophotometer reaction mixture ประกอบด้วย เอนไซม์ 0.5 ml, 1% chitin 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกส่วนใส นำส่วนใสที่ได้วัดค่า absorbance 575 nm โดย 1 Unit ของไคติเนส คือ ปริมาณไคติเนสที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย RBV (Remazol brilliant blue) ใน 1 หน่วยปริมาณเท่ากับ RBV ที่ให้ค่า absorbance 575 nm เท่ากับ 0.001 วิธีนี้มีข้อดี คือ รวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีข้อเสีย คือ ไม่จำเพาะเจาะจงกับไคติเนส (Stirling *et .al.*,1979)

5. Radiochemical assay

เป็นการตรวจวัดสารกัมมันตรังสีของ oligosaccharides ที่ละลายน้ำซึ่งถูกปลดปล่อยจาก C-labelled colloidal chitin หรือ H-labelled chitin วิธีนี้สามารถตรวจวัดไคติเนสได้อย่างรวดเร็วและมีความไวในการตรวจสอบ (Jackson *et al.*,1996)

การนำไคติเนสไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบันมีการใช้วิธีการทางกายภาพในการย่อยสลายโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง เพื่อให้ได้ไคติน โดยส่วนใหญ่แล้วมักใช้เอนไซม์หรือ bioconversion process ในการสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งและปู ส่วนใหญ่แล้วการสกัดมักใช้เอนไซม์ไคติเนสในการช่วยย่อยสลาย (Casio *et.al.*, 1981) ในการเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต extracellular chitinase มักใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินและของเหลือทิ้งจากเปลือกกุ้งและกระดองปู การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protein, SCP) เป็นช่องทางเลือกหนึ่งในการเปลี่ยนของเหลือทิ้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า เนื่องจากในการผลิต SCP นั้นสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดในการผลิต อาจใช้ของเหลือทิ้งจากการเกษตร ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเพชรเทียม เศษไม้หรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิต SCP ส่วนใหญ่มักเป็นสาหร่ายและแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Spirulina* sp. อย่างไรก็ตามยีสต์ที่ใช้เป็นอาหาร เช่น *Candida utilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะ *Pichia kudiarzevii* สามารถผลิตไคติเนสที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเปลือกกุ้งและปู ให้เป็น SCP (Casio *et al.*, 1981) นอกจากนี้คงใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราและแมลงก่อโรคพืช ใช้ในการศึกษาเทคโนโลยีต่าง ๆ เกี่ยวกับฟังไจ (fungal technology) สามารถใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสจากฟังไจ หรือใช้ตรวจหาตำแหน่งของไคตินและไคโตซานบริเวณผนังเซลล์ได้ โดยใช้ในรูปของ chitinase gold นอกจากนี้พบว่าการเติมไคตินและไคติเนสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนเอนไซม์ที่ช่วยสลายกาแลคโตสได้ดีด้วย

ทางด้านการแพทย์ ไคติเนสถูกนำมาใช้ในการเตรียม chito-oligosaccharide ที่เป็นสารช่วยเร่งบาดแผลให้หายเร็วขึ้น ช่วยลดความเข้มข้นของพลาสมาเมื่อมีคลอเรสเตอรอลสูง และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Ferrer and *et al.*, 1996)

การหมักในสภาพแข็ง (Solid Substrate Fermentation: SSF)

การหมักในสภาพแข็งเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้กับสับสเตรทที่เป็นของแข็ง ส่วนมากมักเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือ ธัญญาพืชที่เป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ โดยการหมักในสภาพแข็งนั้นมีหลักในการพิจารณา 2 หลักใหญ่ คือ การเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ให้เหมาะสมและชนิดของสับสเตรทที่ใช้ นอกจากนี้ควรพิจารณาถึงสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย ปกติแล้วการหมักในสภาพแข็ง มักมีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากสารอาหารใน solid substrate มีความเข้มข้นน้อยเกินไป หรือไม่มีสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการใช้ จึงควรมีการเติมสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญลงไปด้วย การหมักในอาหารแข็งมีข้อดีกว่าการหมักในอาหารเหลว คือ สามารถประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร สามารถเลือกสับสเตรทที่ใช้ได้หลายชนิด มีต้นทุนต่ำ ใช้อุปกรณ์น้อย ลดมลพิษของสิ่งแวดล้อม และลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้มากกว่าการหมักในอาหารเหลว เนื่องจากการหมักในอาหารเหลว เชื้อจุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนได้ง่าย เพราะอยู่ในสภาวะที่มีน้ำมากแต่ในการหมักในสภาพแข็งจุลินทรีย์ที่นำมาใช้มักเจริญอย่างรวดเร็ว ภายใต้สภาวะที่มีความชื้นน้อย ถ้าหากใช้เชื้อตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพเติมลงในสับสเตรท เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการจะเจริญได้เร็วกว่าเชื้อปนเปื้อน เพราะฉะนั้น เทคนิคการทำปลอดเชื้อ จะไม่จำเป็นในการหมักในสภาพแข็ง การหมักในสภาพแข็งควรคำนึงถึงราคาของ bioreactor ที่ใช้ด้วย ควรใช้ที่มีราคาถูก เพื่อลดต้นทุนการผลิต

การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของการหมักในสภาพแข็ง

1. การย่อยสลายสารปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ Kastanek *et al.*, (1999) ศึกษาการย่อยสลาย polychlorinated biphenyls (PCBs) และ Volatile chlorinated ethenes (CIUS) ที่ปนเปื้อนในดินและน้ำใต้ดิน โดยการใช้ SSF พบว่า SSF ให้ผลในการย่อยสลายยาฆ่าแมลง (pesticide) ที่ตกค้างต่าง ๆ ได้ดี

2.การกำจัดสารเคมีและวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมโดยชีววิธี (Biological detoxification of agro-industrial residues) Ofuya and Obilor (1994) ศึกษาผลการย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างจาก cassava peels โดยใช้ SSF หลังจากหมักนาน 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถลด HCN ลงได้ 42% นอกจากนี้ Essers *et al.*, (1955) ศึกษาผลของ microflora ในการลดระดับ cyanogen โดยใช้ casava เป็นสับสเตรท ใช้ *Bacillus* sp. ในการหมัก พบว่าหลังการหมักเชื้อจุลินทรีย์สามารถย่อยสารพิษที่ตกค้างได้

3. Biotransformation of crops and crops residues

Zadrazil *et.al.*, (1995) ใช้ white-rot fungi ในจีนัส *Pleurotus* sp., *Ganoderma* sp., *Strupharia* sp., *Polyporus* sp., *Lentinus* sp., *Dichomitus* sp., *Sporotrichum*sp., และ *Trametes* sp. ในการย่อยสลาย ligno cellulose ให้เป็นสารพวกโปรตีน เป็นต้น และ Wall *et al.*, (1993) ได้ออกแบบและศึกษา kinetics ของ biopulping โดยใช้ white-rot fungi 2 ชนิด คือ *Phanerochaete chrysosporium* และ *Ceriporiopsis* Sub *vermisspora*

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักในสภาพแข็ง

โดยปกติแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักในสภาพแข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. Bioactive compounds

ตาราง 4 Production of bioactive compound in SSF (Felse and Panda, 2000)

Compound	Source	Substrate	Function	Reference
Bacterial endotoxins	*Bacillus thuringiensis*	Coconut waste	Insecticide	Balakrishnan and Pandey (1996)
Gibberellic acid	*Fusarium moniliformi*	Wheat bran , Corn cob, Cassava flour	Plant growth hormone	Pasttrana *et.al.*, (1995)
Penicillin	*Penicillium chrysogenum*	Sugarcane bagasse	Antibiotic	Gonzalez *et.al*, (1993)
Tetracycline	*Streptomyces viridifaciens*	Sweet potato residue	Antibiotic	Balakrishnan and Pandey (1996)
Oxytetracyclin	*S. rimosus*	Corn cob	Antibiotic	Ohno *et.al.*, (1993)
Iturin	*Bacillus subtilis*	Okara, Wheat bran	Antibiotic	Balakrishnan and
Surfactin	*B. subtilis*	Soybean residue Okara	Antibiotic	Pandey (1996)
Antifungal volatiles	*B. subtilis*	Impregnated loam based compost	Antifungal compounds	Sadhukhan *et.al.*, (1999)
Mycophenolic	*P. brevicompactum*	Wheat bran	-	

2. เอนไซม์ (Enzyme)

ในทางอุตสาหกรรม การผลิตเอนไซม์มักใช้การหมักในอาหารเหลว แต่มีข้อเสีย คือ มีราคาแพงและไม่สามารถใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้ทุกชนิด การหมักในอาหารแข็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการผลิตมีข้อดี คือ ราคาถูก มักนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์หลาย ๆ ชนิด

3. กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ในทางอุตสาหกรรมการผลิตกรดอินทรีย์มักใช้การหมักแบบสภาพแข็ง โดยเฉพาะ citric acid, fumaric acid และ oxalic acid โดยเฉพาะ citric acid เป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในทางอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการผลิตยา การผลิตในระยะแรก ๆ จะใช้วิธีการหมักในสภาพเหลว จากจุลินทรีย์ *Aspergillus niger* และ *Candida* sp. สับสเตรทที่ใช้เป็นคาร์โบไฮเดรท molasses และ แป้ง อย่างไรก็ตามการผลิต citric acid โดยการหมักในสภาพแข็งมีข้อดีหลายประการ คือ สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น ของเหลือทิ้งทางเกษตรกรรม และผลผลิตที่ได้มีปริมาณสูงกว่า นอกจากนี้การหมักในสภาพแข็งมักนิยมใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์หลาย ๆ ชนิด (ตาราง 5)

ตาราง 5 Production of organic acid in SSF (Felse and Panda, 2000)

Microorganism	Substrate	Reference
Citric acid		
Aspergillus niger	Sweet potato	Leangon *et.al.*, (1999)
A. foetidus	Pineapple waste	Tran and Sly (1998)
A. niger	Cassava	Soccol *et.al.*, (1904)
Fumaric acid		
Rhizopus sp.	Cassava	Soccol *et.al.*, (1994)
Lactic acid		
Lactobacillus casci	Sugarcane press-mud	Somon *et.al.*, (1999)
L. helveticus	Sugarcane press-mud	Somon *et.al.*, (1999)
L. paracasei	Sweet sorghum	Richter and Trager (1994)
Oxalic acid		
A. niger	Sweet potato	Leangon *et.al.*, (1999)

4. ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ได้จากการหมักในสภาพแข็ง

ตาราง 6 Other products by SSF (Felse and Panda, 2000)

Product	Microorganism	Substrate	Reference
L-glutamic acid	*Brevibacterium* sp.	Sugarcane bagasses	Nampoothiri and Pandey (1996)
Pigments	*Monascus purfureus*	Sugarcane bagasses	
Xanthan gum	*Xanthomonas campestris*	Apple pomace, grape pomace, citrus peels etc.	Nampoothiri and Pandey (1996)
Succinoglycan	*Agrobacterium tumefaciens*	Spent malt grains, ivory nut	Stredansky *et.al.*, (1999)
Aroma compounds	*Rhizobium hedysan*	Sugarcane bagasses, cassava	Stredansky *et.al.*, (1999)
	Bacillus subtilis		Pandey *et.al.*, (2000)
Biosurfactants	*Bacillus subtilis*	Agro-industrial residues	Makkar and Comeotra (1997)
Vitamin B_{12}, B_6	*Klebsiella pneumoniae*	Soybean tempeh	Keuth and Bisping (1993)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการหมักในสภาพแข็งสามารถประยุกต์ใช้กับงานด้านต่าง ๆ ดังนี้คือ การย่อยสลายสารพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม การผลิตสารที่ใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อใช้ในการผลิตอาหารที่มีคุณค่าเพิ่มขึ้น และ อุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษ (biopulping) การผลิตสารทุติยภูมิ เช่น ยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ กรดอินทรีย์ biopesticides, bioherbicides, biofuel โดยเฉพาะ ethanol biosurfactants และใช้ในการผลิตสารแต่งกลิ่นในอาหาร

การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสและการหมักในอาหารแข็งของแบคทีเรีย

Brurberg *et.al.*, (1996) ศึกษาการผลิต chitinolytic enzyme ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตไคติเนสได้หลายชนิด คือ chitinase A (*chi A*) และ chitinase B (*chi B*) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี hydrophobic interaction chromatography และเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *chi A* และ *chi B* พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-60°C เมื่อศึกษาการย่อยสลายสับสเตรทหลายชนิดได้แก่ N-acetylglucosamine, สับสเตรทที่เรืองแสง colloidal chitin พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็น chitinase ได้ และ Gisnaratna and Balasubramanian (1994) ศึกษาการผลิตและการทำบริสุทธิ์ของ exochitinase ที่ผลิตจาก *Acremonium obclavatum* เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่า exochitinase ที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุล 45 kDa และศึกษาคุณสมบัติบางประการของ

exochitinase พบว่า exochitinase สามารถย่อยสลาย colloidal chitin ได้เร็วกว่า crude chitin และสามารถยับยั้งการงอกของ uredospore ของเชื้อ *Puccinia arachidis* นอกจากนี้ Sakai and Yokora (1998) ศึกษา thermophilic bacteria สายพันธุ์ MH-1 ที่แยกมาจาก chitin-containing compost ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าการผลิต endochitinase ได้ 3 ชนิด แบคทีเรียสายพันธุ์ MH-1 ไม่เจริญในอาหารสำหรับ *Actinomycetes* sp. แต่เจริญได้เฉพาะในอาหารที่มี colloidal chitin, yeast extract, (2, 6-O-dimethyl)-β-cyclodextrin เป็นส่วนประกอบ เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์พบว่ามีการสร้าง endospore บน meso-diaminopimelic acid บริเวณผนังเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ G+C ประมาณ 55% และมี 16s ribosomal DNA สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ในจีนัส *Bacillus* sp. endochitinase ที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชนิดมีมวลโมเลกุล 71, 62 และ 53 kDa pI 5.3, 4.8 และ 4.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 75, 65 และ 75 ℃ และมีความเสถียรของ pH ในช่วงที่เป็นกรดคือ 6.5, 5.5 และ 5.5 ตามลำดับ endochitinase ทั้ง 3 ชนิดสามารถย่อยสลาย acetylchitohexide ได้เร็วและ Wang *et.al.*, (2001) ศึกษาการทำบริสุทธิ์ extracellular chitinase จาก *Bacillus cereus* 6E1 โดยใช้เทคนิค gel chitinase assay และใช้ carboxymethyl-chitin-remazol brilliant violet 5R (CM-chitin-RBV) เป็นสับสเตรท ไคติเนสที่แยกได้มีมวลโมเลกุล 36 kDa (*chi 36*) ต่อจากนั้นนำ *chi 36* มาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาย่อยเอนไซม์และทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ pH 5.8 บางเอนไซม์อาจทำปฏิกิริยาได้ที่ pH ระหว่าง 2.5-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35℃ หรือ 4-70℃ สามารถที่จะย่อยสลาย p-nitrophenyl-(N-acetyl-β-D-glucosamine)$_2$ เมื่อจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ชนิดนี้พบว่าคือ chitobiosidase ซึ่ง chitobiosidase ที่ได้มีกรดอะมิโน 25 ตัว โดย alanine เป็นกรดอะมิโนตัวแรกที่อยู่ที่ปลาย N-terminal กรดอะมิโนแต่ละตัวต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ด้านปลาย N-terminal ของ chitobiosidase จาก *B. cereus* 6E1 มีลักษณะเหมือนกับ chitinase D ที่ได้จาก *B. circulans* WL-12 จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ bacterial chitinase ในแบคทีเรียจีนัสเดียวกันจะมีลักษณะคล้ายกัน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสที่แยกได้จากพืช ตัวอย่างเช่นจากงานวิจัยของ Krishnaveni *et.al.* (1999) ศึกษาเอนไซม์ไคติเนสที่แยกได้จากเมล็ดถั่วหลาย ๆ ชนิดพบว่าในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยเอนไซม์ไคติเนสประมาณ 3 ชนิด ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, chitin affinity chromatography และ CM-cellulose cation exchange chromatography เอนไซม์ไคติเนสที่แยกได้คือ CH1, CH2 และ CH3 มีมวลโมเลกุลประมาณ 24, 28 และ 33 kDa วิเคราะห์โดยใช้ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีช่วง pH ที่เหมาะสม คือ 4.0-6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 37-40℃ เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดแสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma viride* และ *Fusarium moniliforme*

การหมักในสภาพแข็งนอกจากจะใช้ในการผลิตเอนไซม์แล้วยังสามารถใช้ในการผลิตสารหลาย ๆ ชนิด ตัวอย่างเช่นจากงานวิจัยของ Keuth and Bisping (1993) ศึกษาการผลิต vitamins ที่ละลายในน้ำ (B_{12}, B_6, riboflavin, thiamine, nicotinic acid และ nicotinamide) โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus*, *R. arrhizus*, *R. stolonifer* ร่วมกับแบคทีเรียที่ผลิต vitamin B_{12} คือ *Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae* พบว่าเมื่อใช้เชื้อราในจีนัส *Rhizopus* sp. เพียงชนิดเดียวที่สามารถผลิต vitamin B12 และ ไม่สามารถผลิต vitamins ในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ หากนำเชื้อราในกลุ่ม *Rhizopus* sp. ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงกับแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวสามารถที่จะผลิต vitamins ในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ โดยใช้การหมักในสภาพแข็ง และ Larroche *et.al.,* (1999) ศึกษาการผลิต Dimethypyrazine (2, 5-DMP), tetramethylpyrazine (TTMP) จาก *Bacillus subtilis* ด้วยการหมักบนอาหารแข็งโดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นสับสเตรท เติมกรดอะมิโน L-theronine และ acetoin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต TTMP และ 2,5-DMP เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบกลุ่ม pyrazine พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 40°C pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.0-7.5 อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.1 VVM และเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเท่ากับ 180 ชั่วโมง *B. subtilis* ผลิตสารประกอบกลุ่ม pyrazine ได้สูงสุดคือ 2 กรัมต่อลิตร Stredansky and Conti (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต exopolysaccharide จากแบคทีเรียหลาย ๆ ชนิดด้วยการหมักบนอาหารแข็งกับอาหารเหลว โดยการหมักในสภาพแข็งใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท และการหมักในอาหารเหลวใช้ xanthan เป็นสับสเตรท สำหรับ *Xanthomonas campestris, Rhizobium hedisari* และ *Agrobacterium tumefaciens* PT45 ใช้ succinoglycan เป็นสับสเตรทจากการศึกษาพบว่าการผลิต exopolysaccharide จากแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงบนสภาพแข็งจะให้ผลผลิตที่ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และ Wang *et.al.*, (1999) ได้ค้นพบ antifungal ชนิดใหม่มีชื่อทางการค้าว่า pafungin โดยผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* K-187 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพแข็งโดยใช้ shellfish waste เป็นสับสเตรทมวลโมเลกุลของ pafungin คือ 66 kDa วิเคราะห์โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis โมเลกุลประกอบด้วย complex carbohydrate ความเสถียรของ pH คือ 5-7 ความเสถียรของอุณหภูมิประมาณ 100°C เป็นเวลา 40 นาที และมีคุณสมบัติยับยั้ง *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในพืชหลายชนิด mode of action ของ pafungin จะอยู่บริเวณเส้นใยโดย antifungal ชนิดนี้จะทำให้เส้นใยบวมจากนั้นจะย่อยสลายเส้นใยทำให้แตกและ pafungin มีคุณสมบัติที่พิเศษกว่า antifungal ชนิดอื่น ๆ คือ มีความเสถียรเมื่อ pH เกิดการเปลี่ยนแปลง

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส

มีรายงานวิจัยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ (ตาราง 7)

ตาราง 7 A brief summary of bacterial studies on production of microbial chitinases (Felse and Panda, 2000)

Organism	Medium composition (kg/m^3)	Fermentation conditions	Mode of operation	Maximum enzyme activity	Assay method
Bacillus lichiniformi	Colloidal chitin, 5.0; *N*-acetyl glucoseamine, 5.0; Yeast extract, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; Na_2HPO_4, 3.4; NH_4NO_3, 2.0; KH_2PO_4, 1.0; NaCl, 0.5	Volume; 3 l, pH = 7.0 Temperature; 50°C Aeration: 1VVM Fermentation time: 48 h	Batch	Chitinase I: 13.7 mU Chitinase II: 3.5 mU Chitinase III: 3.1 mU Chitinase I: 2.8 mU	Reducing sugar equivalent
Norcardia orientalis	Colloidal chitin, 5.0; *N*-acetyl glucoseamine, 5.0; Yeast extract, 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; K_2HPO_4, 0.7; KH_2PO_4, peptone, 2.0	Volume; 1 l, pH = 5.0 Temperature; 28°C Fermentation time: 96 h	Batch	4.278 U	Reducing sugar equivalent
Serratia marcescens	$(NH_4)_2SO_4$, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3; K_2HPO_4, 1.5; Chitin, as required; glucose, as required	Volume; 750 ml for continuous culture studies and 14L for batch studies pH = 8.0 Temperature; 30°C Fermentation time: 100 h	Batch and continuous	2×10^{-2} U	Reducing sugar equivalent
Serratia marcescens 990E	Purified chitin, 10; yeast extract, 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3; K_2HPO_4, 1.36;	Volume; 6 l, pH = 8.5 Temperature; 30°C Aeration rate 6 l min^{-1}	Batch and fed batch	34 U	Reducing sugar equivalent
Talaromyces emersonii	Chitin, 10-20; plus mineral medium	Volume; 8 l, pH = 5.0 Temperature; 45°C Fermentation time: 240 h Aeration rate 8 l min^{-1} Agitation rate: 200 rpm	Batch Batch	0.45 μmol $\cdot h^{-1} \cdot ml^{-1}$	Reducing sugar equivalent
Streptomyces cinereoruber	*A. niger* cell wall, 5.0; yeast extract, 50; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0; K_2HPO_4, 2.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1	Volume; 20 l, pH = 6.8 Temperature; 30°C Fermentation time: 96 h Aeration rate: 1VVM Agitation rate: 500 rpm	Batch	17 U	Viscometric method
Vibrio alginolyticus	Squid chitin, 5.0; glucose, 6; peptone, 7.5; yeast extract, 2; K_2HPO_4, 2; sea water, 75% (v/v)	Volume; 20 l, pH = 7.0 Temperature; 37°C	Batch	Chitinase C1: 3.3 U/mg protein Chitinase C2: 5.8 U/mg protein	Reducing sugar equivalent
Trichoderma viride F-9	Chitin, 10; plus mineral medium	Volume; 5 l, pH = 7.0-8.0 Temperature; 40°C	Batch	-	Reducing sugar equivalent
Trichoderma harzianum	Chitin 12.5; plus mineral salts	Volume; 2 l, pH = 4.9 Temperature; 30°C Fermentation time: 120 h Aeration rate 1.5 VVM Agitation rate: 2.24 rpm	Batch	0.391 U	Reducing sugar equivalent

กระบวนการหลังการผลิต (ชรินทร์, 2542)

กระบวนการหลังการผลิต (down stream process) เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังจากการหมักสิ้นสุดลง เป็นขั้นตอนการแยก (separation) และการทำผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของลักษณะทางกายภายและชีวภาพของสารที่ต้องการแยก (ตาราง 8)

ตาราง 8 หลักการแยกและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (ชรินทร์, 2542)

คุณสมบัติ	วิธีการ	ขนาด
1. ขนาดหรือมวล	Centrifugation	เล็ก-ใหญ่
	Gel filtration	เล็ก
	Dialysis, Ultrafiltration	เล็ก
2. ประจุ	Ion-exchange chromatography	เล็ก-ใหญ่
	Electrophoresis	เล็ก
	Isoelectric focusing	เล็ก
3. ความสามารถในการ	Change in pH	ใหญ่
ละลาย	Change in ionic strength	เล็ก-ใหญ่
	Decrease in dielectric constant	ใหญ่
4. ความจำเพาะกับสาร	Affinity chromatography	เล็ก
บางชนิด	Affinity elution	เล็ก-ใหญ่

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (ชรินทร์,2542)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มักจะมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์โดยตรง เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ในในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ หรือเพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป เช่น ศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ โครงสร้างของโมเลกุล และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ที่สนใจ

กระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. การตกตะกอน การตกตะกอนโปรตีนโดยวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพได้แก่

1.1 Isoelectric precipitation

เป็นการตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric Point ; pI) เมื่อใดที่ค่า pH ของสารละลายโปรตีนผสมมีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนที่ต้องการ โปรตีนชนิดนั้นจะเกิดการรวมตัวแล้วตกตะกอนลงมา

1.2 Ionic strength or salt fractionation precipitation

เป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มแรงอิออนของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งอิออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีนออกมา ทำให้โปรตีนจับตัวตกตะกอนออกมา

1.3 Organic solvent precipitation

เป็นการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อลดค่ากิจกรรมของน้ำ ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง โมเลกุลโปรตีนรวมตัวและตกตะกอนลงมา

2. ไดอะไลซีส

เทคนิคไดอะไลซีสเป็นการแยกสารโดยบรรจุสารละลายในน้ำของสารโมเลกุลใหญ่และเล็กลงในถุงเมมเบรนซึ่งมีรูพรุนปิดถุงแล้วใส่ลงไปในภาชนะขนาดใหญ่ที่มีน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ รูพรุนของเมมเบรนจะมีขนาดเล็กเกินกว่าที่โมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น โปรตีน จะผ่านเข้าออกได้ แต่โมเลกุลเล็กจะผ่านไปอย่างอิสระ จนกว่าจะมีความเข้มข้นของสารโมเลกุลเล็กภายในและภายนอกถุงไดอะไลซีสเท่ากัน นั่นคือความเข้มข้นของสารโมเลกุลเล็กในถุงไดอะไลซีสจะลดลงกว่าเดิม โดยปกติภาวะสมดุลของสารโมเลกุลเล็กจะใช้เวลา 4-6 ชั่วโมง และเมื่อเปลี่ยนสารละลายใหม่ในภาชนะทุก ๆ ประมาณ 3 ชั่วโมง จะทำให้ความเข้มข้นของสารโมเลกุลเล็กในถุงไดอะไลซีสลดลงครึ่งหนึ่งเป็นลำดับเรื่อยไป

ไดอะไลซีสเมมเบรนมีหลายชนิด คือ colloidion, cellophane และ cellulose มีขนาดรูพรุนอยู่ในช่วง 1,000-50,000 ถุงไดอะไลซีสในทางการค้ามักจะมีการเจือปนมาก เช่น glycerol, ไอออนของโลหะหนัก, สารประกอบที่มีกำมะถันปริมาณน้อยมาก (traces) และบางครั้งจะมี hydrolytic enzymes (proteinases and nuclease) จะต้องกำจัดสิ่งเจือปนเหล่านี้ออกไปก่อน

ในการเก็บรักษาให้เก็บรักษาที่ 4°C ในน้ำกลั่นที่มี sodium azide หรือ chloroform 3-4 หยด หรือ 20% เอธานอล เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในการจับถุงไดอะไลซีสจะต้องสวมถุงมือเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากมือ (อาจมี hydrolytic enzymes ปะปน)

ข้อควรระวังในการทำไดอะไลซีส ได้แก่

1. ต้องทำไดอะไลซีสที่อุณหภูมิ 4°C เนื่องจากความเสถียรของโปรตีน

2. ในระหว่างการทำไดอะไลซีสจะต้องกวนสารตลอดเวลาเบา ๆ เพื่อช่วยให้โมเลกุลเล็กเกิดการกระจายออกจากถุงได้เร็วขึ้น

3. เพื่อให้ถุงไดอะไลซีส ลอยตัวไม่ถูกกระทบจาก magnetic bar ควรผูกปลายข้างหนึ่งของถุงไดอะไลซีสไว้กับ magnetic bar ควรผูกปลายข้างหนึ่งของถุงไดอะไลซีสไว้กับ magnetic bar

4. ไม่ควรใส่สารละลายจนเต็มถุงไดอะไลซีส

3. Chromatography มีอยู่ 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ

3.1 Ion-exchange chromatography

การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนอิออนเกิดขึ้นโดยกระบวนการดูดซับบนผิวแบบย้อนกลับ (Reverse ion exchanger) เกิดขึ้น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก เป็นกระบวนการดูดซับสารตัวอย่างบนพื้นผิวของตัวแลกเปลี่ยนประจุส่วนสารที่ไม่ถูกดูดซับจะถูกชะออกด้วยบัฟเฟอร์ ขั้นที่สอง โมเลกุลของสารที่ยึดเกาะกับตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยมีอัตราเร็วในการหลุดชะออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความแรงของการยึดเหนี่ยวกับประจุของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือ ความจำเพาะทางไฟฟ้าเนื่องจากการมีประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน ความจำเพาะดังกล่าวนี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และค่า ionic strength ของสารละลายในระบบ เป็นผลทำให้เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการแยกโปรตีนชนิดที่ต้องการออกจากสารละลายโปรตีนผสมได้แม้มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

3.2 Gel filtration chromatography

เทคนิคเจลฟิวเทรชั่นโครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่าง อาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในเกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลิเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล (gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้และถูกชะออกมากับสารละลายบัฟเฟอร์ก่อนจากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและขนาดใหญ่ออกจากกันได้ โครงสร้างของเม็ดเจลและการแยกสารตามขนาดโมเลกุลในขณะผ่านลงมาตามคอลัมน์ (รูป 3)

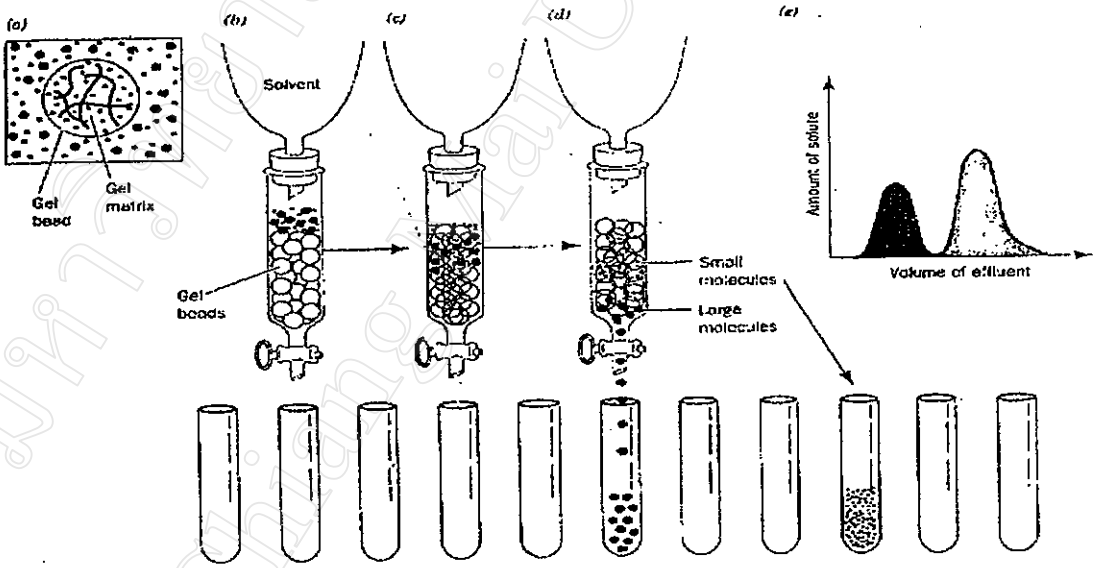
a) แสดงลักษณะของเม็ดเจล ประกอบด้วยส่วนเมทริกซ์เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลิเมอร์สายยาว โดยระหว่างเส้นสายมีช่องว่างอยู่ จากรูปจะเห็นว่าสารที่มีโมเลกุลเล็กผ่านเข้าไปในช่องว่าง ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าไปในช่องว่างดังกล่าว

b) แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างขณะเคลื่อนที่เข้าสู่ชั้นเจล

c) โมเลกุลที่มีขนาดเล็กผ่านแทรกเข้าไปในช่องว่างภายในเจล ทำให้วนเวียนอยู่ภายในเม็ดเจล ใช้เวลานานกว่าจะหลุดออกมาภายนอกเจล ในขณะที่สารโมเลกุลใหญ่ถูกชะผ่านลงมาตามคอลัมน์

d) สารโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ในขณะที่สารขนาดเล็กกำลังถูกชะให้ไหลลงมาตามคอลัมน์ ดังนั้นสารที่มีขนาดเล็กจึงหลุดออกมาจากคอลัมน์ภายหลัง

e) แสดง elution diagram ของโครมาโตแกรมใช้บอกถึงลำดับหรือช่วงเวลาของการแยกสารที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน โดยการเพิ่มขึ้นของกราฟในช่วงแรกเป็นค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ เส้นกราฟในส่วนหลังเป็นของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก



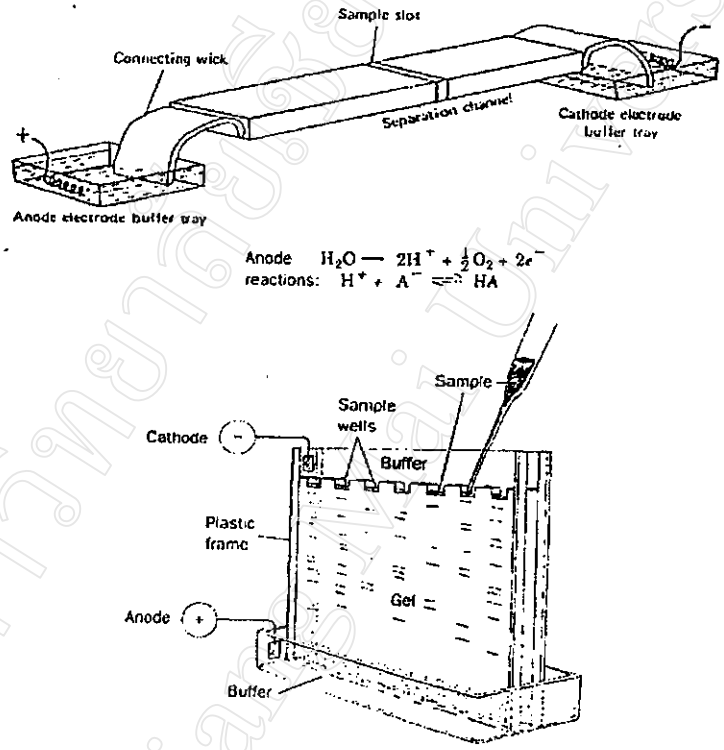
รูป 3 การเก็บตัวอย่างโดยวิธี Gel-Electrophoresis

3.3 Iso-electric focusing chromatography

เป็นการแยกสารตามความแตกต่างของประจุในการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า โดยใช้สารผสมที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นประจุหรือ pH (gradients) ภายใต้สนามไฟฟ้าโปรตีนที่มีประจุเป็นลบ (pH > pI) เกิดการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกตามความแรงของประจุบนโมเลกุล จนกระทั่งเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งที่ pH

มีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนนั้น ๆ ก็จะหยุดการเคลื่อนที่เนื่องจากประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า ข้อสำคัญของการแยกเอนไซม์โดยเทคนิคนี้ คือ เอนไซม์ต้องมีความเสถียรใต้สภาพที่เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นประจุหรือพีเอช โดยเฉพาะค่าไอโซอิเลคทริค (pI) ของเอนไซม์

การทำไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิงสามารถกระทำได้ทั้งในรูปแบบ horizontal slab คือเป็นการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าบนตัวกลางในแนวระนาบ หรือทำในลักษณะของ column electrophoresis เป็นการเคลื่อนที่บนตัวกลางตามแนวตั้งฉากกับแรงโน้มถ่วงของโลก (รูป 4)



รูป 4 การใช้เทคนิคไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิง ในการแยกโปรตีนผสมออกจากกัน

a) Horizontal slab gel isoelectric focusing

b) Vertical slab gel isoelectric focusingv

<u>ข้อดี</u> สามารถใช้ในงานที่ต้องการแยกสารให้บริสุทธิ์มาก เนื่องจากประสิทธิภาพของการแยกสารสูงมาก

<u>ข้อเสีย</u> สามารถแยกโปรตีนหรือสารที่ต้องการได้ในปริมาณที่น้อย เนื่องจากข้อจำกัดของขนาดเจล

ดังนั้นวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์หลังจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แล้ว เช่น ถ้าต้องการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) วิธีนี้ต้องการเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์และมีปริมาณน้อย อาจไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์มาก ๆ เพราะการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์สูง มักจะใช้วิธีหลาย ๆ ขั้นตอนซึ่งแต่ละขั้นตอนจะมีการสูญเสียกิจกรรม สิ่งที่ควรคำนึงถึงคือ ความรวดเร็วเพื่อลดการสูญเสียกิจกรรม และต้องเป็นขั้นตอนที่เสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด แต่หากต้องการนำเอนไซม์ไปใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์จะต้องทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์มาก ๆ หรือหากต้องการผลิตเอนไซม์เพื่อการค้า เอนไซม์ที่ผลิตได้ควรมีความบริสุทธิ์สูง และควรคำนึงถึง เวลา ค่าใช้จ่าย และปริมาณเอนไซม์ที่ต้องการ ควบคู่กับการทำบริสุทธิ์ด้วย

การทำไคติเนสจากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคติน โดยทั่ว ๆ ไปแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ endo-chitinase และ exo-chitinase จากการศึกษาพบว่า การทำไคติเนสจากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ต้องใช้หลายวิธีประกอบกัน (ตาราง 9)

ตาราง 9 การทำไคติเนสจากแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ (Felse and Panda, 2000)

Source of chitinase	Purification step	Reference
Acremonium obclavatum	Ammonium sulfate precipitation Dialysis DEAE-cellulose column	Gunaratra and Balasubramanian (1994)
Bacillus sp. MH-1	Potassium phosphate precipitation Mono-P column	Sakai and Yokora (1998)
B. cereus	Ammonium sulfate precipitation Dialysis Gel filtration Vertical Slab Gel electrophoresis	Wang and Moyne (2001)
B. subtilis	Ammonium sulfate precipitation Hydrophobic interaction Chromatography	Brurberg *et.al.,* (1996)
Pseudomonas aeruginosa K-187	Ammonium sulfate precipitation DEAE-sepharose CL-6b chromatography SDS-PAGE Chromatofocussing column	Wang and Yieh (2001)