

บทที่ 2

บททวนเอกสาร

2.1 ไคติน

ไคติน เป็น โพลีเมอร์ชีวภาพ อยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตพอลิแซ็กคาไรด์ ที่พบมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส สามารถพบไคตินได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ (Binod *et al.*, 2005) แหล่งของไคตินในธรรมชาติ จะมีปริมาณของไคตินที่แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ไคติน ถือเป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกสำหรับสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ตัวอย่างเช่น สัตว์ที่มีเปลือก หรือ กระดองแข็ง และ สัตว์ที่มีปลอกแข็งหุ้มตัว พวกแมลง และ สัตว์ทะเล ได้แก่ กุ้ง ปู ปลาหมึก (Singh, 2010; Songsirittitthigul *et al.*, 2010) ในธรรมชาติ ไม่พบไคตินบริสุทธิ์ แต่จะพบในรูปแบบสารประกอบเชิงซ้อน อยู่ร่วมกับโปรตีน และ เกลือของสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ (chitin protein complex) โดยไคตินเมื่อประกอบเป็นโครงสร้างภายนอกของสัตว์พวกแมลงจะรวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไคตินกับโปรตีน ถ้าอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน และ กลูแคน เนื่องจาก ไคตินเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ยาก มีโครงสร้างเป็นผลึก เพราะสมบัติทางเคมี และ ฟิสิกส์ ทำให้ไคตินมีความเสถียร

ไคตินมีโครงสร้างทางเคมีเป็นแบบโพลีเมอร์ที่มีโมเลกุลสายยาวของ *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) ต่อกันเป็นสายเชื่อมต่อกันด้วย β -1,4 glycosidic bond (Chang *et al.*, 2007) มีสูตรโมเลกุลคือ $(C_8H_{13}O_5N)_n$ มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเซลลูโลส ต่างกันตรงหมู่ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 คือ เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ส่วนไคตินมีหมู่อะซิตาไมด์ (acetamide group) ไคตินจึงเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส คุณสมบัติที่เด่นชัดของไคติน คือ ไม่ละลายในน้ำ และ ตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป สามารถละลายได้ในกรดเข้มข้น พวกกรดเกลือ กรดกำมะถัน และ กรดฟอสฟอริก

ไคตินที่พบในธรรมชาตินั้น แบ่งตามการจัดเรียงตัวภายใน โมเลกุล ที่ตรวจสอบด้วยวิธี x-ray diffraction spectra ได้เป็น 3 รูปแบบ (Dahiya *et al.*, 2006) ดังนี้

1) แอลฟาไคติน (α -chitin) เป็น โครงสร้างที่แข็งแรงมาก เพราะมีการจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น มีการจัดเรียงตัวภายใน โมเลกุลแบบสวนทางกัน (antiparallel) และมีพันธะไฮโดรเจนอยู่ในเส้นตรงเดียวกัน พบได้ในเปลือกของแมลง เปลือกกุ้ง กระจงคองปู และ ผนังเซลล์ของเชื้อรา

2) เบตาไคติน (β -chitin) เป็น โครงสร้างที่พบได้น้อยในธรรมชาติ และ แข็งแรงน้อยกว่าพันธะแอลฟาไคติน เพราะมีการจัดเรียงตัวแบบขนานไปทางเดียวหรือในทิศทางเดียวกัน (parallel) จึงจับกันได้ไม่แข็งแรง ทำให้มีความเสถียรต่ำ แต่มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแอลฟาไคติน และเบตาไคตินสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นแอลฟาไคติน ได้ โดยทำปฏิกิริยากับ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นพบได้ใน แกนปลาหมึก

3) แกมมาไคติน (λ -chitin) มีการจัดเรียงตัวภายในโมเลกุลในลักษณะไม่แน่นอน มีทั้งแบบสวนทางกันและทิศทางเดียวกัน

2.2 ไคตินเอส

ไคตินเอส เป็นกลุ่มของเอนไซม์ (chitinolytic enzyme) จำพวก hydrolase ที่สามารถย่อยสลายไคติน ในกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคติน (Kuddus and Ahmad, 2013) โดยไปเร่งการย่อยสลายไคติน ทำให้ได้สารโมเลกุลขนาดเล็ก จำพวก โอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือ โมโนเมอร์ (monomer) และ ได้ผลผลิตเป็น *N*-acetyl-D-glucosamine อิสระที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ออกมา (Bansode and Bajekal, 2006)

กลุ่มของเอนไซม์แบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ exochitinase และ endochitinase (Bhattacharya *et al.*, 2007)

- 1) Exochitinase enzymes แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *N*-acetyl glucosaminidase และ chitobiosidase จะย่อยสลายจากปลายด้าน non-reducing end ให้เป็นหน่วยย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว หรือ chitobiase
- 2) Endochitinase enzymes (chitinase) จะย่อยสลายพันธะ glycosidic แบบสุ่มภายในโมเลกุลของไคติน ภายในสายของโพลีเมอร์ โดยกระบวนการ hydrolysis จะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น chitooligosaccharide (diacetylchitobiose, triacetylchitobiose)

เอนไซม์ไคตินเอส สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง เช่น เชื้อรา แผลง ไส้เดือนฝอย กุ้ง ปู และ สาหร่าย (Liau and Lin, 2008) และ ในสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบในโครงสร้างแต่มีการสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืช และ จุลินทรีย์ เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ อาจมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นภายในเซลล์ตลอดเวลา (constitutive enzyme) แต่สร้างในปริมาณที่ต่ำ หรือ จำเป็นต้องมีตัวชักนำ (inducible enzyme) ให้เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้นมา (Taechowisan *et al.*, 2003) แหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญในปัจจุบัน มาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ และสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถทำได้ในสัตว์ และ พืช ซึ่งในเซลล์พืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ แต่พืชผลิตเอนไซม์ไคตินเอสขึ้นมาเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค หรือ เมื่อถูกรุกรานจากเชื้อก่อโรค หรือ เมื่อเกิดบาดแผล เอนไซม์นี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกของพืช สามารถพบได้ในบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายได้ง่าย เช่น ราก ใบ เมล็ด เนื่องจากพืชจะพัฒนาเป็นกลไกในการป้องกันตนเองจากเชื้อโรค และความเครียดต่างๆที่เกิดขึ้น (Bhattacharya *et al.*, 2007; Dahiya *et al.*, 2006)

สัตว์จำพวกแมลง และ สัตว์ทะเลมีเปลือก เช่น กุ้ง ปู จะมีไคตินเป็นส่วนประกอบในเปลือกของสัตว์เหล่านี้ ทำให้เปลือกแข็งแรง และ คงรูปได้ดี สามารถพบเอนไซม์ไคตินเอสได้ และ พบไคตินเอสได้ในสัตว์บางชนิดที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ปลา และ สัตว์เลื้อยคลานบางชนิดที่ใช้ไคตินเป็นแหล่งอาหาร สามารถพบเอนไซม์ไคตินเอสได้บริเวณตับอ่อน และ เยื่อหุ้มกระเพาะอาหาร พวกสัตว์ขาปล้อง ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่าเอนไซม์ไคตินเอสมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังชั้นนอก การลอกออกของเปลือกเก่า การเคลื่อนที่ และ การย่อยสลายสารอาหารในสัตว์เหล่านี้ และ ในผนังเซลล์ของเชื้อราที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ พบว่าเอนไซม์ไคตินเอสมีความสำคัญกับเชื้อรามากโดยจะเกี่ยวข้องกับการ autolysis เพื่อปล่อยสปอร์ เพื่อให้เกิดการยืดยาวของ stripe (stripe elongation) ใน *Basidiomycete* และ เชื้อราบางชนิดสร้างเอนไซม์ไคตินเอสเพื่อช่วยในการย่อยสลาย และ การเคลื่อนที่ของสารอาหาร ใช้ในการเจริญของเส้นใย (Bhattacharya *et al.*, 2007; Dahiya *et al.*, 2006)

ในแบคทีเรียไม่พบไคตินเป็นส่วนประกอบ แต่พบเอนไซม์ไคตินเอส เพราะแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ไคตินเอสมาย่อยสลายไคตินให้เป็นแหล่งคาร์บอน และ พลังงานเพื่อการดำรงชีวิต และ ในแอคติโนมัยซีทไม่พบไคตินเป็นส่วนประกอบ แต่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอส และ หลั่งออกมานอกเซลล์ได้ เพื่อรับสารอาหาร และ พลังงานจากการย่อยไคตินที่อยู่ในดิน ในปีค.ศ. 1981 William

และ Robinson อ้างโดย มธุรส (2545) ได้ทำการศึกษาบทบาทของ *Streptomyces* sp. ในการย่อยสลายไคตินที่มีสภาพเป็นกรด พบว่ามีการย่อยสลายเกิดขึ้นสองขั้นตอน ในขั้นตอนแรก *Streptomyces* ในกลุ่ม acidophile จะย่อยสลายไคตินในดินที่ทำให้เกิด ammoniumfication ต่อจากนั้น *Streptomyces* ในกลุ่ม neutrophile จะย่อยสลายไคตินที่ได้ต่อไป ผลจากการย่อยสลายไคตินในดินจาก *Streptomyces* sp. ทั้งสองกลุ่มทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในดินให้มีสภาพเป็นกลางหรือต่างมากขึ้น

ในการศึกษาไคตินจากแหล่งต่างๆกัน พบว่า มีคุณสมบัติไม่เหมือนกัน (Binod *et al.*, 2005) เนื่องจาก สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะผลิตเอนไซม์ไคติเนส เพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ physiology และ การนำไปใช้งาน (Bhattacharya *et al.*, 2007) ตัวอย่างเช่น ในตารางที่ 2.1 จะแสดงตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์จากงานวิจัยที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ไม่ว่าจะเป็น เชื้อรา แบคทีเรีย และ แอคติโนมัยซีท

The logo of Chiang Mai University is a circular emblem. In the center is an elephant standing and facing left, with a traditional Thai umbrella (parasol) above its head. The text "CHANG MAI UNIVERSITY 1964" is written in a circle around the elephant. Thai script is also present in the upper part of the circle.

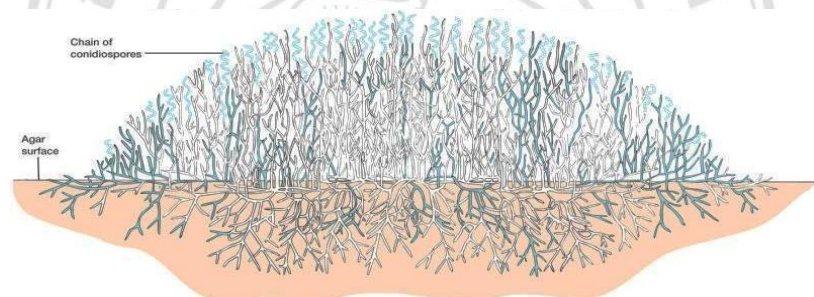
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

จุลินทรีย์	จีโนส (strains)	แยกจาก (isolated from)	เอกสารอ้างอิง
Actinomycete	<i>Streptomyces</i> sp.	Brazilian soil under cerrado vegetation cover	(Gome <i>et al.</i> , 2000)
Fungi	<i>Aspergillus</i> sp.	Chitin-rich soils at shrimp drying fields	(Patidar <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Trichoderma</i> sp.		
	<i>Myrothecium</i> sp.		
	<i>Beauveria</i> sp.		
Actinomycete	<i>Streptomyces venezuelae</i> p10	Soil of coastal region	(Mukherjee and Sen, 2006)
Actinomycete	<i>Streptomyces canus</i>	Krishna river	(Mane and Deshmukh, 2009)
	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>		
	<i>Micromonospora brevicatiana</i>		
Bacteria	<i>Paenibacillus</i> sp. D1	Various intertidal zones, fish drying yards	(Singh, 2010)
Actinomycete	<i>Streptomyces champavatii</i> AZ-1	Water and sediments of the Mideterenian and Red sea coast	(El-Dein <i>et al.</i> , 2010)
Bacteria	<i>Thermophilic Paenibacillus</i> sp. Hul	Soil sample from hot spring	(De-hui <i>et al.</i> , 2011)
Bacteria	<i>Bacillus thuringiensis</i> R 176	Rhizoshgere soil samples from paddy fields	(Chaiharn <i>et al.</i> , 2012)

2.3 แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบบ่อยมากในดิน และมีปริมาณร้อยละของเบส guanine และ cytosine (G+C) สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป (Goodfellow and Williams, 1983) เป็นแบคทีเรียรูปร่างคล้ายเชิรรา โดยอาหารที่เหมาะสมในการแยกแอคติโนมัยซีท มักจะมีการเติมส่วนผสมของแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนในปริมาณที่สูงกว่าปกติ เนื่องจากแอคติโนมัยซีทต้องการปริมาณของคาร์บอน และ ไนโตรเจน ที่สูงในการเจริญ ตัวอย่างอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อคือ Humic acid-Vitamin (HV), Starch-Casein medium (SC) และ Glycerol-Arginine agar (GA) ซึ่งอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ Hickey-Tresner (HT) และ ISP 2 หรือ Yeast-malt extract (YM) โดยอาหารทั้งสองชนิดนั้นมีแหล่งของคาร์บอน และ ไนโตรเจนในปริมาณที่สูงเช่นเดียวกัน (พงศธรวี, 2558)



ภาพ 2.1 ลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท

การเจริญของแอคติโนมัยซีท จะมีการสร้างเส้นใย ซึ่งจัดเป็นเส้นใยที่แท้จริง จากนั้นสร้างเส้นใยขึ้นมา 2 ลักษณะ คือ เส้นใยใต้ผิวอาหาร (substrate mycelium) และ เส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) (Sujada *et al.*, 2014) โคโลนีของแอคติโนมัยซีท เกิดจากการอัดรวมกันแน่นของเส้นใย ทำให้มีลักษณะแข็งคล้ายยางฝังอยู่บนผิวหน้าอาหาร การสร้างสปอร์ของเชื้อจะคล้ายกับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา การสร้างสปอร์ของแอคติโนมัยซีท มีหลายรูปแบบ แบ่งตามการจำแนกของ Vobis ในปี ค.ศ. 1997 อ้างโดย พงศธรวี (2558) ได้ 3 แบบ คือ

1. การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว จะพบได้บ่อยในแอคติโนมัยซีทหลายสกุล พบได้บ่อยสุดคือ *Micromonospora* ก้านชูสปอร์ มีลักษณะเป็นก้านสั้นๆ แตกกิ่งแยกออกมาโดยตรงจากเส้นใยสับตรง การสร้างสปอร์จะเกิดจากการพองตัวบริเวณปลายของเส้นใย มีการสร้างผนังกันขึ้น และ พัฒนาเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์

2. การสร้างสปอร์แบบสายโซ่ เกิดจากการแบ่งตัวของเส้นใยตามแนวขวางออกเป็นห้องๆ หลังจากนั้น ผนังเซลล์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของเส้นใยตามแนวขวางจะพัฒนาไปเป็นผนังสปอร์ที่สมบูรณ์ สายสปอร์ที่สร้างขึ้นยังสามารถแบ่งได้หลายชนิดตามจำนวนของสปอร์ เช่น การสร้างสปอร์ที่ละคู่ การสร้างสปอร์แบบต่อสายสั้นๆ และ การสร้างสปอร์แบบต่อสายยาว
3. การสร้างสปอร์แบบถุงหุ้ม ตัวสปอร์จะมีการสร้างได้หลายรูปแบบ และ บรรจุอยู่ภายในถุงหุ้มจนกว่าจะแตกออก และ ปลดปล่อยสปอร์สู่ธรรมชาติ ซึ่งถุงหุ้มไม่ได้จัดเป็นส่วนหนึ่งของสปอร์ แต่จะทำหน้าที่แค่ห่อหุ้มสปอร์เอาไว้เท่านั้น

แอคติโนมัยซีทมีอัตราการเจริญช้ากว่าแบคทีเรีย และ เชื้อรา ประมาณ 7-14 วัน จึงจะสร้างโคโลนีที่สมบูรณ์ คือ มีทั้งเส้นใยได้ผิวอาหาร และ เส้นใยเหนืออาหารปรากฏให้เห็น อาจใช้เวลาถึงหนึ่งเดือน สำหรับชนิดที่เจริญช้า ในบางชนิดที่สร้างเส้นใยทั้งสองแบบ ในธรรมชาติพบแอคติโนมัยซีทเจริญแบบ saprophyte คือ จะทำการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ เพื่อการเจริญเติบโต พบได้หลายแห่ง เช่น ในน้ำ อากาศ ดิน และ พืช แต่ส่วนใหญ่มักพบในดินที่เป็นกรดอ่อนถึงกลาง ระหว่าง 3.6-6.5 ที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์ ในปี ค.ศ. 1997 การทดลองของ Vobis อ้างโดย พงศ์ระวี (2558) รายงานว่าภายในผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทประกอบด้วยชั้นของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) การสร้างเปปติโดไกลแคนของแอคติโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของโพลิเมอร์เปปไทด์ และ ไกลแคนที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน และ น้ำตาล องค์ประกอบที่สำคัญของเปปติโดไกลแคน คือ polysaccharide ที่ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลสองชนิดคือ NAG และ NAM เรียงตัวกันเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic ซึ่งพันธะนี้จะมีแข็งแรงมาก ปกติแล้วเปปติโดไกลแคน จะมีการเรียงตัวเป็นชั้นหนา มีการเชื่อมกันด้วยพันธะ tetra peptide โดย พันธะ tetra peptide เกิดจากการเรียงตัวเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน L-alanine D-alanine glutamic และ lysine หรือ DAP โดยที่ DAP จะสร้างพันธะที่เรียกว่า peptide interbridge เชื่อมกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน D-alanine ในบริเวณปลายสายของพันธะ tetra peptide อีกฝั่งเพื่อยึดชั้นของไกลแคนอีกชั้นเข้าด้วยกัน โคโลนีของแอคติโนมัยซีทจะประกอบด้วย เส้นใยหลากหลายช่วงอายุ เส้นใยรอบนอกโคโลนีจะเป็นเส้นใยที่มีอายุน้อย มักไม่มีการสร้างสารปฏิชีวนะ แต่จะทำหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหาร เพื่อการเจริญมากกว่า ในขณะที่เส้นใยตรงกลางโคโลนีจะเป็นเส้นใยที่มีอายุมากซึ่งจะมีการปรับเปลี่ยนหน้าที่มาสร้างสปอร์แทน พบว่าเส้นใยบริเวณที่มีการสร้างสปอร์จะมีการสร้างสาร

ปฏิชีวนะออกมา และ ยังสร้างฮอร์โมนไปกระตุ้นให้เส้นใยบริเวณรอบนอกโคโลนีเริ่มแสดงออก
สร้างสารปฏิชีวนะ และ สปอร์ด้วย

การวิเคราะห์ผนังเซลล์ เป็นการศึกษาความแตกต่างของชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในเปปติโดไกลแคน ในแอคติโนมัยซีทสามารถพบกรดไดอะมิโนไพเมอิก (diaminopimelic acid) หรือ DAP ได้สองรูปแบบ คือ *LL*-DAP และ *meso*-DAP ซึ่งจะใช้ความแตกต่างของ DAP ในการจำแนกกลุ่มของแอคติโนมัยซีท วิธีการระบุชนิดของ DAP ได้รับการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1979 โดย Harper and Davis ที่นำเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางชนิดสองมิติมาใช้ในการแยกโมเลกุลของ *LL*-DAP และ *meso*-DAP ออกจากกัน โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่สองชนิด พบว่า *LL*-DAP จะละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ดี และ ดูดซับกับวัฏภาคคงที่น้อยทำให้เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ดีกว่า *meso*-DAP จึงพบตำแหน่งของ *LL*-DAP อยู่สูงกว่า *meso*-DAP แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่สิ้นเปลือง และ ใช้เวลาในการทดสอบนาน ในปี ค.ศ. 1983 Hasegawa อ้างโดย พงศ์ระวี (2558) จึงได้พัฒนาวัฏภาคเคลื่อนที่เพียงชนิดเดียวร่วมกับเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางชนิดหนึ่งมิติ อ่านผลเหมือนวิธีแรก แต่จะต้องใช้เครื่อง HPLC เข้ามาช่วยในการตรวจสอบด้วย

การระบุชนิดโดยใช้เทคนิคทางดีเอ็นเอ โดยการศึกษาชิ้นส่วน 16S rRNA พบว่า ชิ้นส่วน 16S rRNA เป็นชิ้นที่มีความเหมาะสมที่สุด ในการช่วยระบุสายพันธุ์ของแอคติโนมัยซีท เพราะชิ้น 16S rRNA เป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมที่จำเป็นสำหรับการสร้างโปรตีน จึงมีความคงตัวสูงเมื่อเทียบกับชิ้นอื่น และ มีความยาวเฉลี่ยที่เหมาะสมทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วน 16S rRNA แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ rRNA ต่างๆ เช่น Genbank (NCBI) โดยเลือกใช้ Nucleotide BLAST (BlastN) เพื่อดูความเหมือน และความต่างของชิ้นส่วนนี้กับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียง เมื่อทำการเปรียบเทียบแล้ว ถ้าลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกันน้อยกว่าร้อยละ 97 แสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นมีโอกาสเป็นชนิดใหม่

แอคติโนมัยซีทที่อยู่ในดิน จะอาศัยการย่อยสลายสารประกอบทางชีวเคมี เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน และ สารอาหารในการเจริญเติบโต เนื่องจากในดินมีการสะสมของสารประกอบอินทรีย์ ที่เป็นแหล่งอาหารของแอคติโนมัยซีทในปริมาณที่มาก และ เป็นแหล่งที่พบเมดิซิน สารพิษ ฮอร์โมนพืช เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ สารยับยั้งเอนไซม์ การพัฒนาสารภูมิคุ้มกัน และ วิตามิน (Bhattacharya *et al.*, 2007) ซึ่งสารเหล่านี้มีมูลค่าทางเศรษฐกิจและเกี่ยวข้องกับการดำเนินชีวิตของมนุษย์ เป็นการควบคุมการแสดงออกขั้นสูงโดยจะไม่พบการสร้างสารปฏิชีวนะในขณะที่เซลล์ที่อายุน้อยหรือเมื่อเซลล์ยังมีอาหารสำหรับการเจริญอย่างอุดมสมบูรณ์หรือมีปริมาณของคาร์บอน ในโตรเจน และ ฟอสฟอรัส

อย่างเพียงพอ เพราะสารเหล่านี้จัดเป็นตัวการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะ เมื่อเซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ภาวะที่สารอาหารมีจำกัดหรือสภาวะขาดแคลนสารอาหาร การสร้างสารปฏิชีวนะจึงถูกกระตุ้นขึ้น

แอคติโนไมซีตจัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสาร secondary metabolite ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิด และ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมได้ เช่น ฮอร์โมนพืช เอนไซม์ และ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือ สารปฏิชีวนะ Goodfellow and Williams (1983) รายงานว่าแอคติโนไมซีตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส เพคติน เคราติน และ ไคติน ที่เป็นองค์ประกอบหลักของซากพืช และ สัตว์ จะเจริญในดินได้ดี ในปี ค.ศ. 1993 Miyashita และ Fujii อ้างโดย พงศ์ระวี (2558) พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้มากขึ้น ถ้าเติมสารตั้งต้นจำพวก แพคติน ไชแลน และ เซลลูโลส ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการกระจายตัวของแอคติโนไมซีต มักพบสกุล *Streptomyces* ได้บ่อย และ พบมากในทุกสภาวะ เมื่อเทียบกับสกุลอื่น เช่น *Actinoplanes*, *Amycolatopsis* และ *Catenuloplanes*

2.4 การสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในแอคติโนไมซีต

การสร้างเอนไซม์ไคตินเนสโดยแอคติโนไมซีตในห้องปฏิบัติการ มีการศึกษากันมาก ซึ่งปริมาณของเอนไซม์จะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ กันแล้วแต่นิคมของเชื้อแอคติโนไมซีต จากการศึกษา พบว่าแอคติโนไมซีตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ ถึงแม้จะไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างเช่น *Micromonospora carbonacea* (El-Tarabily *et al.*, 2000), *Amycolatopsis orientalis* (Murata *et al.*, 2005) โดยเฉพาะกลุ่มของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรตีน และ สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้เป็นจำนวนมาก เช่น *Streptomyces halstedii* (Joo, 2005), *S. venezuelae* p10 (Mukherjee and Sen, 2006), *S. canus*, *S. pseudogriseolus* และ *M. brevicatiana* (Mane and Deshmukh, 2009) และ ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อแอคติโนไมซีตนั้นได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และ สร้างเอนไซม์ โดยการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ค่ากรดเบส และ สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เป็นต้น โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และ ค่า specific activity ของเอนไซม์

เชื้อแอคติโนไมซีตที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว เมื่อมีแหล่งไคตินที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 สามารถผลิต

เอนไซม์ไคตินเนสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 100 ml ที่มี colloidal chitin เป็นสับเตรท นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ค่า chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 1,130 mU/ml (Tsujiro *et al.*, 1993) หรือ การทดลองของ Gomes และ คณะ (2000) ทำการศึกษาการย่อยสลายไคตินบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท 49 ไอโซเลตสามารถสร้างวงใสได้ จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. 5 ไอโซเลตที่มีการสร้างวงใสสูง ลงในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ไอโซเลต M7a, M08 ให้ค่า endochitinase activity ที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อทางการค้า (*Streptomyces griseus*) และ ไอโซเลต M08 ให้ค่า specific activity สูงกว่าเชื้อทางการค้า แม้จะเปลี่ยนสับเตรทเป็น Mu-(GlcNac)₃ ผลที่ได้ก็ไม่แตกต่างกัน สำหรับค่า endochitinase activity ที่มี glycol chitin เป็นสับเตรท ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วงเบส คือ มากกว่า 7 และ เชื้อไอโซเลต 218 ให้ค่า specific activity สูงสุด เท่ากับ 190 U/mg protein ที่ pH 8.0 และ อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ อยู่ในช่วง 40-50 °C โดยที่เชื้อไอโซเลต 218 ให้ค่า chitinase activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 °C เมื่อนำไปทดสอบ antifungal ทั้ง 5 ไอโซเลต กับเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium soloni*, *Aspergillus parasiticus* และ *Magnaphorthe grisea* พบว่ามี 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ คือ ไอโซเลต 208 , 218 และ M08 (Tsujiro *et al.*, 1993)

จากงานวิจัยของ El-Tarabily ในปี 2000 ทำการแยกเชื้อจากดินผักกาดหอม ได้แบคทีเรีย 85 ไอโซเลต และ แอคติโนมัยซีทกลุ่ม *Streptomyces* 94 ไอโซเลต และกลุ่ม Non-*Streptomyces* 35 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดไปทดสอบบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar (CCA) โดยดูจากค่า HC value พบว่า แบคทีเรีย 23 ไอโซเลต และ แอคติโนมัยซีทกลุ่ม *Streptomyces* 38 ไอโซเลต และกลุ่ม Non-*Streptomyces* 15 ไอโซเลตที่สามารถสร้างวงใสได้ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MSM เพื่อหาค่า chitinase activity ผลการทดลองพบว่า เชื้อ แบคทีเรีย *Serratia marcescens* ให้ค่า activity สูงสุด เท่ากับ 5,510 mU/ml รองลงมาคือ แอคติโนมัยซีทสองไอโซเลตคือ *Streptomyces viridodisticus* (4,080 mU/ml) และ *Micromonospora carbonacea* (3,680 mU/ml) (El-Tarabily *et al.*, 2000) และจากการทดลองของ Kim และ Ji ในปี ค.ศ. 2001 ทำการหาค่า chitinase activity และ specific activity ของเชื้อ *Streptomyces griseus* HUT 6037 โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนสองชนิดคือ powder chitin และ colloidal chitin ผลการทดลองพบว่า เมื่อมี powder chitin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสร้างเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 ค่า chitinase activity เท่ากับ 8,600 mU/ml ส่วนเมื่อใส่ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นพบว่า ค่า chitinase activity น้อยกว่า powder chitin แต่ค่า specific activity ที่วันที่ 5

(12.6 U/mg protein) นั้นมากกว่าของ powder chitin (8.3 U/mg protein) จึงเลือก colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (Kim and Ji, 2001)

Taechowisan *et al.*, 2003 ศึกษาการสร้างวงไสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar (CCA) และวัดค่า chitinase activity พบว่าเชื้อ *Streptomyces aureofaciens* CMU Ac-130 ให้ค่าสูงสุด (0.0833 mU/ml) จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) colloidal chitin บ่มที่อุณหภูมิ 30-40 °C ที่ค่า pH ของอาหารเท่ากับ 6.5-7.0 หลังจากนั้น ทำการทดสอบน้ำตาลทั้งสิบชนิด (sugar addition) ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) พบว่า ค่า chitinase activity ของ arabinose fructose lactose cellobiose glucose และ sucrose ให้ค่า chitinase activity น้อยกว่า 0.02 mU/ml และ NAG ให้ค่าสูงสุด เท่ากับ 0.09 mU/ml เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (0.08 mU/ml) และรองลงมาคือ raffinose (0.07 mU/ml) mannose (0.06 mU/ml) และ xylose (0.04 mU/ml) ตามลำดับ ต่อมา นำ NAG มาหาค่าความเข้มข้นที่ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เมื่อใส่ลงในอาหารที่มี 1% colloidal chitin ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% ให้ค่า สูงสุด เท่ากับ 0.09 mU/ml และ พบว่าถึงแม้จะไม่ใส่ NAG เลย เชื้อก็สามารถสร้างเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.09 mU/ml และ ที่ความเข้มข้นของ NAG 0.5% ที่ไม่ใส่ colloidal chitin พบว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส แสดงว่าเอนไซม์ไคตินเนสจะสร้างเมื่อมี colloidal chitin จากนั้นทดสอบแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ ball mill, crude chitin, colloidal chitin และผงเซลล์ของเชื้อ กำหนดความเข้มข้นที่ 1% (w/v) ผลการทดลองพบว่า colloidal chitin ให้ค่า chitinase activity สูงสุด 0.08 mU/ml (Taechowisan *et al.*, 2003)

จากงานวิจัยในปี 2005 โดยการศึกษาของ Joo ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces halstedii* AJ-7 และหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2% (w/v) colloidal chitin ให้ค่า chitinase activity เท่ากับ 4,100 mU/ml จึงเลือกมาศึกษาต่อ จากนั้นทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม คือ CMC starch และ glucose ผลการทดลองพบว่าเมื่อใส่ CMC หรือ แป้ง ที่ความเข้มข้นที่น้อย จะผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้มากกว่า 1,000 mU/ml ตัวอย่างเช่น ใส่ 0.2% colloidal chitin และ 0.1% CMC (chitinase activity = 1,080 mU/ml) หรือใส่ 0.2% colloidal chitin และ 0.1% starch จะได้ค่า chitinase activity เท่ากับ 10,700 mU/ml แต่ถ้าใส่มากเกินไปจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส เช่น ใส่ 0.2% colloidal chitin และ 0.5% CMC ค่า chitinase activity เท่ากับ 5,300 mU/ml หรือใส่ 0.2% colloidal chitin และ 0.5% starch ค่า chitinase activity เท่ากับ 5,500 mU/ml ส่วน glucose นั้นพบว่าช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยความเข้มข้นที่ทำให้เอนไซม์สูงสุดคือ 0.4% (12,300 mU/ml) แต่ถ้าใส่มากกว่า 0.4% จะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส (Joo, 2005)

นอกจากการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสแล้ว เชื้อแอกติโนมัยซีท์ยังสามารถสร้างสารต้านทานเชื้อราในอาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในการศึกษาของ Hoster และ คณะ ทำการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีท์ 5 ไอโซเลท (MG1-MG5) โดยไอโซเลท MG3 เมื่อทำการระบุสายพันธุ์พบว่า เป็น *Streptomyces griseus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin เป็นสับเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3.7 ชั่วโมง ค่า specific activity เท่ากับ 0.25 U/mg protein จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 45-50 °C และ ค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5-7 (Hoster *et al.*, 2005) และ หลังจากนั้นมีการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อ *S. venezuelae* p10 โดยทดสอบในอาหารเหลว EPM ที่มี 0.6% (w/v) colloidal chitin จาก crab shell chitin บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน เก็บน้ำเลี้ยงมาทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าค่า specific activity เท่ากับ 8.35 U/mg protein (Mukherjee and Sen, 2006) และ ในการทดลองของ Gadelhak และคณะ ในปี 2005 ทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* sp. บนอาหารแข็ง colloidal chitin agar (CCA) พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 23 ไอโซเลท โดยมี *Streptomyces* sp. 15 ไอโซเลท และ Non-*Streptomyces* 2 ไอโซเลท ที่ให้ค่าวงใสสูงสุด จากนั้นหาค่า chitinase activity โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว Minimal synthetic medium (MSM) ที่มี colloidal chitin เป็นสับเตรท พบว่าเชื้อ *Actinoplanes philippinensis* ไอโซเลท 1, *A. missouriensis* ไอโซเลท 7 และ *Streptomyces clavuligerus* ไอโซเลท 40 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5,230, 4,770 และ 4,650 mU/ml ตามลำดับ (Gadelhak *et al.*, 2005)

ในการทดลองของ Bansode และ Bajekal ในปี 2006 ทำการแยกเชื้อจากดินแถบทะเลสาบที่มีค่าเป็นด่าง ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท จากนั้นนำไปทดสอบในอาหารแข็ง colloidal chitin agar ที่มี colloidal chitin เป็นสับเตรท พบ 5 ไอโซเลทที่ให้ค่าวงใสสูง ได้แก่ เชื้อแอกติโนมัยซีท์ *Streptomyces albidoflavous* SB1 และ *S. albidoflavous* VB3 และในการหาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เหมาะสม พบว่าเชื้อ *S. albidoflavous* SB1 นั้นมีค่า pH ที่เหมาะสมที่ 6 และเจริญได้ถึง pH 8 และเชื้อ *S. albidoflavous* VB3 มีค่า pH ที่เหมาะสมที่ 9 และ stability ที่ pH 10 (Bansode and Bajekal, 2006) และ ในการทดลองของ Mane และ Deskmukh (2009) ได้ทำการทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีท์ทั้งหมด 80 ไอโซเลท ในอาหารแข็ง colloidal chitin agar พบ 52 ไอโซเลทที่มีการสร้างวงใส ทำการเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท ที่ให้ค่าวงใสสูงสุด นำไประบุสายพันธุ์ ได้แอกติโนมัยซีท์ทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ *Streptomyces canus* KS10, *S. pseudogriseolus* BH1 และ *Micromonospora brevicatiana* RE14 จากนั้น ทำการหาค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อ พบว่าที่ pH 8 เป็นค่าที่เหมาะสม เพราะให้ค่า chitinase activity สูงสุดทั้ง 3 เชื้อคือ *S. canus* KS10 (3,500 mU/ml) *S. pseudogriseolus* BH1 (3,200 mU/ml)

และ *M. brevicatiana* RE10 (4,000 mU/ml) และจากนั้นหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า ในเชื้อ *S. canus* KS10 ที่ความเข้มข้น 1.2% ให้ค่า chitinase activity สูงสุด (4.8 U/ml) และ *M. brevicatiana* RE14 ส่วนเชื้อ *S. pseudogriseolus* BH1 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 1% และศึกษาระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์ พบว่าเชื้อทั้ง 3 เริ่มสร้างเอนไซม์ที่วันที่ 3 และ สร้างสูงสุดวันที่ 6 ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ *S. canus* KS10 (3,100 mU/ml) *S. pseudogriseolus* BH1 (4,200 mU/ml) *M. brevicatiana* RE14 (3,400 mU/ml) และ งานของ Naranaya และ Vijayalakshmi ในปี ค.ศ. 2009 ทำการศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. ANU 6277 โดยหาวันที่เชื้อสร้างเอนไซม์สูงสุด ทำการวัดเอนไซม์ทุกวัน พบว่าเชื้อเริ่มสร้างเอนไซม์ที่ 24 ชั่วโมง และสร้างสูงสุดที่ 60 ชั่วโมง ค่า chitinase activity เท่ากับ 6,800 mU/ml และลดลงหลังจาก 72 ชั่วโมง จากนั้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยกำหนดช่วง 0.25-2.5% ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1% ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 7000 mU/ml รองลงมาคือ 0.5% (6,800 mU/ml) และ 1.5% (6,100 mU/ml) และ หาค่า pH ที่เหมาะสม ตั้งแต่ 4-9 พบว่าที่ pH 6 ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 7,100 mU/ml รองลงมาคือ pH 7 (7000 mU/ml) โดยที่ค่า pH อื่นนั้นให้ค่า activity ต่ำกว่า 4000 mU/ml หาค่า pH ที่เหมาะสม ตั้งแต่ 4-9 พบว่าที่ pH 6 ให้ค่า chitinase activity สูงสุด เท่ากับ 7,220 mU/ml และพบว่า glucose กับ arabinose ไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และ cellulose กับ maltose นั้นไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ จากนั้นศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ทั้งหมด 6 ชนิด ผลการทดลองพบว่า yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.4% ให้ค่า chitinase activity สูงที่สุด (8,840 mU/ml) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (6,980 mU/ml)

จากงานวิจัยของ Tang-um และ Niamsup ในปี ค.ศ. 2012 ทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเอสด้วยวิธีการสร้างวงใส ที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Streptomyces* sp. ไอโซเลท P4 ให้ค่าวงใสสูงสุด จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าวันที่ 5 เชื้อสร้างเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 0.93 mU/ml และค่า specific activity เท่ากับ 0.050 U/mg protein เชื้อตัวนี้สร้างเอนไซม์ในช่วง log phase โดยเริ่มสร้างวันที่ 2 และสูงสุดที่วันที่ 5 หลังจากวันที่ 5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดน้อยลง และ ต่ำสุดเมื่อเข้าสู่ช่วงของ stationary phase

2.5 การตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส

2.5.1 ตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยไคติน

งานวิจัยในปี 1994 ของ Frandberg and Schnurer อ้างโดย มธุรส (2545) ได้ทำการศึกษาความสามารถของเอนไซม์โดยการดูวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหาร chitin agar (0.075% (w/v) colloidal chitin, 2% (w/v) agar และ 0.02% (w/v) sodium azide ใน 50 m/mol potassium phosphate buffer pH 6.1 วางแผ่น disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm บนจานอาหาร โดยชุดควบคุมวางตรงกลาง ส่วนจุดอื่นๆจะตรวจสอบโดยหยดเอนไซม์ปริมาตร 20 μ l ลงบนแผ่น disc บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจดูวงใสที่เกิดขึ้น

2.5.2 การตรวจวัดจากปริมาณผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้น

ทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทภายใต้สภาวะที่กำหนด ไคตินจะถูกย่อยสลายให้มีโมเลกุลที่เล็กลงได้เป็น reducing sugar การวัดอัตราการปลดปล่อยของ N-acetylglucosamine ทำได้หลายวิธี คือ

1) Imoto and Yagishita method (Imoto and Yagishita, 1971)

ทำการตรวจสอบปริมาณของ poly-N-acetylglucosamine (NAG) โดยวิธี modified of Schales procedure โดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็น reducing sugar group ที่มีความเข้มข้น 0-0.15 mg ของ NAG เท่านั้น โดยมีวิธีวัดดังนี้ เตรียม 0.5M sodium carbonate 1 L โดยชั่ง potassium ferricyanide 0.5 g ละลายลงไป เก็บในขวดสีชา เมื่อต้องการวัด activity จะใช้ตัวอย่างปริมาตร 1.5 ml ร่วมกับ reagent 2 ml ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม ต้มน้ำเดือด 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (nm) ใช้ N-acetylglucosamine เป็นสารละลายมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐาน

2) Miller method (Miller, 1959)

ตรวจวัด reducing sugar โดยใช้ dinitrosalicylic acid (DNS) reagent และ reaction mixture ประกอบด้วย crude enzyme 0.3 ml และ 1% (w/v) swollen chitin 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DNS reagent 0.75 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10

นาที่ นำสารละลายส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสง (OD absorbance) ที่ความยาวคลื่นที่ 575 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ *N*-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

3) Reissig method (Reissig *et al.*, 1955)

ทำการตรวจสอบค่า chitinase activity โดยการวัดหา *N*-acetylglucosamine ที่แยกออกมาจากไคติน โดยวิธีของ Reissig (1955) ซึ่งพบว่าเป็นการวัดโดยใช้ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) reagent เมื่อวัดแล้วพบว่า 1 หน่วยเท่ากับ 1 μ mol ของ *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาต่อ 1 นาที ภายในสภาวะที่เหมาะสม ทำการตรวจวัด *N*-acetyl amino sugar โดยใช้ *p*-dimethylaminobenzaldehyde reagent (DMAB) และ reaction mixture ประกอบด้วย 0.5% (w/v) swollen chitin 0.2 ml ผสมกับเอนไซม์ 0.2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดย *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) reagent 3.0 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวัด วัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นที่ 585 nm โดยใช้ *N*-acetylglucosamine เป็นกราฟมาตรฐาน

2.5.3 Chromogenic assay (Robert and Selitrennikoff, 1988)

ในปี ค.ศ. 1988 Robert และ Selitrennikoff อ้างโดย สูดาพร (2540) ได้ทำการตรวจสอบ chitinase activity โดยวัดค่า *p*-nitrophenol ที่ถูกปล่อยออกมาจาก *p*-nitrophenol- β -D-N,N-diacetylchitobiose ซึ่งเป็นวิธีการวัดค่าการทำงานของไคตินเอสอีกแบบหนึ่ง ซึ่งเป็นการตัดของ exochitinase โดยตัดจาก non-reducing end ของสับสเตรท จึงได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น *p*-nitrophenol

2.6 การนำเอนไซม์ไคตินเอสไปใช้ประโยชน์

เอนไซม์ไคตินเอส ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการต่างๆ อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นการนำไปย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และ อุตสาหกรรมอาหารทะเล การควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว เป็นต้น จึงทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อพัฒนา และ ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้มากขึ้น โดยเอนไซม์ไคตินเอสจะนำไคตินกลับมาใช้ใหม่ เป็นแหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน โดยประยุกต์วิธีในการทำให้ไคตินบริสุทธิ์ และ ทำการปรับเปลี่ยนไคตินที่ได้มาจากของเสีย เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ (Chaiharn *et al.*, 2012)

1) การควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol)

แมลง และ เชื้อราที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในพืช มีไคตินเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของผนังเซลล์ และ ในเปลือกหุ้มของแมลง (exoskeleton) ไคตินจึงเป็นเป้าหมายของไคตินเอสในการยับยั้งโรคพืช นาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอส มาย่อยไคตินเพื่อใช้เป็นสับเตรท จะได้สารต้านเชื้อรา เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา (Bhattacharya *et al.*, 2007)

2) การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

ใช้ไคตินเอสประเภท endochitinase ในการเปลี่ยนแปลงเปลือกกุ้ง และ ปลา ซึ่งเป็นกากเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมบางประเภทมาเป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว มีรายงานว่าสามารถใช้ *Myrothecium verrucaria* ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ และ *Saccharomyces cerevisiae* ผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโปรตีนเซลล์เดียวที่ผลิตได้ จะมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 61% และมีกรดนิวคลีอิก ประมาณ 3.1% (Bhattacharya *et al.*, 2007)

3) การผลิต fungal protoplast

การทำ protoplast ของเชื้อรา เพื่อนำมาศึกษา การสังเคราะห์ผนังเซลล์ การผลิตเอนไซม์ออกจากผนังเซลล์ เตรียม protoplast โดยใช้เอนไซม์ไคตินเอสจำนวนมากในการย่อยสลายเส้นใย อาจจะใช้เอนไซม์ชนิดเดียว หรือ ใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันทำ protoplast ก็ได้

2.7 การออกแบบการทดลองทางสถิติ (Statistic experimental design)

การออกแบบการทดลองทางสถิติ เป็นวิธีการที่ใช้เทคนิคทางสถิติ และ คณิตศาสตร์ มาประยุกต์ใช้กับการทดลอง กระบวนการในการวางแผนการทดลองเพื่อจะได้มาซึ่งข้อมูลที่เหมาะสมโดยวิธีการทางสถิติ สามารถนำไปใช้หาข้อสรุปได้ แม้ว่าในทางทฤษฎีการออกแบบการทดลองแบบ Full factorial design จะมีความแม่นยำของผลสูงกว่า แต่ในทางปฏิบัติอาจได้ผลที่แย่กว่าเนื่องจากยังมีปัจจัยมาก จำนวนการทดลองหรือเงื่อนไขมากขึ้น ทำให้ควบคุมการทดลองได้ยาก และเกิดความผิดพลาดเพิ่มมากขึ้น จึงนำหลักการนี้มาใช้ประโยชน์เพื่อลดขนาดของการทดลอง หรือเรียกว่า Fractional factorial design เป็นการนำหลักการออกแบบการทดลองทางสถิติ ทำการทดลองเพียงบางเงื่อนไขจากทั้งหมด มีการลดเงื่อนไขการทดลองให้ลดน้อยลงจนเหลือขนาดการทดลองที่สามารถทำได้จริง จากในการทดลองที่มีปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย มีหัวข้อย่อยคือ Plackett and

Burman Design, 2 level factorial design และ Taguchi OA ในการทดลองนี้จะอธิบายถึงหลักการของการทดลองแบบ Plackett and Burman Design

2.7.1 Plackett and Burman Design

ในปี ค.ศ. 1946 R.L. Plackett และ J.P. Burman ได้ตีพิมพ์ผลงานที่ชื่อ “The design of Optimal Multifactorial experiment” นำเสนอวิธีการออกแบบการทดลอง Plackett and Burman Design โดยประยุกต์การออกแบบการทดลองด้วยวิธี factorial design 2 ระดับ เป็นวิธีการออกแบบการทดลองทางสถิติที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่มีอยู่หลายปัจจัยกับผลลัพธ์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการปรับเปลี่ยนค่าของปัจจัยนั้น โดยการทดลองนี้จะใช้ในการคัดเลือกหรือกลั่นกรองปัจจัยที่มีความสำคัญหรือที่มีอิทธิพลต่อการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ การคัดเลือกเป็นการลดจำนวนตัวแปรให้มีจำนวนน้อยลง ทำให้สามารถพิจารณาเฉพาะตัวแปรที่มีความสำคัญต่อการทดลองได้ ข้อดีคือ ช่วยลดระยะเวลาในการวางแผนการทดลอง และ ประหยัดสารเคมีหรือวัตถุดิบตั้งต้นในการทดลอง

วิธีการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman เราสามารถใช้การทดลอง N สิ่งทดลอง เพื่อทำการคัดเลือกปัจจัย $N-1$ ปัจจัย สำหรับการทดลอง Plackett and Burman นี้ค่า N จะมีค่าเป็น 4 เท่าของตัวเลขจำนวนเต็ม หรือมีอนุกรมเป็นจำนวนเท่าของ 4 เช่น 4, 8, 12, 16 และ 20 เป็นต้น ในการกำหนดปัจจัยในการทดลองจะต้องมี dummy variable อย่างน้อย 2 ตัว เพื่อใช้ในการคำนวณค่า variable ของการทดลอง (dummy เป็นตัวแปรที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการทดลอง) ยังมี dummy variable มากๆ ยิ่งทำให้การประมาณค่า standard error (SE) ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ในการทดลองให้เลือกจำนวน N ที่มากกว่าจำนวนของปัจจัยที่ต้องการศึกษาเพื่อสร้าง dummy effect สำหรับใช้คำนวณหาค่า SE ซึ่งต้องใช้ในการคำนวณต่อไป ตัวอย่างเช่น มีปัจจัย 4-5 ตัว ให้เลือก $N = 8$, มีปัจจัย 6-9 ตัว ให้เลือก $N = 12$ และ มีปัจจัย 10-13 ตัว ให้เลือก $N = 16$ ในการเลือกจำนวน N สำหรับการทดลองใดๆ ขึ้นอยู่กับจำนวนปัจจัยที่ศึกษา โดยจำนวนแผนการทดลอง N สามารถใช้คัดเลือกปัจจัยได้สูงสุดเท่ากับ $N-2$ ปัจจัย ตัวอย่างเช่น หากต้องการศึกษา 9 ปัจจัย จำนวน N ที่เหมาะสมคือ 12 และหากปัจจัยที่ศึกษามี 7 ปัจจัย จะไม่สามารถใช้ $N = 8$ ได้ เพราะ degree of freedom ของปัจจัยจะเป็น 7 และรวมกับ intercept อีก 1 จะเป็น 8 เนื่องจากไม่มี degree of freedom เหลือเพื่อใช้ทดสอบความแปรปรวน จึงต้องใช้แผนการทดลองจำนวน 9 เป็นอย่างน้อย ดังนั้นจึงต้องเลือก $N = 12$

การทดลองแบบ Plackett and Burman จะทำการกำหนดระดับของค่าผลกระทบที่ 2 ระดับ คือ ค่าต่ำสุด และ สูงสุดของแต่ละระดับปัจจัยแต่ละตัว กำหนดให้

+1 หรือ (+) แทนค่าสูงสุด (high level) หรือ ค่าระดับสูง

-1 หรือ (-) แทนค่าต่ำสุด (low level) หรือ ค่าระดับต่ำ

หลักการในการออกแบบการทดลอง และการคำนวณของ Plackett and Burman จะใช้การทดลองหาค่าของผลลัพธ์ ทำให้ผลที่ได้ของการออกแบบการทดลอง และการคำนวณของ Plackett and Burman สามารถหาค่าความสัมพันธ์สุดท้ายให้เหลือเพียงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่เลือกศึกษากับตัวแปรที่มีความคลาดเคลื่อนต่ำ โดยใช้หลักการทางสถิติ t-test เพื่อคำนวณออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่น จากตารางที่ 2.2 เป็นเงื่อนไขของการทดลองต่างๆ 12 เงื่อนไข จะถูกแทนค่าด้วยปัจจัยที่สนใจ 7 ปัจจัย (A-G) เพื่อใช้เป็นรูปแบบการทดลอง และ นำไปหาผลลัพธ์ ส่วนปัจจัย dummy (H-K) จะถูกนำไปคำนวณเพื่อหาความเชื่อมั่นตามหลักสถิติ โดยสามารถวิเคราะห์ความสำคัญของปัจจัยด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติ เมื่อทำการทดลองจะมีเพียงบางอิทธิพลหลัก (main effect) และ บางอิทธิพลร่วม (interaction effect) เท่านั้นที่มีความสำคัญ ซึ่งในการทดลองนั้นจะวิเคราะห์ ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถศึกษาถึงผลของ interaction ต่างๆที่มีในการทดลองได้

ตาราง 2.2 เงื่อนไขการทดลองโดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design

Run	Factor										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-

ตาราง 2.2 เงื่อนไขการทดลองโดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman design (ต่อ)

Run	Factor										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A-G คือ ปัจจัยที่ต้องการศึกษา H-K คือ dummy 1-12 คือ ค่าของเงื่อนไขการทดลอง

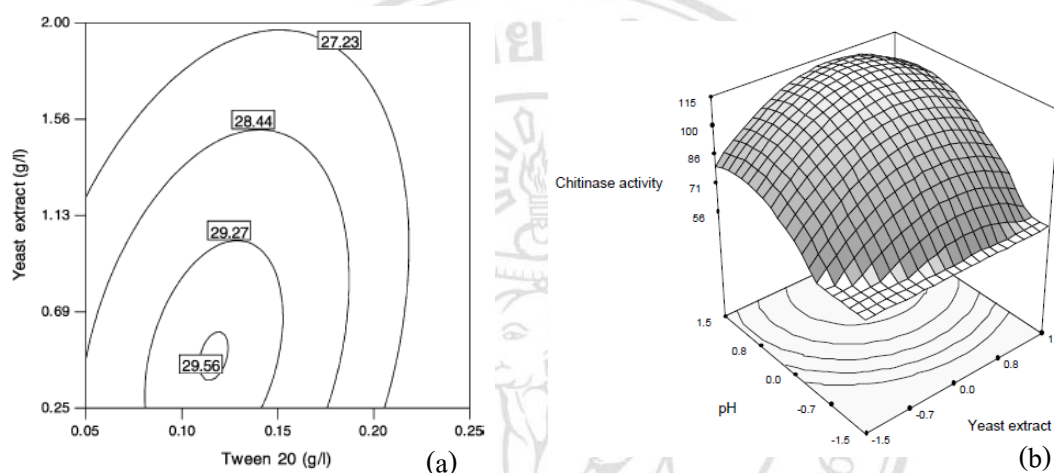
2.7.2 Response Surface Design

การออกแบบพื้นที่การตอบสนองหรือวิธีการพื้นผิวผลตอบ (Response Surface Design (RSM)) คิดค้นโดย Box ในปี ค.ศ. 1948 เป็นวิธีที่จะต้องมีการวางแผน และ ออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะของข้อมูล เนื่องจากวิธีนี้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์หรือตัวแปรกับปัจจัยจากการทดลอง โดยแสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผล เมื่อระดับของปัจจัยเปลี่ยนแปลงไป และสามารถหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมที่ให้ผลที่ดีที่สุด หรือ สามารถเลือกจุดที่เหมาะสมจากผลได้ (Bas and Boyac, 2007) โดยทำการสร้างแบบจำลอง และ การสร้างกราฟแบบสองมิติ และ สามมิติจากข้อมูลที่ได้จากการทดลอง การออกแบบการทดลองแบบ response surface design (RSM) มี หัวข้อย่อย คือ Central Composite Design (CCD), Box-Behnken Design (BBD) และ Miscellaneous โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลออกจากศูนย์กลาง เพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด โดยการทดลองแบบ CCD จะรวมค่าการกระจายในระดับแกน (axial point) และ ค่ามุม (factorial point) ทำให้ค่าคงที่ที่ได้ ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัย วิธีนี้จึงเป็นที่นิยมมากที่สุด

ในการกำหนดค่ารหัส (code value) ของระดับปัจจัย กำหนดให้ 0 แทนค่ากลาง (center point) ซึ่งในการทดลองทั่วไปนิยมทำค่ากลางไว้หลายจุด เพื่อให้ความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองในการประมวลผลทางสถิติมีน้อยที่สุด ตัวอย่างเช่น ทำการทดลองที่ 2 ปัจจัย การทดลอง จะได้ 2^k คือ 4 และค่ามุม (factorial point) จะมีอยู่ 4 จุด ให้ค่าเป็น +1 สำหรับ ค่าสูงสุด และ -1 สำหรับค่าต่ำสุด และค่าแกน (axial point) จะมีอยู่ 4 จุด ให้ค่าเป็น $+\alpha$ สำหรับ ค่าสูงสุด และ $-\alpha$ สำหรับค่าต่ำสุด ดังนั้นการทดลองแบบ CCD จะมี 5 ระดับคือ $-\alpha, -1, 0, 1$ และ $+\alpha$ ตามลำดับจากค่ามากไปน้อย (Montgomery, 2012) การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี response surface design เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่จะศึกษากับค่าตอบสนองที่สนใจ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยใช้

วิธีการวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis ซึ่งหากตัวแปรใดมีผลต่อการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการอันดับสอง (second order model)

เมื่อทำการประมวลผลทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ เพื่อสร้างกราฟโครงร่าง (contour plot) และ กราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) เพื่อช่วยในการประมวลผลระหว่างปัจจัยร่วม กราฟจะมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง



ภาพ 2.2 กราฟโครงร่าง (contour plot) (a) และ กราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) (b)

กราฟตัวอย่าง (a) ในภาพที่ 2.1 ในปี ค.ศ. 2003 Vaidya และ คณะ ทำการทดลองศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส จะพบวงกลมที่ตำแหน่งต่ำกว่ากึ่งกลางของกราฟโครงร่าง ที่เป็นตำแหน่งที่ให้ค่าตอบสนองสูงสุด หรือให้ค่ากิจกรรมไคตินเนสสูงสุด ที่มี 15 g/L chitin เป็นแหล่งคาร์บอน โดยอิงแกนปัจจัย yeast extract และ tween 20 (Vaidya *et al.*, 2003) ส่วนกราฟตัวอย่าง (b) เป็นการศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของ Nawani และ Kapadnis (2005) โดยแสดงเป็นกราฟพื้นผิวตอบสนอง ที่จุดสูงสุดจะเป็นบริเวณที่ให้ผลตอบสนองสูงสุด หรือเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด โดยมีแกนอนด้านล่าง คือ pH และ yeast extract ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (Nawani and Kapadnis, 2005)