# ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาล เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

นางสาวธัญญลักษณ์ ศรีรังสิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# OPTIMIZATION OF BACTERIAL CHITINASE PRODUCTION FOR PRODUCING *N*-ACETYL-D- GLUCOSAMINE AND *N*-ACETYL CHITOOLIGOSACCHARIDE

**Miss Thanyaluk Srirangsit**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**
**for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology**
**Faculty of Science**
**Chulalongkorn University**
**Academic Year 2006**

**Copyright of Chulalongkorn University**

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ |
| โดย | นางสาวธัญญลักษณ์ ศรีรังสิต |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มงคล สุขวัฒนาสินทธิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังใน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธัญญลักษณ์ ศรีรังสิต: ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (OPTIMIZATION OF BACTERIAL CHITINASE PRODUCTION FOR PRODUCING *N*-ACETYL-D- GLUCOSAMINE AND *N*-ACETYL CHITOOLIGOSACCHARIDE) อ.ที่ปรึกษา: อ.ดร.รัฐ พิชญางกูร 81 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงแบบ submerged ของการผลิตไคทิเนส โดยเชื้อโคลน Chi60 และ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับขวดเขย่า (shaking-flask) และระดับถังหมัก (fermenter) การเลี้ยงในขวดเขย่าของเชื้อโคลน Chi60 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp. TU09 สามารถเจริญและผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 40% และความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที และการเลี้ยงในถังหมักไคทิเนส Chi60 มีแอคติวิตีสูงสุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่ DO 2.5 % และเมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนส Chi60 ด้วย HPLC พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ ไดเมอร์ โดยได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยคอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินกุ้ง ไคทินแกนหมึก และเปลือกกุ้ง ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในขวดเขย่าของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินที่จังหวัดนครปฐมสามารถเจริญและผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MM ที่ใช้ไคทินกุ้งและเปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ใช้ 2.0% ไคทินกุ้งปั่นละเอียด และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 50% และใช้ 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียด และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 10% โดยไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุดในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่ 0.25 % yeast extract นอกจากนี้ผลของแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca, Cu มีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนสน้อยมาก ยกเว้น 0.01% Cu ไคทิเนสมีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่ใช้เปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีแอคติวิตีสูงสุดที่ DO 20% ลักษณะสมบัติของไคทิเนสต่างๆ พบว่าไคทิเนสที่ผลิตจาก *A.caviae* D6 ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ pH 5 -10 โดยทำงานได้ดีที่สุดใน Tris-HCl buffer pH 7 อุณหภูมิ 50 °C และสามารถย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ คอลลอยคอลไคทิน และเบทาไคทิน เมื่อแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตี พบว่า ไคทิเนสจาก *A.caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตี 1 แถบ ขนาดประมาณ 60 kDa และพบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยเปลือกกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตีอย่างน้อย 3 แถบ ขนาดประมาณ 60, 70 และ 90 kDa ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก *A.caviae* D6 ด้วย HPLC พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ มอนอเมอร์ และได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยคอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....ธัญญลักษณ์ ศรีรังสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

## 4672279323: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: BACTERIAL CHITINASE /FERMENTER / *N*-ACETYL-D- GLUCOSAMINE / *N*-ACETYL CHITOOLIGOSACCHARIDE

THANYALUK SRIRANGSIT: OPTIMIZATION OF BACTERIAL CHITINASE PRODUCTION FOR PRODUCING *N*-ACETYL-D- GLUCOSAMINE AND *N*-ACETYL CHITOOLIGOSACCHARIDE. THESIS ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph.D., 81 pp.

The effects of submerged cultivation parameters on the production of chitinase Chi60 by *E.coli* and *Aeromonas caviae* D6 in shaking-flask and fermenter level were investigated. Chi60, cloned from *Serratia* sp. TU09, was expressed in *E.coli*. In the shaking-flask level, *E.coli* cells expressing Chi60 can grow and produce the optimal Chi60 activity when they are cultured in LB medium at 40% volume of medium per flask volume ratio, at 250 rpm. A 15 L fermentation level scale-up cultivation of *E.coli* expressing Chi60 was conducted. The highest chitinase activity was obtained when the dissolved oxygen concentration (DO) was set at 2.5%, at 37 ° C, while the pH was not controlled. *N, N'*-diacetyl chitobiose was the major product of Chi60. We discovered that colloidal chitin gave the highest yield followed by shrimp chitin, squid pen chitin and shrimp shell, respectively. *Aeromonas caviae* D6 isolated from soil in Nakhonpathom Province, Thailand, produce the highest chitinolytic activity when it was induced by flake shrimp chitin and flake shrimp shell. In the shaking-flask level, when flake shrimp chitin was used as carbon source the optimum cultivation condition was in minimum medium, MM, ( 0.25 % yeast extract, 0.1 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.03 % $MgSO_4.7H_2O$, 0.6 % $KH_2PO_4$, 1.0 % $K_2HPO_4$ ) containing 2 % flake shrimp chitin, 50 % volume of medium per flask volume ratio. When flake shrimp shell was used as carbon source, optimal activity was obtained when MM contains 1.5 % flake shrimp shell and 10 % volume of medium per flask volume ratio was used. Addition of Fe, Mn, Zn, Ca, or Cu did not have any further addition effect on the production chitinolytic enzymes. Scale-up cultivation with a 5 L fermenter was conducted. Highest chitinase activity was obtained when the DO was set at 20%, 37 °C, while the pH was not controlled. The optimum pH and temperature of the chitinolytic enzymes produced by *A. caviae* D6 was 5 -10 and 50°C, respectively. Substrate specificity of the enzyme was highest on PNAC (partially-*N*-acetylated chitin) followed by colloidal chitin and β-chitin, respectively. SDS-PAGE analysis shows a single chitinolytic activity band when *A. caviae* D6 was induced by flake shrimp chitin. However, at least three chitinolytic activity bands were found when *A. caviae* D6 was induced by flake shrimp shell. *N*-acetyl-D-glucosamine was the major product, identified by HPLC.

Field of Study Biotechnology

Academic Year 2006

Student's Signature....Thanyaluk Srirangsit.....

Advisor's Signature.....

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร อย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และความเข้าใจ ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ อินเจริญศักดิ์ รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อลิสา วังใน ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป อย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาคอยให้คำแนะนำเกี่ยวกับถังหมักในขณะทำวิจัย

ขอบคุณสัญญา กุดั่น (พี่เซลล์) กมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์ (พี่กุ้ง) สันทนา นาคะพงศ์ (พี่บุ๋ม) สุรเกติ์ เนาสราญวงศ์ (พี่เบน) ศรีสุดา ตระกูลน่าเลื่อมใส (พี่เหน่ง) ปณัตดา ยอดแสง (นก) ไพฑูรย์ แสนบัวหลวง (โจ) สุรวุฒิ แสงมณี (น้องปา) ชมดาว สินธุวณิชย์ (น้องเอย) ศรัณย์ธร สุนันท์ชัยการ (น้องรัน) วรดี ลือชาชัยวงศ์ (น้องพีท) และธนากร ธีรภานนท์ (น้องจิน) (สมาชิกห้อง 709) เป็นพิเศษ ที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจขณะทำวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านเอกสารและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาชีวเคมี และหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือ คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจขณะทำวิจัย โดยเฉพาะธเนศ โสภณนิธิประเสริฐ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับถังหมักในขณะทำวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญภาพ..... ฎ
คำย่อ..... ฐ
บทที่
1. บทนำ..... 1
ไคทินและไคโทซาน..... 1
ประโยชน์ของไคทินและไคโทซาน..... 3
กระบวนการย่อยไคทิน..... 8
ไคทิเนส..... 8
ประโยชน์ของไคทิเนส..... 9
การผลิตไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์..... 10
เทคโนโลยีการหมัก..... 11
ถังหมัก..... 12
เชื้อ *Aeromonas*..... 23
เชื้อโคลน Chi60..... 23
2. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง..... 25
เครื่องมือและอุปกรณ์..... 25
สารเคมี..... 25
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 27
อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 27
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส..... 28
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60..... 28
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่า..... 28
การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 28
การศึกษาความเร็วในการเขย่าต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 28

หน้า

การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมัก..... 29
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6..... 29
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่า..... 29
การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส..... 29
การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 29
การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส.. 30
การศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส.. 30
การศึกษาปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส..... 30
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมัก..... 30
การวิเคราะห์กระบวนการผลิต..... 31
การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์..... 31
การวัดแอคติวิตี..... 31
การศึกษาคุณสมบัติและลักษณะบางประการของไคทิเนส..... 32
การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส..... 32
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส..... 32
การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรทของไคทิเนส..... 32
การหาขนาดโมเลกุล..... 32
การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(HPLC)..... 33
3. ผลการทดลอง..... 34
ผลการทดลองเชื้อโคลน Chi60..... 34
ลักษณะของเชื้อโคลน Chi60..... 34
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่า..... 35
การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 35
การศึกษาความเร็วในการเขย่าต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 37
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมัก..... 37
การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(HPLC)..... 41

หน้า

ผลการทดลอง *Aeromonas caviae* D6..... 45
ลักษณะของ *Aeromonas caviae* D6..... 45
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่า..... 45
การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส..... 45
การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออัตราการผลิตไคทิเนส..... 48
การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส.. 48
การศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส.. 51
การศึกษาปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส..... 51
การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมัก..... 51
การศึกษาคุณสมบัติและลักษณะบางประการของไคทิเนส..... 55
การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส..... 55
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส..... 55
การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรทของไคทิเนส..... 55
การหาขนาดโมเลกุล..... 60
การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)..... 60
4. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 64
5. สรุปผลการทดลอง..... 71
รายการอ้างอิง..... 73
ภาคผนวก..... 78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**สารบัญตาราง**


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | คุณสมบัติและหน้าที่ของไคทินและไคโทซาน และการประยุกต์ใช้..... | 6 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญภาพ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1.1 | โครงสร้างเซลลูโลส ไคทิน และไคโทซาน..... | 2 |
| 1.2 | แบบจำลองการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคทินรูปแบบอัลฟา เบทา และแกมมา โดยที่ปลายลูกศรคือ ปลายรีดิวซ์ของสายไคทิน..... | 4 |
| 1.3 | ถังหมักแบบบับเบิล..... | 13 |
| 1.4 | ถังหมักแบบยกตัวของอากาศ..... | 15 |
| 1.5 | ถังหมักแบบแบบ Packed bed..... | 16 |
| 1.6 | ถังหมักแบบฟลูอิไดซ์..... | 18 |
| 1.7 | ถังหมักแบบถังกวน..... | 20 |
| 1.8 | รูปแบบของใบพัด..... | 21 |
| 3.1 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่างๆ..... | 36 |
| 3.2 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ความเร็วในการเขย่าต่างๆ..... | 38 |
| 3.3 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลินแบบแลปเกรดกับแอมพิซิลินที่เป็นยาเม็ด..... | 39 |
| 3.4 | ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตไคทิเนสของ Chi60 ในถังหมัก..... | 40 |
| 3.5 | ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก Chi 60 ที่ผลิตได้และวิเคราะห์ด้วย HPLC ..... | 42 |
| 3.6 | โคโลนีของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ที่มีวงใสรอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM..... | 46 |
| 3.7 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ..... | 47 |
| 3.8 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ในอาหารที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่างๆ..... | 49 |
| 3.9 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ..... | 50 |
| 3.10 | ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีปริมาณของ yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ..... | 52 |

รูปที่ หน้า

3.11 ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีแร่ธาตุต่างๆ..... 53

3.12 ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6 ในถังหมัก..... 54

3.13 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6..... 56

3.14 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6..... 57

3.15 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6..... 58

3.16 SDS-PAGE แสดงไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6..... 59

3.17 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6 ที่ผลิตได้ และวิเคราะห์ด้วย HPLC……. 61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# คำย่อ

| | |
|---|---|
| A | Absorbance |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CCMM | Colloidal chitin minimum medium |
| °C | Degree celcius |
| g | Gram |
| GlcNAc | *N*-acetyl-D-glucosamine |
| Hr | Hour |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litre |
| LB | Luria Bertani medium |
| M | Molar |
| mM | Millimolar |
| mg | Milligram |
| ml | Millilitre |
| mU | Milliunit |
| min | Minute |
| rpm | Revolution per minute |
| µg | Microgram |
| vvm | Air volume per medium volume per minute |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

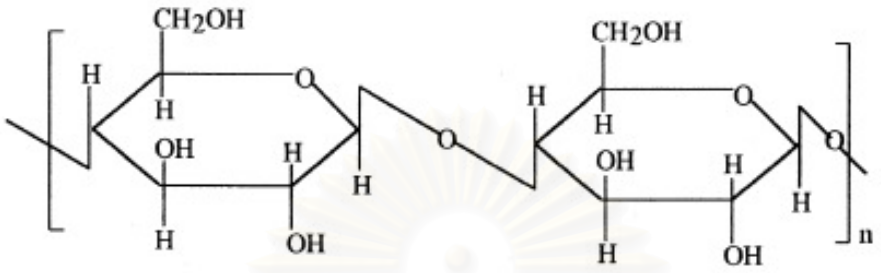
# บทนำ

## ไคทินและไคโทซาน

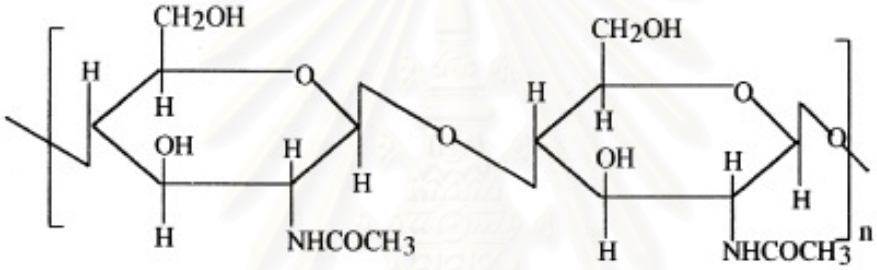
ไคทินเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot และในปี 1823 Odier เป็นผู้เรียกพอลิเมอร์นี้ว่า ไคทิน ซึ่งมาจากคำว่า chiton ในภาษากรีก มีความหมายว่า เกราะหุ้ม (1) ไคทินเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นพอลิเมอร์สายยาวและไม่มีกิ่งของเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-D-glucosamine หรือ 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose, GlcNAc) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบทา-1,4-ไกลโคซิดิก มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลสโดยไคทินจะแตกต่างจากเซลลูโลสตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 มีหมู่แอซีทาไมด์ (acetaminde group, NH-CO-$CH_3$) แทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group, -OH) ของเซลลูโลส ส่วนไคโทซานเป็นอนุพันธุ์ของไคทินที่ได้จากการนำหมู่แอซีทิล ($CO-CH_3$) ออกจากไคทิน ( รูปที่ 1.1) (2)

ในธรรมชาติไคทินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับ 2 รองจากเซลลูโลส โดยสามารถพบได้ในส่วนประกอบหลักของโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต เช่น ผนังเซลล์รา ยีสต์ แบคทีเรีย และสัตว์ที่มีเปลือกและกระดอง เช่น แมลง กุ้ง ปู หมึก หอย ไคทินเป็นสารโมเลกุลยาวที่ไร้ประจุ (Non-electrolytic polymer) ซึ่งทำให้ไม่สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายทั่วๆ ไป เช่น สารละลายอินทรีย์ แต่สามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟิวริก และกรดฟอสฟอริก ส่วนไคโทซานซึ่งแยกเอาหมู่แอซีทิลออก จะสามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายหลายชนิดได้ดี เช่น กรดแอซีติก กรดแลคติก เพราะมีประจุบวกบนหมู่อะมิโน

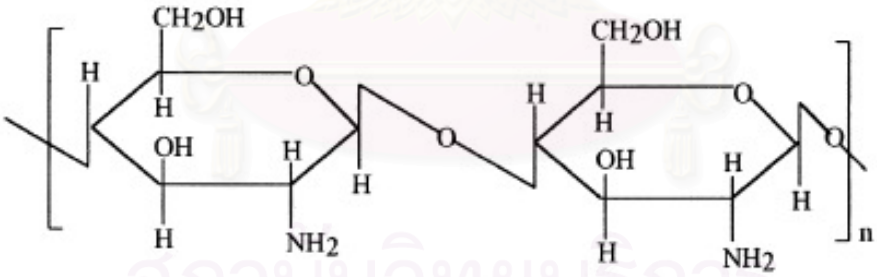
เมื่อนำผลึกไคทินมาศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคการหักเหแสงของรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction) (3) พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีขนาดเล็กมาก ผลึกมีการจัดเรียงตัวอย่างมีระเบียบมาก (4) แต่ละเส้นใยจะมีปฏิสัมพันธ์กันด้วยพันธะไฮโดรเจน ผลึกของไคทินจากแหล่งที่มาต่างกันก็จะมีการจัดเรียงตัวของเส้นใยต่างกัน ทำให้แบ่งไคทินตามรูปแบบการจัดเรียงตัวของเส้นใยได้ 3 ประเภท คือ อัลฟาไคทิน ($\alpha$-chitin) เบทาไคทิน ( $\beta$-chitin) และแกมมาไคทิน ( $\gamma$-chitin) โดยอัลฟาไคทิน ($\alpha$-chitin) มีการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคทินในทิศทางตรงข้ามกัน (anti-parallel chain alignments) คือมีการจัดเรียงตัวของปลายรีดิวซ์ และปลายนอน-รีดิวซ์สลับกัน การเรียงตัวของเส้นใยแบบนี้จะค่อนข้างชิดกันมาก ทำให้มีความแข็งแรงมากกว่าแบบอื่น (5) เพราะมีพันธะไฮโดรเจนเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างสายไคทิน จึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมีมากกว่าแบบอื่นๆ และไคทินประเภทนี้พบมากที่สุด โดยพบได้ในพวกครัสเตเซียน เช่น กุ้ง ปู เบทาไคทิน ( $\beta$-chitin) เป็นไคทินที่มีการจัดเรียงตัวของสายไคทินในทิศทางเดียวกัน (parallel chain alignments) คือ มีการ




Cellulose




Chitin




Chitosan

**รูปที่ 1.1** โครงสร้างเซลลูโลส ไคทิน และไคโทซาน (2)

จัดเรียงตัวของปลายรีดิวซ์ และปลายนอน-รีดิวซ์ ในทิศทางเดียวกัน (6) จึงทำให้เส้นใยอยู่ชิดกันน้อยกว่าแบบอัลฟา และมีความแข็งแรงน้อยกว่าด้วย ไคทินประเภทนี้พบได้ในแกนหมึกและไดอะตอม (diatom) ส่วนแกมมาไคทินมีลักษณะการจัดเรียงตัวเป็นแบบผสมระหว่างแบบอัลฟาไคทินและเบทาไคทิน คือ มีการเรียงตัวของปลายรีดิวซ์ และปลายนอน-รีดิวซ์ ทั้งในทิศทางเดียวกันและทิศทางตรงข้ามกัน ทำให้เส้นใยไคทินประเภทนี้มีการจัดเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ (5, 6) โดยพบได้ใน stomach lining ของ *Loligo* และในพวก Coerenterata (รูปที่ 1.2) (3)

**ประโยชน์ของไคทินและไคโทซาน**

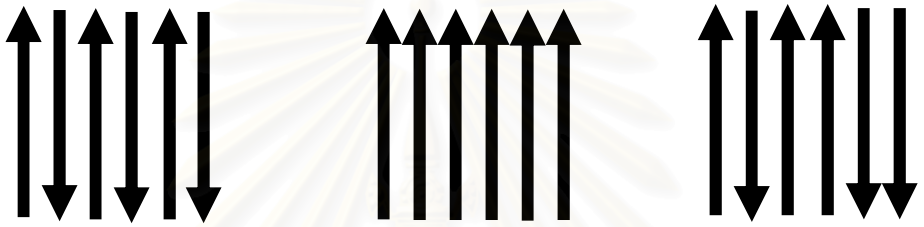
เนื่องจากแต่ละปีจะมีไคทินและไคโทซานที่เกิดจากธรรมชาติเป็นจำนวนมากถึง $10^{10}$-$10^{11}$ ตัน และในจำนวนนี้ก็เป็นของเสียมากกว่า 80,000 ตัน ที่เกิดจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล เช่น เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก (7) เป็นที่ทราบกันดีว่าของเสียเหล่านี้มีไคทินเป็นองค์ประกอบอยู่เยอะทำให้มีผู้สนใจนำของเสียเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ โดยได้มีการผลิตไคทินและไคโทซานจากแหล่งของเสียธรรมชาตินี้ และนำมาไคทินและไคโทซานที่ผลิตได้มาประยุกต์ในด้านต่างๆ (8)

**ด้านการเกษตร**

ไคทินและไคโทซานได้ถูกนำมาใช้ในทางการเกษตรหลายอย่าง ตั้งแต่การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช เพื่อป้องกันเมล็ดพันธุ์จากโรคและแมลงศัตรูพืช ป้องกันการขูดขีด การหลุดร่อนของเมล็ดพันธุ์ (9) และยืดอายุการเก็บรักษา (10, 11) และถูกนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ป้องกันการผุกร่อนของผิวส่วนที่เสียหายจากเชื้อราหรือการกัดเซาะของน้ำฝน กระตุ้นการงอกรากและสร้างความต้านทานต่อโรคให้กับพืช และยังนำมาผสมกับปุ๋ยน้ำเพื่อช่วยให้ยึดติดกับผิวพืชและทนต่อการชะล้าง ลดการระเหยของน้ำ สามารถเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารและยาให้กับพืช (9) และจากการที่ไคทิน และไคโทซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบทำให้สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้ (12) ในด้านผลผลิตทางการเกษตรได้นำไคทินและไคโทซานมาใช้ในการเคลือบผลผลิตทางการเกษตร เพื่อยืดอายุและคงความสดของผลผลิตทางการเกษตร เพราะไคทินและไคโทซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย รวมทั้งลดอัตราการคายน้ำและการหายใจได้

**ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม**

ไคทินและไคโทซานถูกนำมาใช้ทำวัสดุทางการแพทย์ เช่น ผ้าพันแผล พลาสเตอร์ปิดแผล เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งกระบวนการรักษาแผล ลดการเกิดรอยแผล ป้องกันแผลไม่ให้ติดเชื้อ (13) นำมาทำไหมละลาย และผิวหนังเทียม โดยทำจาก chitosan-collagen ทั้งนี้ยังมีคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการฟอกเลือด (14) และจากการที่ไคโทซานมีประจุบวกที่สามารถยึดติดกับพื้นผิวต่างๆ ซึ่งมักมีประจุลบได้ดีแล้วยังประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา



**อัลฟาไคทิน** **เบทาไคทิน** **แกมมาไคทิน**

**รูปที่ 1.2** แบบจำลองการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคทินรูปแบบอัลฟาไคทิน เบทาไคทิน และแกมมาไคทิน โดยที่ปลายลูกศรคือ ปลายรีดิวซ์ของสายไคทิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพจึงนำมาใช้ในระบบควบคุมการปล่อยยา นอกจากนี้มีงานวิจัยในประเทศญี่ปุ่นพบว่าไคโทซานสามารถใช้ในการรักษาเหงือกและฟัน ป้องกันฟันผุได้ เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในช่องปาก

**ด้านอาหาร**

ไคโทซานนำมาใช้เป็นอาหารเสริม เพื่อดูดซับไขมันและมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย และจากคุณสมบัติที่ไคโทซานเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวก ทำให้เกิด interaction กับเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารอื่นของเซลล์จุลินทรีย์ จึงนำมาใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ทั้งนี้ยังมีการทำแผ่นฟิลม์ห่อหุ้มอาหารเพื่อยืดอายุของอาหาร ลดการเน่าเสียและคงความสด เพราะแผ่นฟิลม์ไคโทซานนี้สามารถถ่ายเทความชื้นระหว่างอาหารและสภาวะแวดล้อมภายนอกได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในการผลิตน้ำผลไม้เพื่อช่วยให้น้ำผลไม้ใส (15)

**ด้านเครื่องสำอาง**

ไคทิน ไคโทซาน มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำและต่อต้านจุลินทรีย์ จึงได้ใช้เป็นตัวเติมแต่งและสารพื้นฐานของเครื่องสำอาง เช่น แป้งทาหน้า แป้งฝุ่น เป็นส่วนประกอบของแชมพู สบู่ ครีมหรือโลชั่นบำรุงผิว เพื่อให้ความชุ่มชื้น ลดการระเหยของน้ำบนผิวหนัง และสามารถติดผิวได้ดี

**ด้านอุตสาหกรรม**

ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้ผสมในเส้นใย เพื่อพัฒนาเสื้อผ้าและสิ่งทอ ให้สามารถป้องกันและต้านทานเชื้อโรคได้ (16) ในอุตสาหกรรมกระดาษใช้เสริมสร้างความแข็งแรงให้แก่เส้นใยและเยื่อกระดาษ นอกจากนี้ยังใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้สกัดไอออนโลหะออกและตกตะกอนสารประเภทโปรตีน สีย้อมผ้าและกรดอะมิโน (17) เพราะไคโตซานมีประจุบวกสามารถทำหน้าที่เป็น polycationic coagulant ในระบบบำบัดน้ำเสีย

**ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ**

ใช้เป็นสารห่อหุ้มในการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ เพราะไคโทซานมีความสามารถในการเพิ่มความคงตัวให้กับวัสดุตัวกลางตรึง ใช้ในการแยกสารโดยใช้วิธีโครมาโตรกราฟี และไคทินยังนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากจุลินทรีย์ (7, 15, 18)

**ตารางที่ 1 คุณสมบัติและหน้าที่ของไคทินและไคโทซาน และการประยุกต์ใช้** (8)

| คุณสมบัติและหน้าที่ | การประยุกต์ใช้ |
|---|---|
| 1. โพลีอิเลกโตรไลท์และคีเลต (B) | ตัวรวมตะกอนและตัวตกตะกอน และการทำหน้าที่แคทอิออนิกสำหรับบำบัดน้ำเสีย ตัวตกตะกอนโปรตีนที่เป็นกรด และตัวตกตะกอนเพื่อแร่ยูเรเนียม และโลหะจำเพาะบางชนิด ตลอดจนโลหะกัมมันตภาพรังสี |
| 2. การขึ้นรูปเป็นลักษณะต่างๆ (A, B) | ขึ้นรูปเป็นเส้นใย สิ่งทอ ขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อบาง เพื่อใช้ในการกรองแยก เช่น แยกน้ำออกจากแอลกอฮอล์ ขึ้นรูปเป็นเม็ด เป็นแคปซูลเพื่อการเพาะเซลล์ |
| 3. การเป็นเจลที่อุ้มน้ำ (B) | การใช้หุ้มเซลล์ และหุ้มเอนไซม์ เป็นตัวกลางสำหรับการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบเจล และการขึ้นรูปเป็นรูพรุนแบบฟองน้ำ |
| 4. การตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (A, B) | ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ และการทำวัสดุผสมกับคาร์บอนไดออกไซด์ |
| 5. การย่อยสลายด้วยน้ำ (A, B) | ผลิตสารกลูโคซามีน และโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลต่างๆ (โดยทางเคมีและเอนไซม์) |
| 6. สารเหนียวและอุ้มน้ำ (B) | เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง สำหรับบำรุงรักษาผิวและผม |
| 7. การดูดซับโมเลกุลต่างๆ (A, B, C) | ใช้เป็นตัวกลางเพื่อทำโครมาโตกราฟฟีแบบต่างๆ เช่น แบบดูดซับและแบบแลกเปลี่ยน เพื่อแยกเลกทิน, ไคทิเนส และไลโซไซม์ |
| 8. ปฏิกิริยาเคมี (A, B) | การสร้างกลิ่น รส การขจัดกลิ่นของฟอร์มาลดีไฮด์ และการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ต่างๆ เป็นสารต่อเนื่อง |
| 9. การนำไฟฟ้า (B) | การนำแผ่นเยื่อบางไคโตซานผสมลิเธียม ไตรเฟลท ที่ใช้เป็นอิเลกโตรไลท์ในแบตเตอรี่ ที่ปราศจากมลพิษ |
| 10. การเคลือบ (B) | การทำสีในการพิมพ์ การย้อมและสารเติมแต่งต่างๆ การทำสีทา เป็นสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมกระดาษ เคลือบผิวผลไม้ ผัก เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และเคลือบรักษาเมล็ดพันธุ์พืช |
| 11. ตัวดึงออกมา (A, B, C) | เป็นตัวเหนี่ยวนำของโปรตีนที่ก่อให้เกิดโรคได้ และสารที่ใช้ในการเกษตร เช่น การเคลือบเมล็ด การพ่นเคลือบใบ |
| 12. ตัวต้านจุลินทรีย์ (B) | ใช้ในการเก็บรักษาอาหารและผลไม้ |
| 13.ห้ามเลือดต่อต้านการเกิดลิ่มเลือด (C) | ทำยาห้ามเลือด ใช้ทำเส้นเลือด ใช้ทำคอนแทคเลนซ์ตา |

**ตารางที่ 1 คุณสมบัติและหน้าที่ของไคทินและไคโทซาน และการประยุกต์ใช้ (ต่อ)**

| | |
|---|---|
| 14. สารที่ปราศจากพิษ | เป็นมิตรต่อสิ่งมีชีวิต จึงใช้ได้ทั่วไป |
| 15. สร้างภูมิต้านทานได้ (A, B, C) | เป็นตัวเหนี่ยวนำไลโซไซม์ และ LPL activities ในเนื้อเยื่อและในเลือด และต่อต้านสารก่อมะเร็ง |
| 16. สมานแผล (A, B, C) | ใช้เป็นตัวรักษาแผล โดยเฉพาะไฟไหม้ และแผลที่ผิวหนังสำหรับคน สัตว์ และต้นไม้ (ทำผิวหนังเทียม) รักษากระดูก เอ็น และซ่อมแซมพวกเอ็นยึดอวัยวะต่างๆ |
| 17. ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ (A, B, C) | ทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้ สารปลดปล่อยยาอย่างช้าๆ และควบคุมการย่อยสลายของเอนไซม์ |
| 18. ลดโคเลสเตอรอล (B) | ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ และใช้เติมแต่งในอาหารสัตว์ ลดความดันเลือด |
| 19. ส่งเสริมพวกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (A, B) | ช่วยในการปรับปรุงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น ในดินและในน้ำ ในสัตว์และในลำไส้คน |
| 20. ใช้เป็นฟิล์มเคลือบผลไม้ (B) | ช่วยให้ผลไม้ และผักสดอยู่นาน |
| 21. เข้ากันได้กับอวัยวะร่างกาย (A, B, C) | รักษาแผล ไหมเย็บแผล |

**หมายเหตุ A คือ สารไคทิน**

**B คือ สารไคโทซาน**

**C คือ อนุพันธ์ของสารไคทินและสารไคโทซาน**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**กระบวนการย่อยไคทิน**

การนำไคทินและไคโทซานมาประยุกต์ใช้จำเป็นต้องผ่านการแปรรูปหรือผ่านการย่อยก่อน เพื่อให้มีขนาดที่เหมาะสม เพราะคุณสมบัติทางชีวภาพและทางกายภาพของไคทินและไคโทซานขึ้นอยู่กับขนาด ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายด้าน ในอุตสาหกรรมได้ใช้กระบวนการทางเคมี (กรดและด่าง) คือจะใช้กรดเข้มข้นและอุณหภูมิค่อนข้างสูง ซึ่งการแปรรูปด้วยกระบวนการทางเคมีนี้มีความจำเพาะต่ำ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดปะปนกัน และได้ปริมาณการผลิตพอลิเมอร์ของไคทินต่ำ นอกจากนี้ยังเกิดของเสียที่เป็นกรดในปริมาณสูงด้วย (2) ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์มาใช้แทน ซึ่งเอนไซม์นี้คือไคทิเนส (chitinases) เป็นเอนไซม์ glycoside hydrolase ที่ย่อยพันธะ $\beta$-1,4-glycosidic ระหว่างเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนของไคทิน ทำให้ไคทินมีขนาดเล็กลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีขนาดที่จำเพาะมากขึ้นและได้ปริมาณการผลิตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังไม่มีของเสียที่เป็นอันตรายอีกด้วย

**ไคทิเนส**

ไคทิเนสเป็นเอนไซม์ glycoside hydrolase ที่ย่อยพันธะβ-1,4-glycosidic ระหว่าง *N*-acetyl glucosamine ของไคทิน (18) ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย, รา, ยีสต์ ,พืช และสัตว์ (19) ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดไคทิเนสจะมีบทบาทและหน้าที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในสัตว์พวกมีกระดูกสันหลังไคทิเนสมีบทบาทเกี่ยวกับกระบวนการย่อยอาหาร พวกแมลงและครัสเตเซียนไคทิเนสมีบทบาทในส่วนเกี่ยวกับการลอกคราบ ในพืชไคทิเนสมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานต่อพวกราที่ก่อโรคพืช (20) ในราไคทิเนสมีหน้าที่ในกระบวนการ autolytic nutritional และ morphogenetic และในแบคทีเรียมีหน้าที่ในกระบวนการ nutrition และ parasitism (21) ไคทิเนส สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามตำแหน่งการย่อยสายไคทิน คือ endo-chitinase เป็นไคทิเนสที่ย่อยภายในสายพอลิเมอร์ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) อย่างสุ่ม จะได้ diacetylchitobiose $(GlcNAc)_2$ เป็นผลิตภัณฑ์หลัก รวมทั้ง triacetylchitobiose $(GlcNAc)_3$ และ exo-chitinase เป็นไคทิเนสที่ย่อยสายพอลิเมอร์ GlcNAc จากปลายนอนรีดิวซ์ ทำให้ได้ acetylchitobiose (GlcNAc) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก

**ประโยชน์ของไคทิเนส**

จากคุณสมบัติและบทบาทหน้าที่ไคทิเนสในธรรมชาติ ทำให้สามารถนำไคทิเนสมาประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน

**เป็น biocontrol ของพืช**

ใช้เป็น biocontrol ของพืช เพื่อป้องกันเชื้อราที่ก่อโรคและแมลงที่เป็นศัตรูพืช แทนการใช้สารเคมี โดยไคทิเนสจะไปย่อยผนังเซลล์ของราและเปลือกหุ้มตัวของแมลง ซึ่งส่วนใหญ่ผนังเซลล์ของราและเปลือกหุ้มตัวของแมลงประกอบด้วยไคทิน จึงทำให้ราและแมลงตาย เช่น ไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* นำมาใช้ควบคุมโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum* ในต้นฝ้าย และไคทิเนสจาก *Alcaligenes xylosoxydans* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Fusarium udam* และ *Rhizoctonia bataticola*

**เตรียมโปรโตพลาสจากรา**

โปรโตพลาสจากเชื้อรา ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยมากมาย เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การสังเคราะห์และการหลั่งเอนไซม์ การปรับปรุงสายพันธุ์ และเป็นที่ทราบกันดีว่าผนังเซลล์ของรามีไคทินเป็นองค์ประกอบ ไคทิเนสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสจากรา เนื่องจากไคทิเนสมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้หลายชนิด (22, 23) เช่น ไคทิเนสจาก *Streptomyoes* นำมาใช้เตรียมโปรโตพลาสของ *Aspergillus oryzea* และ *Fusarium solani* (24) ไคทิเนสจาก *Enterobacter* sp. NRG4 ใช้เตรียมโปรโตพลาสของ *Trichoderma reesei, Pleurotus florida* และ *Aspergillus niger*

**Cytochemical localization ของไคทินและไคโทซาน โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อน chitinase –chitisanase-gold**

การศึกษา cytochemical localization ใช้ในการแสดงหน้าที่ที่จำเพาะของพอลิเมอร์ได้เช่น ติดตามไคโทซาเนสของข้าวบาเลย์ด้วยสารประกอบเชิงซ้อน colloidal gold สำหรับหาไคโทซานในสปอร์ ไฮฟลา และผนังเซลล์ของรา *Ophiostoma ulmi* และ *Aspergillus niger* และใช้ Chitinase-colloidal gold-labelled complexes สำหรับ immuno cytochemical ใช้เป็น probe ในการตรวจวัด GlcNAc ในผนังเซลล์ของพืชเพื่อตรวจหาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค

**เป็น bioconversion**

ใช้เป็น bioconversion ของของเสียที่เป็นไคทิน เช่น เปลือกกุ้ง เปลือกปู จากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง โดยใช้เอนไซม์ย่อยของเสียเหล่านี้เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต single cell protein ซึ่ง single cell protein ใช้เป็นอาหารให้กับสัตว์บกและสัตว์น้ำ มีการผลิต single cell protein จากไคทินจากกุ้งและ *Pichia kudriarezerii* ด้วยไคทิเนสของ *Serratia marcescens* นอกจากนี้ยังนำมาใช้ผลิตปุ๋ยด้วย

**ใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์**

ใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีประโยชน์ในทางการแพทย์ เช่น ไคโทเฮกซาเมอร์มีประโยชน์ในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก จึงทำให้น้ำตาลเหล่านี้มีราคาค่อนข้างแพง

**การผลิตไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์**

การประยุกต์ใช้ไคทิเนสมีความสำคัญมากขึ้น ทำให้มีการศึกษาการผลิตไคทิเนสมากมาย โดยเฉพาะไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้มีความหลากหลาย มีประสิทธิภาพสูง และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ เพราะเชื้อจุลินทรีย์เลี้ยงง่ายและโตเร็ว จึงมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไคทิเนส เช่น ส่วนประกอบของอาหาร ภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เรามีความรู้ ความเข้าใจทางด้านพันธุกรรมในการแสดงออกของไคทิเนส และเทคนิคการตัดต่อไคทิเนส ช่วยให้มีการผลิตไคทิเนสเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำกระบวนการหมักเข้ามาเพื่อปรับปรุงการผลิตไคทิเนสด้วย

**การผลิตไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิม**

ได้มีรายงานวิจัยมากมายที่ศึกษาการผลิตไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิม มีทั้งผลิตจากราและแบคทีเรียหลายชนิด เช่น การผลิตไคทิเนสของ *Myrothecium verucaria* ซึ่งไคทิเนสนี้สามารถใช้ย่อยไมซีเลีย (mycelia) ของราและมีแอคติวิตีมากกว่าเอนไซม์ไลติกในทางการค้าถึง 5 เท่า (21) *Talaromyces emersonii* CBS 81470 มีภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส คือ ใช้ 1-2 % ไคทิน (w/v) pH 5 และ 45 ˚C นอกจากนี้ยังมีการใช้ statistical experimental designs ในการหาภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบอาหารและปัจจัยสิ่งแวดล้อมในการผลิตไคทิเนส การผลิตไคทิเนสของ *Trichoderma harzianum* มีการผลิตลดลง เมื่อเพิ่มกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และคาร์บอกซีเมทิลไคทิน ในขณะที่การเติมแพคทิน ลามานาริน (lamanarin) แป้ง และเบทากลูแคน ช่วยเพิ่มการผลิตไคทิเนส นอกจากนี้มีการใช้ผนังเซลล์ของราเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไคทิเนส โดยไคทิเนสที่ผลิตได้มีภาวะที่เหมาะสมใน pH และอุณหภูมิช่วงกว้าง

**การผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน**

การผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน เช่น การโคลนไคทิเนสจาก *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ TP-1 เข้าไปใน *E.coli* สายพันธุ์ DH5• (28) , โคลนไคทิเนสจาก *Aeromonas* sp.no.10S-24 เข้าไปใน *E.coli* สายพันธุ์ JM 105 (29)

**การผลิตไคทิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ในระดับขยายส่วน**

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณการผลิตไคทิเนสในระดับขยายส่วนมีน้อยมาก เช่น Khoury และคณะได้ทำการเพาะเลี้ยง *Serratia marcescens* 990E ในถังหมักแบบปั่นกวนขนาด 6 ลิตร เพื่อศึกษาหาภาวะและปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส (30)

**เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation Technology)**

ปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักได้เข้ามามีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด ในระดับอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์ วิตามิน ไวน์ เบียร์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ และวัคซีน ซึ่งเทคโนโลยีการหมักเป็นกระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมีเพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้จุลินทรีย์ เป็นการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม โดยอาศัยการจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์เจริญเติบโต และเอื้อให้จุลินทรีย์สร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ทั้งนี้สิ่งที่ต้องการจากกระบวนการ อาจเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์เอง (เช่น โปรตีนเซลล์เดียวที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน) หรือเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (เช่น เอนไซม์ที่ใช้ผสมกับผงซักฟอกเพื่อกำจัดคราบไขมัน คราบโปรตีน) หรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นในสภาพแวดล้อมนั้นๆ (เช่น กรดซิตริก หรือกรดมะนาว) ในระดับอุตสาหกรรมกระบวนการหมักประกอบด้วยหลายขั้นตอน ขั้นตอนแรกเกี่ยวข้องกับการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ให้บริสุทธิ์ การทดสอบคุณสมบัติและความสามารถด้านต่างๆ ของจุลินทรีย์ รวมถึงการดัดแปลงพันธุกรรมจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยวิธีการที่เหมาะสมและจำเพาะแตกต่างกันไปตามชนิดของวัตถุดิบ จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ขั้นตอนที่สองเป็นการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculum) ซึ่งคือการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ให้แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก และการเตรียมวัตถุดิบ (Raw Material หรือ Substrate) สำหรับนำมาถ่ายลงในถังหมักเพื่อให้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของจุลินทรีย์ สำหรับภาชนะสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการหมัก เรียกว่าถังหมัก (Fermenter) หรือ ถังปฏิกรณ์ทางชีวภาพ (Bioreactor) สิ่งสำคัญในขั้นตอนนี้ คือ การปรับสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูงในห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) โดยทั่วไปนิยมใช้ถังหมักขนาดเล็ก หรือในบางกรณีอาจใช้ขวดเขย่า (Flask) หากขั้นตอนนี้ประสบความสำเร็จได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปริมาณสูง (Quality & Quantity of end product) ก็ดำเนินการในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนที่สาม เป็นการขยายถังหมัก และปรับปรุงกระบวนการผลิตในขนาดที่ใหญ่ขึ้นในระดับต้นแบบ (Pilot scale) และขยายไปสู่กระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Large scale หรือ Industrial scale) ซึ่งถังหมักที่ใช้มีขนาด

รูปร่าง วัสดุที่ใช้แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการใช้งาน และผลิตภัณฑ์ที่ได้ ปฏิกิริยาระหว่างกระบวนการหมักค่อนข้างซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ และภาวะในการหมัก (Parameter) เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การให้อากาศ อัตราการไหลของสารเข้าสู่ถังหมัก เป็นต้น ขั้นตอนที่สี่ เป็นขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีการยุ่งยากซับซ้อนเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นยารักษาโรคต้องอาศัยวิธีการทำให้บริสุทธิ์มากกว่าผลิตภัณฑ์อื่น

**ถังหมัก (Fermenter) หรือ ถังปฏิกรณ์ (Bioreactor)** (31)

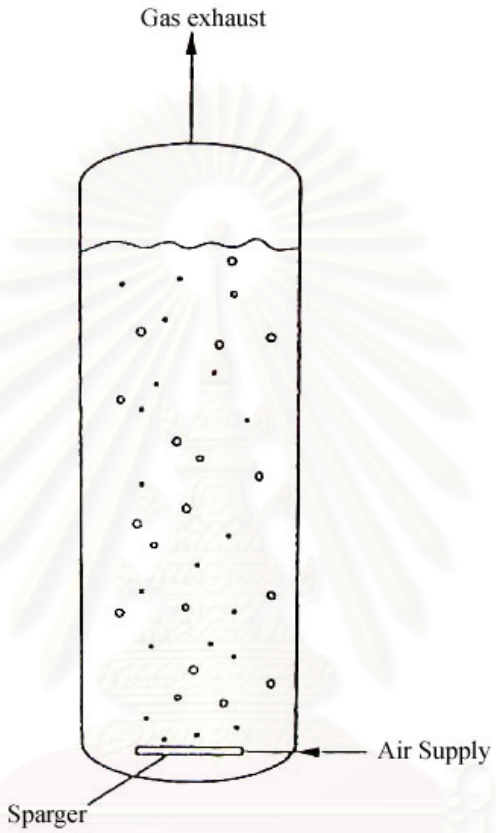
เป็นอุปกรณ์หลักที่สำคัญในเทคโนโลยีการหมัก เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ หน้าที่สำคัญของถังหมัก คือ การทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการ การออกแบบถังหมักเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไปบ้าง แต่โดยทั่วไปจะต้องมีสมบัติพื้นฐานดังนี้ คือ มีความแข็งแรง ทนความร้อนและความดันได้สูง มีระบบการให้อากาศและระบบการกวนผสมที่ดี มีระบบควบคุมอุณหภูมิ มีระดับควบคุม pH มีระบบควบคุมฟองที่เกิดขึ้น ด้านในของถังหมักควรมีผิวเรียบ ทนต่อการกัดกร่อน และไม่เป็นพิษ อยู่ในสภาพปลอดเชื้อในขณะใช้งานได้เป็นเวลานาน มีที่เก็บตัวอย่างจากถังหมักได้สะดวก โดยไม่เกิดการปนเปื้อน มีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยจากถังหมักได้น้อย มีรูปแบบการควบคุมการทำงาน การเก็บเกี่ยวผลผลิต การทำความสะอาด และการบำรุงรักษาง่าย ใช้แรงงานน้อย ควรใช้กับกระบวนการหมักได้หลายชนิด ทำจากวัสดุราคาถูกที่สุด แต่มีคุณภาพตามต้องการ

**ชนิดของถังหมัก**

เนื่องจากถังหมักได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับกระบวนการหมักที่จำเพาะ สำหรับการใช้งานปัจจุบันถังหมักจึงมีมากมายหลายชนิด เช่น ถังหมักแบบบับเบิล ( Bubble fermenter) ถังหมักแบบยกตัวของอากาศ (Air-lift fermenter) ถังหมักแบบPacked bed (Packed bed fermenter) ถังหมักแบบ Rotating disc ( Rotating disc fermenter) ถังหมักแบบ Deep-jet ( Deep-jet fermenter) ถังหมักแบบฟลูอิไดซ์ (Fluidized fermenter) และถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) เป็นต้น โดยที่จะใช้ถังหมักแบบใด ขึ้นอยู่กับประเภทการใช้งาน

**ถังหมักแบบบับเบิล ( Bubble fermenter) หรือ Tower fermenter**

เป็นถังหมักทรงสูงซึ่งไม่มีเครื่องกวน มีอัตราส่วนของความสูงทั้งหมดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมัก ไม่น้อยกว่า 6 : 1 และมีการให้อากาศไหลผ่านได้ทิศทางเดียว (ทางด้านฐาน)




**รูปที่ 1.3** ถังหมักแบบบับเบิล ( Bubble fermenter) หรือ Tower fermenter (31)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

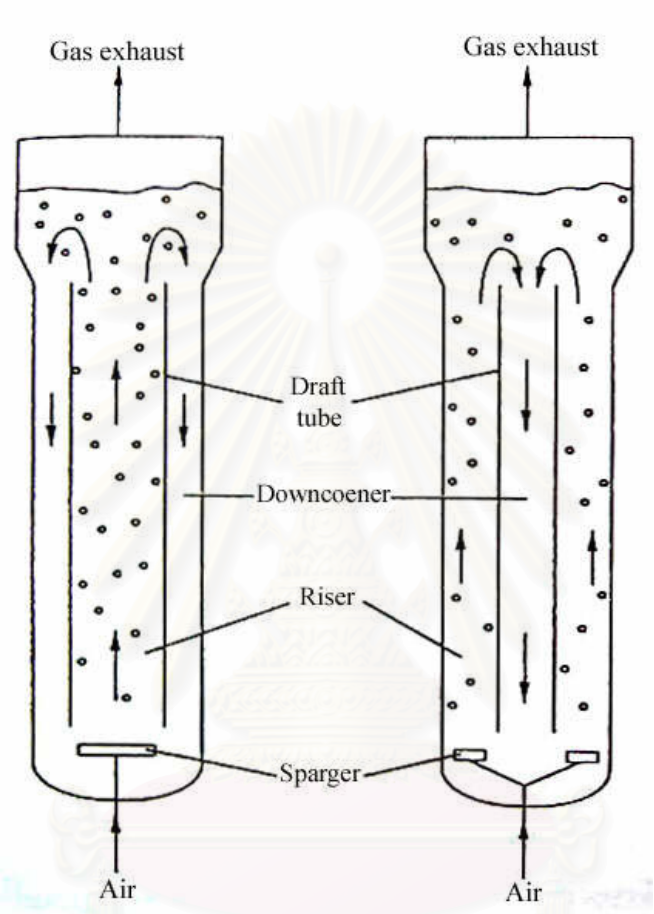
ถังหมักแบบนี้ออกแบบง่าย ราคาถูก การควบคุมไม่ยุ่งยาก แต่มีขีดจำกัดในเรื่องของประสิทธิภาพในการถ่ายเทออกซิเจน และการถ่ายเทมวลสาร ตลอดจนความร้อน เนื่องจากการถ่ายเทมวลสารต่างๆในถังขึ้นกับระบบการให้อากาศ เพราะปริมาณออกซิเจนจะมีมากบริเวณส่วนล่างของถังและจะค่อยๆลดลงตามความสูงของถัง จึงทำให้เซลล์บริเวณส่วนล่างที่อยู่ใกล้กับระบบการให้อากาศ จะได้รับออกซิเจนมากกว่าเซลล์ที่อยู่สูงขึ้นไป และทำให้มีเมแทบอลิซึมสูงกว่าด้วย ทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์และความร้อนเกิดขึ้นสูง ซึ่งอาจมีผลต่อผลิตผลที่เกิดขึ้น และถ้าในระหว่างการเพาะเลี้ยง มีการเติมกรด ด่าง และสารกำจัดฟองทางด้านบนของถังหมัก ซึ่งอาจผลต่อเซลล์ด้านบนได้ (รูปที่ 1.3)

**ถังหมักแบบยกตัวของอากาศ (Air-lift fermenter)**

เป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แบบให้อากาศ ที่มีการออกแบบให้เพิ่มการถ่ายเทมวลสารระหว่างของเหลวกับอากาศ โดยการเพิ่มพื้นที่ระหว่างผิวสัมผัส ด้วยการกระจายของฟองอากาศไปยังบริเวณของเหลว ถังหมักแบบยกตัวของอากาศจะใช้หลักการเดียวกับถังหมักแบบบับเบิล โดยพ่นอากาศเข้าทางด้านฐานของถังหมัก ฟองอากาศจะกระจายเข้าสู่ของเหลวและลอยสูงขึ้นสู่ของเหลวด้านบนของถังหมักด้วยความเร็วที่ขึ้นอยู่กับอัตราการให้อากาศ ด้วยแรงยกตัวของฟองอากาศจะทำให้ของเหลวภายในถังมีการไหลเวียนที่เกิดจากการกวนและการผสม ซึ่งต่างจากถังหมักแบบบับเบิลที่เกิดการไหลเวียนของของไหลอย่างไร้ทิศทาง และความเร็วต้นของของไหลสูงแต่ความเร็วปลายมีค่าต่ำ ในขณะที่ถังหมักแบบยกตัวของอากาศการไหลของของไหลจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และการไหลเวียนของของไหลมีลักษณะเป็นวงแล้วไหลด้วยความเร็วปลายที่สูงซึ่งเกิดจากความแตกต่างของความดันของของไหลระหว่างการยกตัวขึ้นของอากาศ (รูปที่ 1.4)

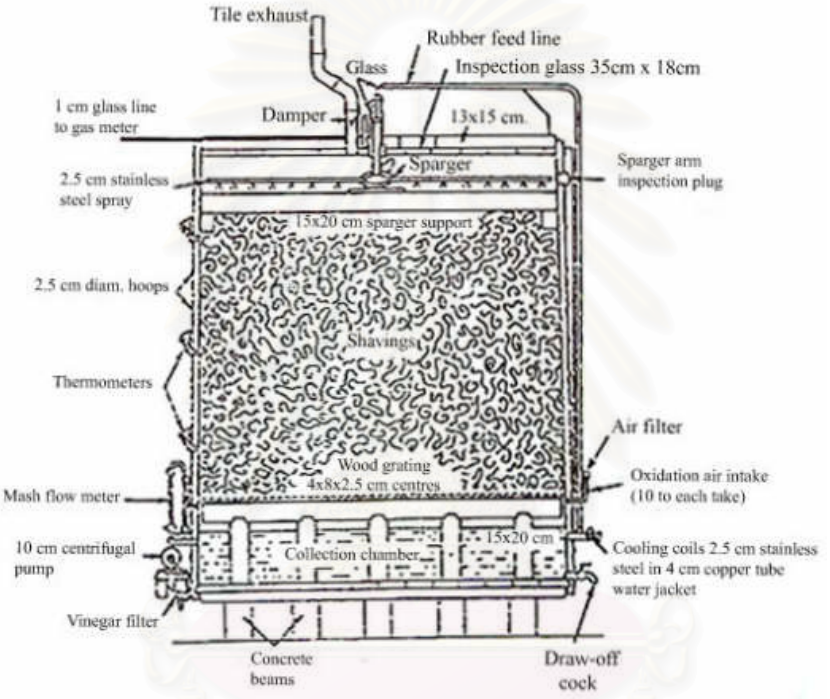
**ถังหมักแบบ Packed bed (Packed bed fermenter)**

เป็นถังหมักที่มีลักษณะเป็นคอลัมน์รูปทรงกระบอกสูง ภายในบรรจุสารเฉื่อยที่มีลักษณะเป็นชิ้น ๆ เช่น เศษไม้ กิ่งไม้ ถ่านหิน หรือโพลีเทธิลีน เป็นต้น การใช้ถังหมักแบบนี้ในตอนเริ่มต้นทำได้โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อและจุลินทรีย์เข้าไปทางด้านบนของถังหมัก เมื่อจุลินทรีย์เจริญขึ้นเป็นฟิล์มบางๆ เกาะอยู่รอบวัสดุตัวกลางที่บรรจุในถังหมักแล้ว จึงเติมอาหารใหม่เข้าไปทางด้านบนของถังหมัก อาหารที่ผ่านการหมักแล้วจะออกจากถังหมักทางด้านล่าง ตัวอย่างที่สำคัญของถังหมักแบบนี้ได้แก่ เจเนอเรเตอร์ (generator) ที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงสูงบรรจุด้วยเศษไม้ ในปัจจุบันถังหมักแบบนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้กัน ยกเว้นในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากมีข้อดีคือ ทำได้ง่าย และประหยัดพื้นที่กว่าวิธีอื่น (รูปที่ 1.5)




**รูปที่ 1.4** ถังหมักแบบยกตัวของอากาศ (Air-lift fermenter) (31)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 1.5** ถังหมักแบบแบบ Packed bed (Packed bed fermenter) (31)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ถังหมักแบบ Rotating disc ( Rotating disc fermenter)**

ตามปกติแล้วถังหมักแบบนี้นิยมใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเป็นฟิล์มบนแผ่นดิสก์ (disc) ซึ่งหมุนได้อย่างช้าๆ แต่ใน ค.ศ. 1980 Anderson และ Blain ได้อาศัยหลักการเดียวกันนี้ในการสร้างถังหมักขนาดเล็กที่มีปริมาตรใช้งานต่างกันจนถึง 40 ลิตร โดยใช้ดิสก์ที่ทำจากโพลีโพรพิลีน (polypropylene) พบว่าวาสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราได้หลายชนิด เช่น *Aspergillus, Rhizopus, Mucor, Penicillium* และใช้ในการหมักกรดซิตริกโดยใช้เชื้อรา *A. niger* ให้ผลผลิตสูงถึง 80 กรัมต่อลิตร

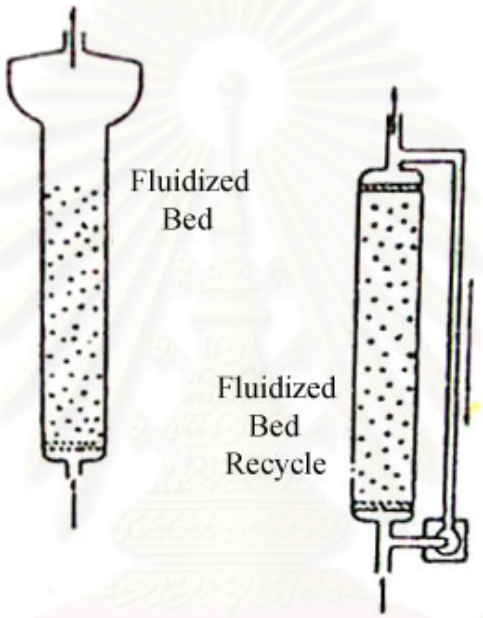
**ถังหมักแบบ Deep-jet ( Deep-jet fermenter)**

เป็นถังหมักที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบต่อเนื่อง ซึ่งออกแบบให้ใช้พลังงานจากเครื่องสูบในการหมุนเวียนอาหารเหลวจากถังหมัก ผ่านไปยัง air entrainer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ให้อากาศและไหลวนกลับเข้าสู่ถังหมักอีก ตัวอย่างถังหมักแบบนี้ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ ถังหมักที่ผลิตขึ้นโดย Vogellbusch ในถังหมักแบบนี้จะมีmultiphase pump ทำหน้าที่สูบอาหารเหลวผ่าน broth cooler air ไปยัง entrainer ซึ่งอยู่สูงกว่าระดับของถังหมักมาก หลังจากนั้นอาหารเหลวที่ผสมกับอากาศแล้วจะไหลผ่านลงมาตามท่อที่มีปลายเป็นรูปโคนเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราความเร็วสูงทำให้ของเหลวในถังหมักเกิดการหมุนวนอย่างรุนแรง

**ถังหมักแบบฟลูอิไดซ์ (Fluidized fermenter)**

ถังหมักแบบนี้มักใช้กับการตรึงเซลล์กับวัสดุพาหะ และมีการให้อากาศผ่านทางด้านล่างของถังหมัก โดยความเร็วของอากาศที่ป้อนให้ จะทำให้เซลล์มีการเคลื่อนตัว และทำให้เซลล์และสารอาหารต่างๆ มีการหมุนเวียนยิ่งขึ้น ทำให้การถ่ายเทมวลสารและการถ่ายเทความร้อนได้อย่างทั่วถึง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงสำหรับถังหมักแบบนี้ คือ การควบคุมปริมาณอากาศที่ป้อนให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์ต่างๆ อยู่ในสภาพที่ลอยตัว และสัมผัสกับสารอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รูปที่ 1.6)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 1.6** ถังหมักแบบฟลูอิไดซ์ (Fluidized fermenter) (31)

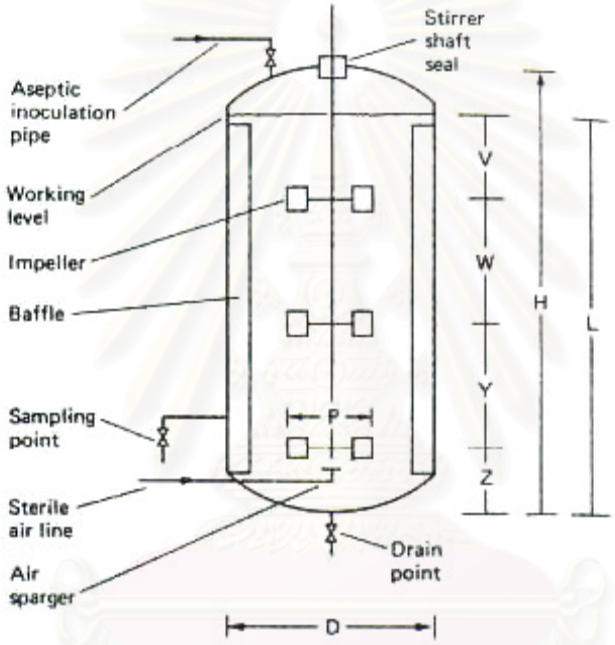
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter)**

ถังหมักแบบนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุด ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ โรงงานต้นแบบ จนกระทั่งในอุตสาหกรรม เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณสูง แต่สามารถใช้ได้ทั้งในสภาพของการเพาะเลี้ยงแบบใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ โดยลักษณะถังหมักจะเป็นภาชนะรูปทรงกระบอก ตั้งตรงในแนวดิ่ง ซึ่งมีใบพัดสำหรับการกวนผสม และมีท่อให้อากาศทางด้านล่างใต้ใบพัด ก้นถังโค้งมน ไม่เป็นมุม เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดจุดอับหรือป้องกันการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ ตัวถังอาจทำด้วยพลาสติก แก้ว หรือโลหะ เช่น เหล็กที่ปราศจากสนิม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ถังหมักนี้มีส่วนประกอบหลายส่วน ได้แก่ ถังหมัก ใบกวน แผ่นกั้น ท่อพ่นให้อากาศ เครื่องมือวัดและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม เช่น การควบคุมอุณหภูมิ การควบคุม pH การควบคุมปริมาณออกซิเจน การควบคุมระดับน้ำหมัก การควบคุมความเร็วรอบของใบกวน การป้องกันฟอง (รูปที่ 1.7)

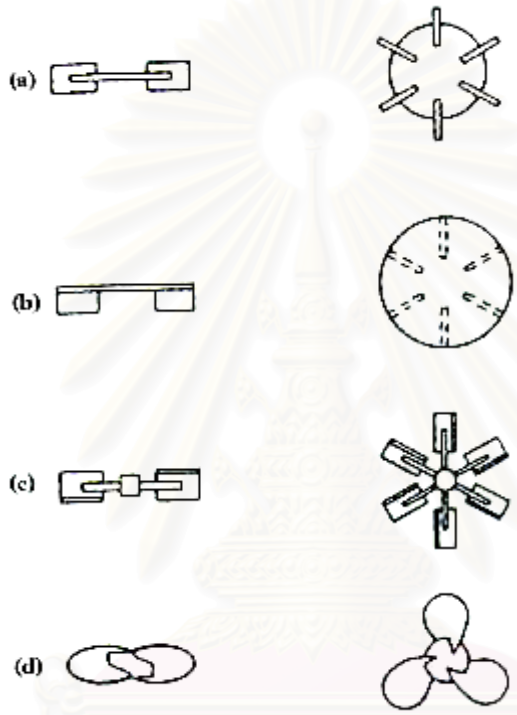
ส่วนประกอบที่ทำหน้าที่ในการให้อากาศและการกวน ได้แก่ เครื่องกวน (stirrer) แผ่นกั้นหรือกะบัง (baffle) และระบบให้อากาศ (aeration system)

**เครื่องกวน** ประกอบด้วยใบพัด (impeller or agitator) ซึ่งติดตั้งอยู่บนแกนหมุนกลางถังหมักและมอเตอร์ซึ่งใช้พลังงานไฟฟ้าเพื่อหมุนใบพัด ใบพัด มีหน้าที่หลัก 2 ประการคือ ลดขนาดของฟองอากาศ ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวในการส่งผ่านออกซิเจนเพิ่มขึ้นและลดระยะทางในการแพร่ลง และรักษาสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในถังหมักให้มีความสม่ำเสมอ ชนิดของใบพัด สามารถจำแนกได้หลายแบบ คือ disc turbine, vaned disc, open turbine และ propeller ดังแสดงในรูปที่ 1.8 ใบพัดแบบที่เหมาะสมที่สุดสำหรับถังหมักโดยทั่วไปได้แก่ disc turbine เพราะใบพัดแบบนี้สามารถตีอากาศเป็นฟองขนาดเล็กได้โดยไม่มีปัญหาฟองท่วมใบพัด แม้ว่าจะมีการอัดอากาศเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราความเร็วสูง นอกจากชนิดของใบพัด ขนาดและตำแหน่งของใบพัดก็มีความสำคัญเช่นกัน ในทางทฤษฎี ใบพัดควรอยู่เหนือก้นถังประมาณ 1/3-1/2 ของความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมัก (D) และถังหมักทรงสูงซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างส่วนสูงจากก้นถังถึงผิวหน้าของเหลวในถังหมักกับเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมัก (L/D ratio) มากกว่า 1 ถ้าต้องการให้มีการให้อากาศและการกวนผสมที่เพียงพอ ต้องใช้ใบพัดมากกว่า 1 ชุด ในทางปฏิบัติโดยทั่วไปจะติด ใบพัดบนแกนหมุนให้มีระยะห่างเท่ากับความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมักดังตัวอย่างในรูปที่ 1.7




**รูปที่ 1.7** ถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) (31)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 1.8** รูปแบบของใบพัดชนิดต่าง ๆ (a) disc turbine; (b) baned disc; (c) open turbine; (d) marine propeller

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**แผ่นกั้นหรือกะบัง** โดยทั่วไปถังหมักที่มีเครื่องกวนจะมีกะบังติดอยู่ 4 อัน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันการเกิดน้ำวน และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการให้อากาศ ตามปกติกะบังจะเป็นแผ่นโลหะที่มีลักษณะยาวและมีความกว้างประมาณ 1/10 ของความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของถังหมัก ติดตั้งฉากกับผนังด้านข้างของถังหมักดังแสดงในรูปที่ 1.7 โดยมีระยะห่างจากถังหมักพอสมควรเพื่อให้ของเหลวภายในถังหมักสามารถเคลื่อนที่ได้รอบกะบัง และทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญบนกะบังและผนังของถังหมักได้น้อยที่สุด

**ระบบให้อากาศ** ระบบให้อากาศหมายถึงอุปกรณ์ที่ทำหน้าที่นำอากาศเข้าสู่ของเหลวภายในถังหมัก ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ เครื่องสูบอากาศ เครื่องกรองอากาศ และหัวจ่ายอากาศ (air sparger) การออกแบบหัวจ่ายอากาศเพื่อให้ได้ฟองอากาศที่มีขนาดเริ่มต้นตามต้องการนั้น จำเป็นต้องทราบว่าจะใช้ระบบให้อากาศเพียงอย่างเดียวหรือใช้กับเครื่องกวน หัวจ่ายอากาศที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมี 4 แบบ คือ porours sparger, orifice sparger, nozzle sparger และ combined sparger-agitator Porous sparger เป็นหัวจ่ายอากาศที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งอาจทำจาก sintered glass เซรามิค หรือโลหะก็ได้ นิยมใช้กับถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการชนิดที่ไม่มีเครื่องกวนฟองอากาศที่เกิดขึ้นจะมีขนาดประมาณ 10-100 เท่าของขนาดรูของหัวจ่าย การอัดอากาศผ่าน porous sparger ซึ่งมีรูให้อากาศขนาดเล็กจะทำให้ความดันลดลง และมีผลทำให้อากาศผ่านเข้าสู่ของเหลวภายในถังหมักได้น้อย นอกจากนี้ยังอาจมีปัญหาการอุดตันเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์อีกด้วย Orifice sparger เป็นหัวจ่ายอากาศที่ทำจากท่อเจาะรู (perforated pipe) สามารถใช้ได้ทั้งในถังหมักที่มีและไม่มีเครื่องกวน ในถังหมักขนาดเล็กที่มีเครื่องกวนอาจใช้ท่อรูปวงแหวนหรือรูปกากบาท เจาะรูที่ผิวด้านล่าง ติดตั้งใต้ใบพัด Nozzle sparger หัวจ่ายอากาศแบบนี้ มีลักษณะเป็นท่อปลายเปิดขนาดเล็กเพียงจุดเดียว (single open or partially closed pipe) ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้มากทั้งในถังหมักขนาดเล็กและขนาดใหญ่ การติดตั้งหัวจ่ายอากาศแบบนี้ ควรติดอยู่ตรงกลางถังหมักใต้ใบพัด โดยมีระยะห่างจากใบพัดมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อป้องกันฟองอากาศท่วมใบพัด ตามปกติระบบให้อากาศแบบ single-nozzle sparger จะมีการสูญเสียความดันน้อยกว่าระบบให้อากาศแบบอื่น ๆ และไม่มีปัญหาการอุดตัน และCombined sparger-agitator เป็นระบบที่ใช้ช่องกลวงภายในแกนหมุนใบพัดเป็นช่องทางให้อากาศเข้าสู่ถังหมัก แล้วปล่อยออกมาตามรูที่อยู่ระหว่างใบพัดแบบ disc turbine ดังแสดงในการหมุนใบพัดในระดับปานกลาง

**เชื้อ *Aeromonas***

เชื้อ *Aeromonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้นตรง ขนาดความยาวโดยทั่วไปประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน (2-4.5 เท่าของความกว้าง) เคลื่อนที่โดยใช้หนวด (Flagellum) ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างสารสี ดีเอ็นเอประกอบด้วย Gaunine-Cytosine 57-63 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะโคโลนีโดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ บางครั้งพบเป็นสายสั้นๆ เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน (facultaively anaerobic) เดิมถูกจัดอยู่ใน Family *Vibrionaceae* (32) ต่อมา Colwell และคณะเสนอให้อยู่ใน Family *Aeromonadaceae* เนื่องจากมีลักษณะใกล้เคียงกับ *Enterobacteriaceae* ด้วย (33) เชื้อ *aeromonas* เป็นเชื้อที่ก่อโรค ที่เรียกว่า Motile aeromonas disease ส่วนใหญ่พบในปลาน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งที่มีสารอินทรีย์มาก ลักษณะของอาการที่พบ เช่น โรคเกล็ดพอง โรคตกเลือด และโรคท้องบวม เป็นต้น เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆไปสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารและให้พลังงานได้ เปลี่ยนไนเตรดให้เป็นไนไตรท์ได้ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-45 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุดประมาณ 25-30 °C ช่วง pH 5.5-9.0 ส่วนปฏิกิริยาต่างๆที่ทดสอบพบว่า cytochome oxidase test ให้ผลบวก สามารถสร้าง indole ได้ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ หรือ Rimler-Shotts medium ซึ่งใช้แยกเชื้อนี้ออกจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆยกเว้น V.group F บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีสีเหลือง ไม่ไวต่อสารประกอบ vibriostat และสามารถผลิต extracellular enzymes ได้แก่ hemolysins, cytotoxins, enterotoxin, lipases, proteases, amylases, nucleases, chitinases

**เชื้อโคลน Chi60**

เป็นเชื้อที่ได้จากการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp. TU09 ซึ่งทำการโคลนด้วยวิธี shot gun cloning เข้าสู่ *E.coli* DH5α โดยใช้ pBluescriptSK⁻ เป็นดีเอ็นเอพาหะ (35) ซึ่งไคทิเนสนี้มีมีความคล้ายคลึงกับ Chi A ของ *Serratia marcescens* เมื่อนำเอนไซม์หยาบของ Chi60 ที่ได้จากการเลี้ยง XL-1 Blue ที่มียีน Chi60 อยู่ใน CCMM ที่ 37 °C, 250 rpm มาทำการศึกษาด้วย SDS-PAGE และย้อมสีแอคติวิตีพบแถบโปรตีนที่มีไคทิเนสแอคติวิตีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน มีภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของไคทิเนส Chi60 ที่ pH 4-6 และอุณหภูมิ 50-60 °C และเมื่อศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทด้วยการย่อยไคทินชนิดต่างๆ พบว่า สามารถย่อย crystalline chitin และ amorphous chitin มีค่าการย่อยสัมพัทธ์เป็น 50% และ 70% ของแอคติวิตีในการย่อย soluble chitin และมีผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยไคทินเป็นไดเมอร์ (35, 36)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสจากเชื้อ 2 ชนิด คือ *Aeromonas caviae* D6 และเชื้อโคลน Chi60 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีแอคติวิตีสูงและมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสอย่างเดียว โดย *Aeromonas caviae* D6 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจากดิน ซึ่งสามารถผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงและเมื่อนำไคทิเนสไปย่อยคอลลอยดอลไคทิน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นมอนอเมอร์เพียงอย่างเดียว และเชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อโคลนที่มีแอคติวิตีสูงและพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเป็นไดเมอร์เพียงอย่างเดียว เมื่อนำไคทิเนสไปย่อยเบทาไคทิน ในขณะที่เชื้อดั้งเดิมและเชื้อโคลนไคทิเนสชนิดอื่นให้ผลิตภัณฑ์ผสม ซึ่งจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ของ *A. caviae* D6 และเชื้อโคลน Chi60 ที่เป็นมอนอเมอร์และไดเมอร์เพียงอย่างเดียว ทำให้สนใจที่จะเพิ่มปริมาณการผลิตไคทิเนสในปริมาณสูงจากเชื้อทั้ง 2 ชนิด เพื่อใช้ในการผลิตมอนอเมอร์และไดเมอร์ในเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากปัจจุบันการผลิตมอนอเมอร์และไดเมอร์โดยใช้เอนไซม์มีน้อย ส่วนใหญ่ผลิตโดยใช้สารเคมี (กรดและด่าง) ซึ่งได้ปริมาณผลิตภัณฑ์น้อย และผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้เป็นแบบผสม ต้องมีการแยกผลิตภัณฑ์ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

## อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Autoclave: Model HA-30, Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

Autopipette: Pipetman, Glison, France

Centrifuge: Microcentrifuge High Speed: Model 1110 Mikro 22R, Hettich zentrifugen, Germany

Centrifuge: Refrigerated centrifuge: Model J2-21, Beckman Instrument Inc., U.S.A.

Electrophoresis Unit: Model Mini-protein II Cell, BioRad, U.S.A.

Fermenter: Bioflo III System 5L Model manufactured, New Brunswick Scientific Co.,Inc., U.S.A.

Fermenter: Biostat C, B.Braun Biotech International, Germany

High performance liquid chromatography: Shimadzu, Japan

Incubator: Model 1H-100,Gallenkamp, England

Incubator shaker: Model G-76, New Brunswick Scientific Co.,Inc., U.S.A.

Magnetic stirrer and heater: Model IKAMA® GRH, Janke & Kunkel Gmbh & Co.KG, Japan

Membrane filter: cellulose nitrate, pore size 0.2 µm., Whatman, Japan

Orbital shaker: Gallenkamp, Germany

pH meter: PHM83 Autocal pH meter, Radiometer, Denmark

Spectrophotometer: Jenway 6400, England

Vortex: Model K 550-GE, Scientific Industries, U.S.A.

Water bath: Charles Hearson Co.Ltd., England

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารเคมี

Acetonitrile: (HPLC grade), Merck, Germany

Acrylamine: Merck, Germany

Ammonium persulphate: Sigma, U.S.A.

Ammonium sulphate: Sigma, U.S.A.

Ampicillin: Biobasic Inc, Thailand

Antifoam: Fluka, Switzerland

Bacto-Agar: DIFCO, U.S.A.

β-mercaptoethanol: Fluka, Switzerland

Bovine serum albumin (BSA): Sigma, U.S.A.

Bromophenol blue: Merck, Germany

Calcium chloride: Merck, U.S.A.

Citric acid: Sigma, U.S.A.

Coomassie brilliant blue R: Acros organics, Belgium

Coomassie brilliant blue G: Fluka, Switzerland

DEAE-cellulose: Sigma, U.S.A.

di-potassium hydrogen phosphate anhydrous: Carlo Erba Reagenti, Italy

di-Sodium hydrogen phosphate: Fluka, Switzerland

Ethyl alcohol absolute: Carlo Erba Reagenti, Italy

Ethylene glycol chitin: Seikagru Corporation, Japan

Flake chitin: Ta Ming Enterprises Co., Ltd, Samutsakon, Thailand

Fluorescent brightener 28: Sigma, U.S.A.

Glacial acetic acid: BDH, England

Glucose: Sigma, U.S.A.

Glycerol: Scharlau, Spain

Glycine: Sigma, U.S.A.

Hydrochloric acid: Lab scan, Ireland

Low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis: Amersham, U.S.A.

Magnesium sulphate-7-hydrate: BDH, England

Methanol: Scharlau, Spain

*N*-acetyl-D-glucosamine: Sigma, U.S.A.

N,N'-methyl-bis-acrylamide: Sigma, U.S.A.

85%Phosphoric acid: Lab scan, Ireland

Potassium ferricyanide: BDH, England

Potassium phosphate monobasic: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium azide: BDH, England

Sodium carbonate: BDH, England

Sodium chloride: Carlo Erba Reagenti, Italy

Sodium dodecyl sulphate: Sigma, U.S.A.

Sodium hydroxide: Carlo Erba Reagenti, Italy

Tris(hydroxymetyl)-aminomethane: Carlo Erba Reagenti, Italy

Tri- sodium citrate dehydrate: Carlo Erba Reagenti, Italy

TritonX-100: Merck, Germany

Tryptone: Scharlau, Spain

Yeast extract: Scharlau, Spain

## จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

### *Aeromonas caviae* D6

*A. caviae* D6 เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากดินที่จังหวัดนครปฐม (จากห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีแอคติวิตีสูง โดยคัดแยกบนอาหารแข็ง colloidal chitin minimum medium (CCMM) ประกอบด้วย 0.25%(w/v) yeast extract, 0.1%(w/v) $(NH_4)_2SO_4$, 0.03%(w/v) $MgSO_4.7H_2O$, 0.6%(w/v) $KH_2PO_4$, 1.0%(w/v) $K_2HPO_4$ และ 0.02%(w/v, dry weight) colloidal chitin และพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยวิธีชีวเคมีและซีโรโลยี (Biochemical และ Zerology)โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

### เชื้อโคลน Chi60

เชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อที่ได้จากการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp.TU09 ด้วยวิธี shot gun cloning (โดยคุณกมลทิพย์ ขัตติยะวงศ์) โดยใช้ pBluescript $SK^-$ เป็นดีเอ็นเอพาหะ เข้า *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### Luria-Bertani (LB) medium

ประกอบด้วย 1%(w/v) tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract และ 0.5%(w/v) NaCl สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเติม 1.5% (w/v) agar จากนั้นปรับ pH เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที สำหรับการเลี้ยงเชื้อโคลน Chi60 เติมแอมพิซิลลิน 100 μg/ml

**Colloidal chitin minimum medium (CCMM)**

ประกอบด้วย 0.25%(w/v) yeast extract, 0.1%(w/v) $(NH_4)_2SO_4$, 0.03%(w/v) $MgSO_4.7H_2O$, 0.6%(w/v) $KH_2PO_4$, 1.0%(w/v) $K_2HPO_4$ และ 0.02%(w/v, dry weight) colloidal chitin สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเติม 1.5%(w/v) agar ปรับ pH เป็น 7.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 ˚C นาน 15 นาที

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส**

**การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์**

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB, บ่มที่ 37˚C, เขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สำหรับเชื้อโคลน Chi60 เติมแอมพิซิลลิน 100 μg/ml.ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ด้วย

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับขวดเขย่า**

เนื่องจากเชื้อโคลน Chi60 ที่ได้รับจากคุณกมลทิพย์ ได้มีการศึกษาภาวะในการเลี้ยงเบื้องต้นแล้ว พบว่าสามารถเจริญเติบโตและผลิตไคทิเนสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 μg/ml ที่อุณหภูมิ 37 ˚C ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาภาวะในการเลี้ยงเพิ่มเติม ดังนี้

**การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

นำหัวเชื้อโคลน Chi60 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 μg/ml. และมีปริมาตรต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ของขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 ˚C, เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การศึกษาความเร็วในการเขย่าต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

นำหัวเชื้อโคลน Chi60 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 µg/ml. ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็วในการเขย่าต่างๆ คือ 150, 250 และ 350 รอบต่อนาที บ่มที่ 37 ˚C และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับถังหมัก**

นำหัวเชื้อโคลน Chi60 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ที่มีแอมพิซิลลิน 100 µg/ml. ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (Dissolved oxygen concentration; DO) ต่างๆ คือ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (ควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการให้อากาศและควบคุมอัตราการปั่นกวนให้คงที่ที่ 100 รอบต่อนาที) ที่ 37 ˚C และติดตามผลด้วยการวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และวัดแอคติวิตีที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *A. caviae* D6 ในระดับขวดเขย่า**

เนื่องจาก *A.caviae* D6 เป็นเชื้อจากห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร ได้ทำการคัดแยกไว้แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส และคุณสมบัติของไคทิเนส *A.caviae* D6 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสและคุณสมบัติของไคทิเนส *A.caviae* D6 ดังนี้

**การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ*A.caviae* D6**

นำหัวเชื้อ *A. caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการเติม ของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 1 เปอร์เซ็นต์ คือ กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A.caviae* D6**

นำหัวเชื้อ *A.caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ในอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A.caviae* D6**

นำหัวเชื้อ *A.caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ของขวดเขย่า เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A.caviae* D6**

นำหัวเชื้อ *A.caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีเปอร์เซ็นต์ของ yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ คือ 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การศึกษาปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A.caviae* D6**

นำหัวเชื้อ *A.caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca, Cu และแร่ธาตุแต่ละชนิดจะใช้ 2 ความเข้มข้น คือ 0.001% และ 0.01% เขย่า 250 รอบต่อนาที และติดตามผลด้วยการวัดแอคติวิตีทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *A. caviae* D6 ในระดับถังหมัก**

นำหัวเชื้อ *A.caviae* D6 1 เปอร์เซ็นต์ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่เหมาะสม (ที่ได้ทำการศึกษาข้างต้น) 3.5 ลิตรในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ DO ต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ (ควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการปั่นกวนระหว่าง 100-300 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศให้คงที่ที่ 0.5 vvm (1.75 L/min)) และติดตามผลด้วยการวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และวัดแอคติวิตีที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

**การศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์**

**การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์**

**การนับจำนวนเซลล์**

เป็นการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อ ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์บนอาหารแข็ง โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการเจือจางแบบ serial dilution ให้มีความเจือจางของจำนวนเชื้อที่เหมาะสม เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับโคโลนีที่เกิดขึ้น

**การวัดความขุ่นของเซลล์**

เป็นการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

**การติดตามการทำงานของเอนไซม์**

การติดตามแอคติวิตีของไคทิเนส ด้วยวิธีการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ (เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน; GlcNAc) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสับสเตรทของไคทิเนส โดยอาศัยวิธีของ Imoto และ Yagishita ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Schales (37) ในการวัดแอคติวิตีของไคทิเนส ทำโดยบ่มเอนไซม์กับคอลลอยดอลไคทินซึ่งเป็นสับสเตรทด้วย 100 mM บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ในปริมาตรทั้งหมด 1.5 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 30 นาที โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดแรกเป็นชุดควบคุม โดยนำไคทิเนสต้มในน้ำเดือดเพื่อให้เสียสภาพก่อนนำมาบ่มกับสับสเตรท ส่วนชุดที่สองนำไคทิเนสที่มีแอคติวิตีอยู่บ่มกับสับสเตรท จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม potassium ferric cyanide (0.5 กรัม $K_3Fe(CN)_6$ ใน 0.5 โมลาร์ $Na_2CO_3$) 2 มิลลิลิตร และนำไปต้ม 15 นาที เพื่อเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน นำมาแช่ในน้ำเย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนคอลลอยดอลไคทิน นำส่วนใสด้านบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากชุดควบคุมมาลบกับชุดที่มีแอคติวิตี จากนั้นนำผลต่างที่ได้มาเทียบหาปริมาณเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีของไคทิเนส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทแล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที

**การศึกษาคุณสมบัติและลักษณะบางประการของไคทิเนส**

**การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส**

การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส โดยนำไคทิเนสมาวัดแอคติวิตีที่บัฟเฟอร์ต่างๆ กัน ตั้งแต่ pH 3 -10 โดยทำการวัดใน 100 mM Citrate buffer pH 3-6 ,100 mM Phosphate buffer pH 6-8 และ 100 mM Tris-HCl buffer pH 7-10

**การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส**

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส โดยนำไคทิเนสมาวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ตั้งแต่อุณหภูมิ 30 - 80 ˚C โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

**การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคทิเนส**

การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคทิเนส เป็นการนำไคทิเนสมาย่อยไคทินชนิดต่างๆ ใน 100 mM บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 30 นาที โดยจะใช้สับสเตรทที่เป็น soluble และ amorphous chitin ได้แก่ PNAC และ คอลลอยดอลไคทิน ปริมาณ 1 mg/ml และใช้สับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ เบทาไคทิน ผงไคทินปู ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด ในปริมาณ 10 mg/ml

**การหาขนาดโมเลกุล**

การหาขนาดโมเลกุลของไคทิเนส นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมมาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ผสม 0.01% ไกลคอลไคทิน (ซึ่งใช้เป็นสับสเตรทสำหรับหาไคทิเนสที่มีแอคติวิตีบนเจล) แบ่งเจลออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกสำหรับย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เพื่อดูแถบโปรตีน ชุดที่สอง นำมากำจัด SDS ออกเพื่อคืนสภาพธรรมชาติ (renature) ของโปรตีน โดยแช่ใน 100 mM บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส ที่มี 1% Triton X-100 ผสมอยู่ ทิ้งไว้ที่ 37 ˚C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาย้อมแอคติวิตีด้วย 0.01%(W/V) Fluorescent brightener 28 ใน 0.5 M Tris-HCl pH 8.9 เป็นเวลา 15-20 นาที ในที่มืด ,ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปส่องดูแถบแอคติวิตีภายใต้แสง UV เพื่อดูแถบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของไคทิเนส

**การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)**

นำไคทิเนสที่ผลิตได้มาย่อยไคทินที่เป็น amorphous chitin ได้แก่ คอลลอยดอลไคทิน ปริมาณ 1 mg/ml และใช้สับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด ปริมาณ 10 mg/ml ใน 100 mM บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาต้ม 30 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกสับสเตรทออกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ นำส่วนใสมา 300 μl ผสมกับ acetonitrile 700 μl แล้วกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปฉีด HPLC โดยใช้คอลัมน์ Shodex Asahipak $NH_2P$-50 ตัวทำละลายเคลื่อนที่ใช้ acetonitrile ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 7 ต่อ 3 โดยปริมาตร และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

### การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 และเชื้อ *Aeromonas caviae* D6

การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 และเชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ทำการศึกษา 2 ระดับ คือ ระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก โดยศึกษาในระดับขวดเขย่าก่อนซึ่งเป็นการเลี้ยงขนาดเล็ก เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการศึกษาเพราะในระดับถังหมักเป็นการเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่และปริมาณมาก และนำไคทิเนสที่ผลิตได้มาผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และเอ็น-แอซีทิลไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์

### เชื้อโคลน Chi60

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของคุณกมลทิพย์ (35) ได้ศึกษาการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ต่างๆ คือ JM 109, DH5$\alpha$ และ XL-1 Blue โดยเปรียบเทียบวงใสที่เกิดจากการย่อยสับสเตรทของไคทิเนสบนอาหารแข็ง CCMM หลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 2 วันพบว่าวงใสของเชื้อโคลน Chi60 ใน DH5$\alpha$ และ XL-1 Blue มีขนาดวงใสกว้างที่สุด ส่วนเชื้อโคลน Chi60 ใน JM 109 มีขนาดวงใสเล็กมาก หลังจากนั้นศึกษาผลของ IPTG ต่อการผลิตไคทิเนส ของเชื้อโคลน Chi60 ใน XL-1 Blue โดยเปรียบเทียบวงใสของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแข็ง CCMM ที่ไม่มีและมี IPTG พบว่า มีวงใสเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนีของเชื้อโคลน Chi60 ใน XL-1 Blue บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่ไม่มีและมี IPTG แสดงให้เห็นว่าเชื้อโคลน Chi60 มีโพรโมเตอร์ในการผลิตไคทิเนสของตัวเอง โดยไม่ต้องอาศัยตัวชักนำ (IPTG) ในการผลิตไคทิเนส และเมื่อศึกษาการผลิตของเชื้อโคลน Chi60 ใน XL-1 Blue ในอาหาร 3 ชนิด คือ LB, LB ที่มี 0.02% คอลลอยดอลไคทิน และ CCMM ที่มี 1% yeast extract พบว่า เชื้อโคลน Chi60 ใน XL-1 Blue ผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ LB ที่มี 0.02% คอลลอยดอลไคทิน (35, 36)

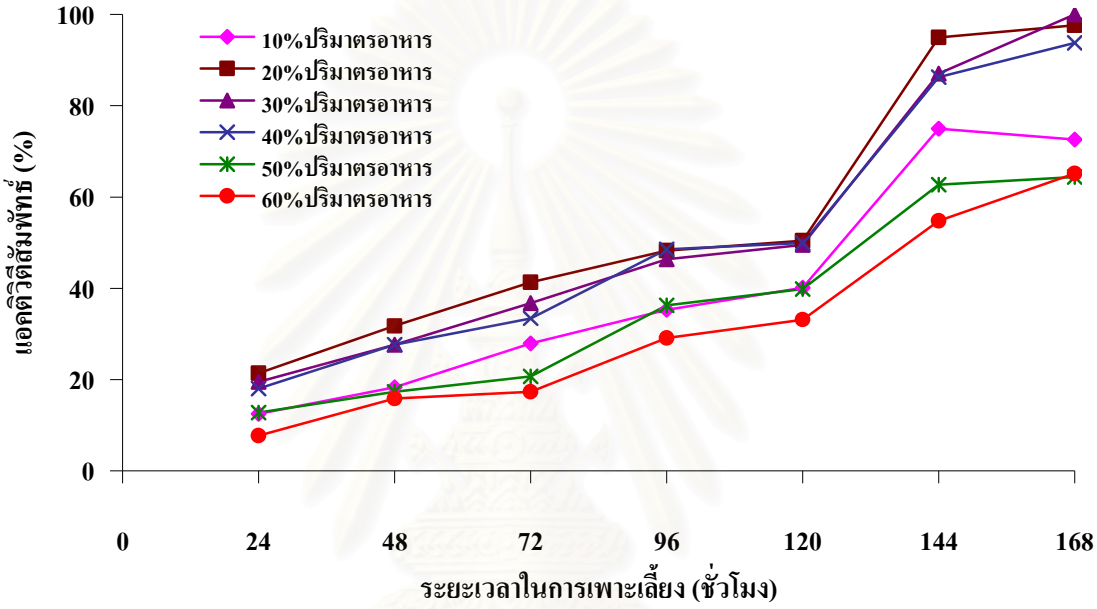
**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับขวดเขย่า**

เนื่องจากเชื้อโคลน Chi60 เป็นที่เชื้อโคลนที่ได้รับจากงานวิจัยของคุณกมลทิพย์ ซึ่งได้มีการศึกษาภาวะในการเลี้ยงเบื้องต้นแล้ว พบว่าสามารถเจริญเติบโตและมีการผลิตไคทิเนสได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ LB ที่มี 0.02% คอลลอยดอลไคทิน เพื่อเป็นการลดต้นทุนและเวลาในการเตรียมคอลลอยดอลไคทินซึ่งมีวิธีการเตรียมยุ่งยากและเสียเวลา จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาใช้ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อไป โดยทำการศึกษาปัจจัยด้านอากาศเพิ่มเติม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดในการเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าและความเร็วในการเขย่าต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60

**ผลการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

การศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่านี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงปัจจัยด้านอากาศและการถ่ายเทมวลสารที่มีผลต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อ ว่าเชื้อต้องการปริมาณอากาศมากน้อยเพียงใดในการผลิตไคทิเนส โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่ำ แสดงว่ามีปริมาณอากาศมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าสูง จากการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า พบว่า เชื้อโคลน Chi60 มีลักษณะการผลิตไคทิเนสที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าต่างๆ เหมือนกัน คือ ไคทิเนสมีการผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 144 จึงเริ่มคงที่ โดยมีแอคติวิตีสูงสุดที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 30% และแอคติวิตีของไคทิเนสที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 20% และ 40% มีแอคติวิตีไม่แตกต่างกับที่ 30% และพบว่า ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า เป็น 50% และ 60% ในขณะเดียวกันเมื่อลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าเป็น 10% ก็ทำให้ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลงด้วย (รูปที่ 3.1) และเมื่อพิจารณาแอคติวิตีรวมทั้งหมด พบว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 40% มีแอคติวิตีรวมมากที่สุด




**รูปที่ 3.1** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 µg/ml. ที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.416 U/ml.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

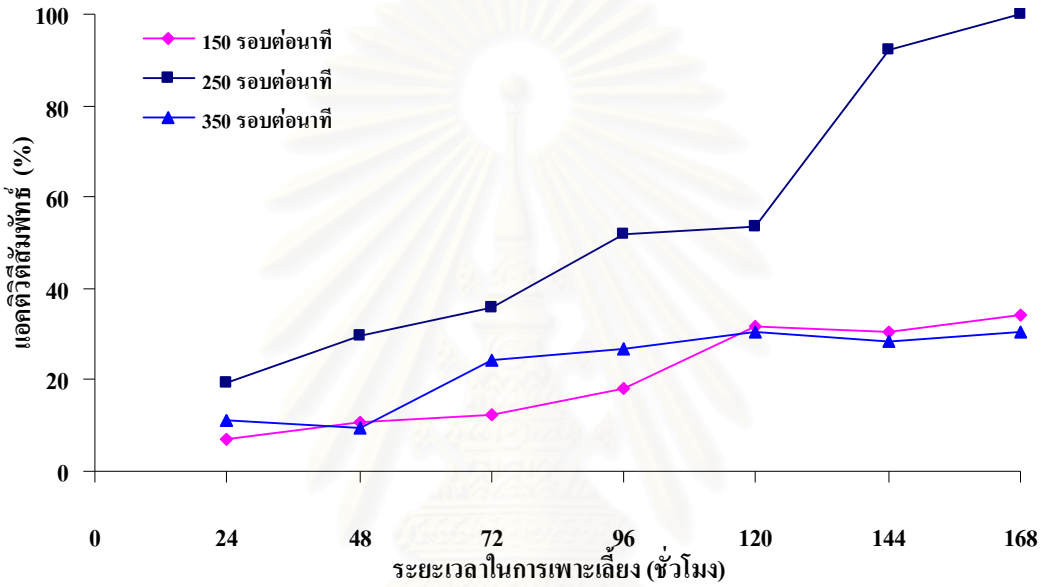
**ผลการศึกษาความเร็วในการเขย่าต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60**

การศึกษาความเร็วในการเขย่าต่ออัตราการผลิตไคทิเนส เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงปัจจัยด้านอากาศ และการถ่ายเทมวลสารที่มีผลต่อการผลิตไคทิเนสของเชื้อซึ่งเหมือนการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า โดยเป็นการศึกษาคู่ขนานว่าเชื้อต้องการปริมาณอากาศมากน้อยเพียงใดในการผลิตไคทิเนส โดยถ้าใช้ความเร็วในการเขย่าสูงก็ส่งผลให้มีปริมาณอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น และในการศึกษาความเร็วในการเขย่าที่ 150, 250 และ 350 รอบต่อนาทีนี้ ได้ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 40% (จากผลการทดลองข้างต้นที่ให้แอคติวิตีสูงสุด) ซึ่งจากการศึกษาความเร็วในการเขย่าพบว่า ความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ส่งผลให้เชื้อโคลน Chi60 ผลิตไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่การลดความเร็วในการเขย่าเป็น 150 รอบต่อนาที หรือเพิ่มความเร็วในการเขย่าเป็น 350 รอบต่อนาที ทำให้แอคติวิตีของไคทิเนสลดลง (รูปที่ 3.2)

**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับถังหมัก**

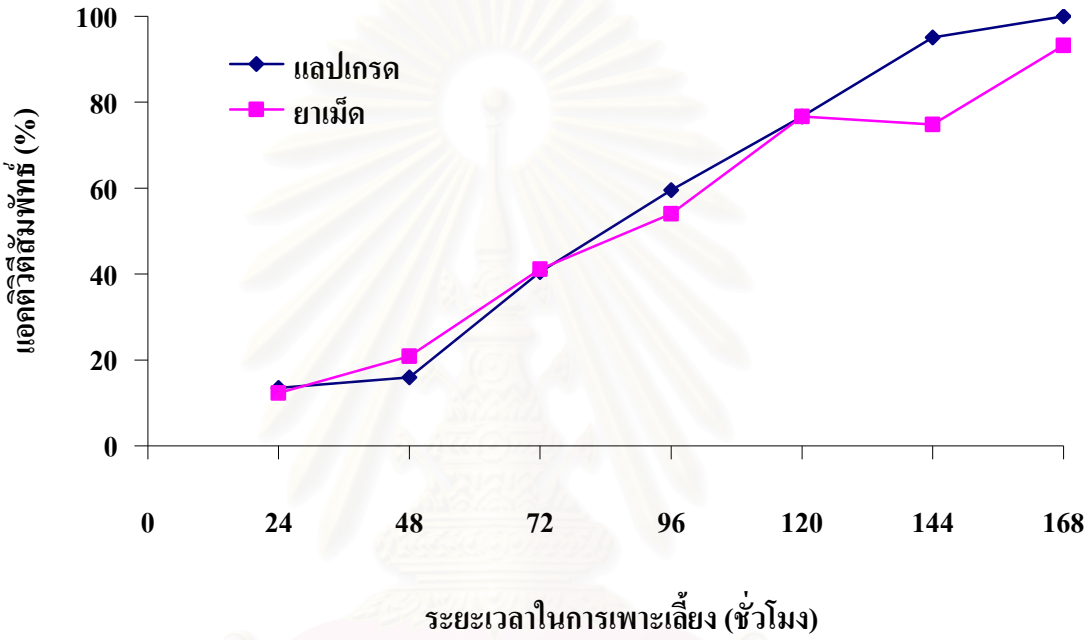
หลังจากทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่าแล้ว นำภาวะเบื้องต้นมาเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับถังหมัก แต่ก่อนที่จะทำการศึกษาในระดับถังหมัก ได้ทำการทดสอบแอมพิซิลินที่เป็นยาเม็ดสำหรับรับประทานกับแอมพิซิลินแบบแลปเกรด เนื่องจากเชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อโคลนซึ่งต้องใช้แอมพิซิลินเป็น stabilizer พลาสมิดที่มียีนไคทิเนสและในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักต้องใช้แอมพิซิลินเป็นจำนวนมาก จึงต้องหาแอมพิซิลินเกรดอื่นที่มีราคาถูกมาใช้แทน เพราะใช้แอมพิซิลินแบบแลปเกรด ซึ่งมีราคาแพงจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง จากการทดสอบ พบว่า แอมพิซิลินที่เป็นยาเม็ดสำหรับรับประทานเชื้อโคลน Chi60 สามารถผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีไม่แตกต่างจากแอมพิซิลินแบบแลปเกรดมากนัก (รูปที่ 3.3) ดังนั้นจึงนำแอมพิซิลินที่เป็นยาเม็ดมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อโคลน Chi60 ในระดับถังหมักต่อไป

ในระดับถังหมักทำการศึกษาปัจจัยของอากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด โดยพิจารณาที่ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (Dissolved oxygen concentration: DO) ซึ่งจากการศึกษา DO ต่างๆ ต่อการผลิตไคทิเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการให้อากาศและควบคุมการปั่นกวนให้คงที่ที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อโคลน Chi60 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเชื้อโคลน Chi60 มีการเจริญเติบโตลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่แอคติวิตีของไคทิเนสค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการผลิตไคทิเนสสูงสุดที่ DO 2.5% และเมื่อเพิ่ม DO มากขึ้นเป็น 5.0% ทำให้แอคติวิตีไคทิเนสลดลง ทั้งที่มีจำนวนเซลล์เท่าๆ กัน (รูปที่ 3.4) และเมื่อเทียบแอคติวิตีไคทิเนสของเชื้อโคลน



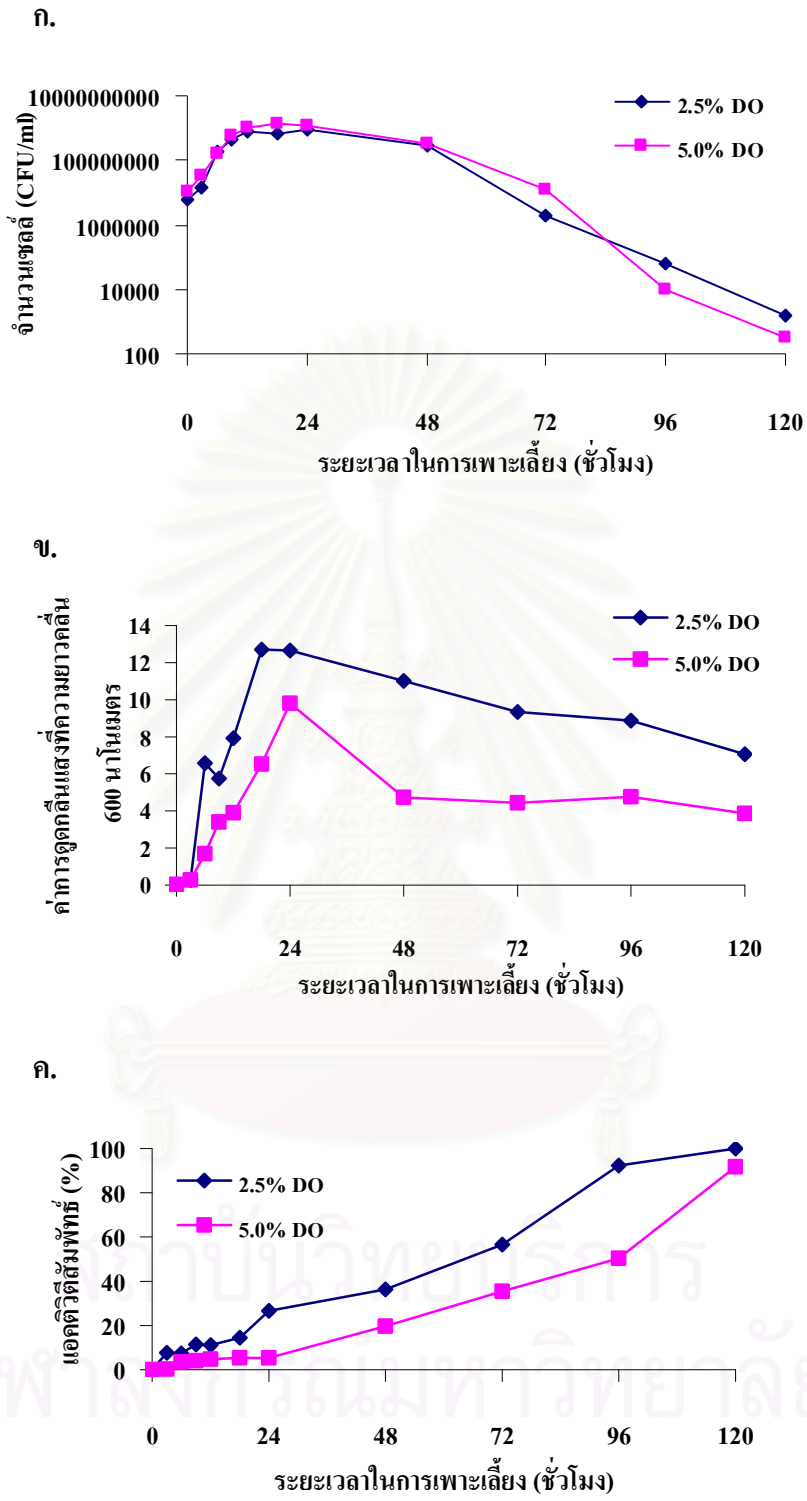

**รูปที่ 3.2** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 µg/ml. ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 40% ที่ความเร็วในการเขย่าต่างๆ คือ 150, 250 และ 350 รอบต่อนาที บ่มที่ 37 °C (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.390 U/ml.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 3.3** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 40% บ่มที่ 37 ˚C, เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่มีแอมพิซิลลินแบบแลปเกรดและแอมพิซิลินที่เป็นยาเม็ดสำหรับรับประทาน 100 µg/ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 3.4** ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่ DO ต่างๆ คือ 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยรูป ก. คือ จำนวนเซลล์ (CFU/ml) รูป ข. คือ OD 600 nm และรูป ค. คือ แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.316 U/ml.)

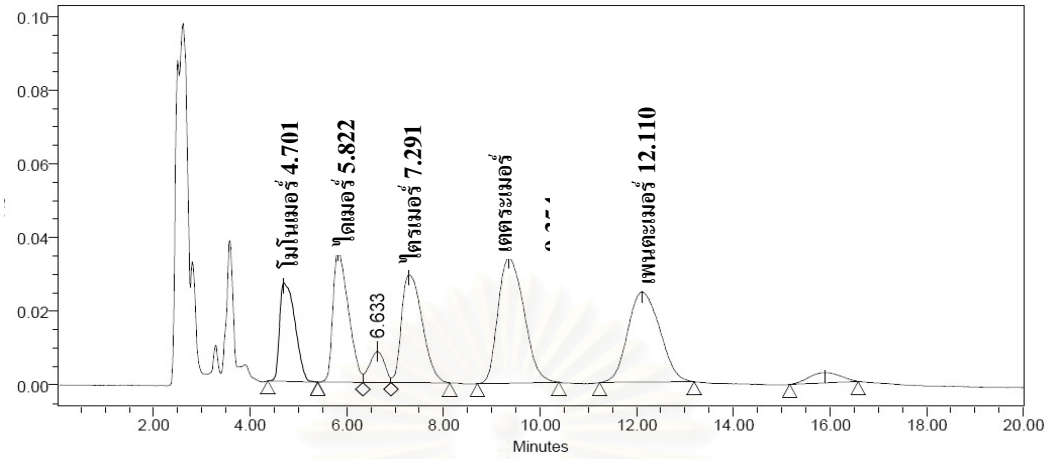
Chi60 ในระดับถังหมักที่ DO 2.5% กับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า พบว่า ในระดับถังหมักที่ DO 2.5% มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากระดับขวดเขย่าประมาณ 50%

**ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)**

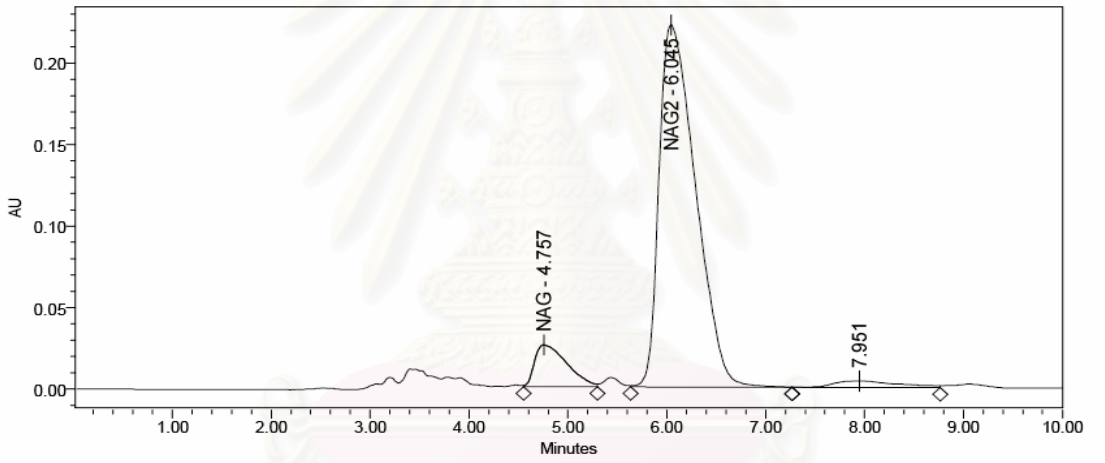
เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ เช่น สับสเตรทที่เป็น amorphous chitin ได้แก่ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารมาตรฐานเป็น เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ พบว่า ไคทิเนสจาก Chi60 สามารถย่อยสับสเตรทที่เป็น amorphous chitin คือ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin คือ ไคทินกุ้ง ไคทินแกนหมึก และเปลือกกุ้ง ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ ไดเมอร์ นอกจากนี้ยังพบมอนอเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์รองด้วยเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทินและไคทินแกนหมึก โดยเชื้อโคลน Chi60 ให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก ไคทินจากกุ้ง และเปลือกกุ้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

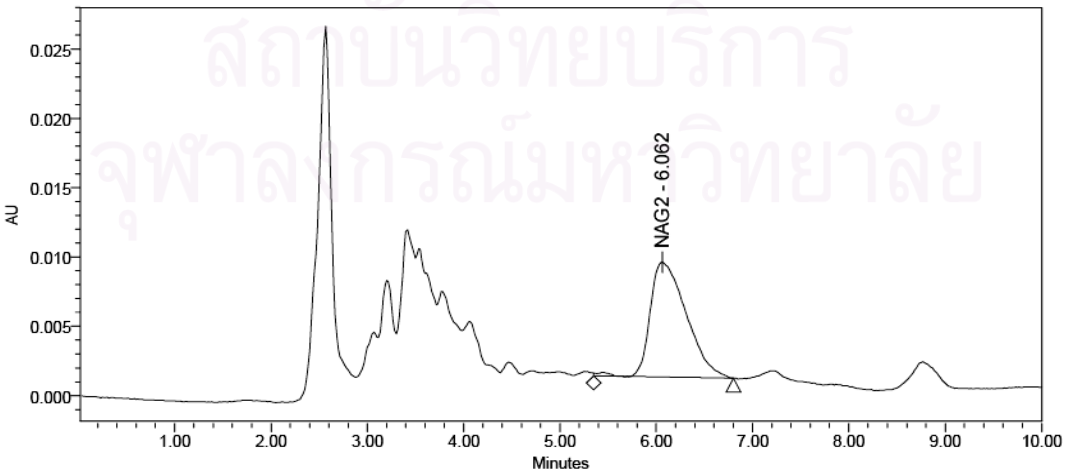
ก. สารมาตรฐานพอลิเมอร์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ




ข. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย CC ด้วยไคทิเนสจาก Chi60

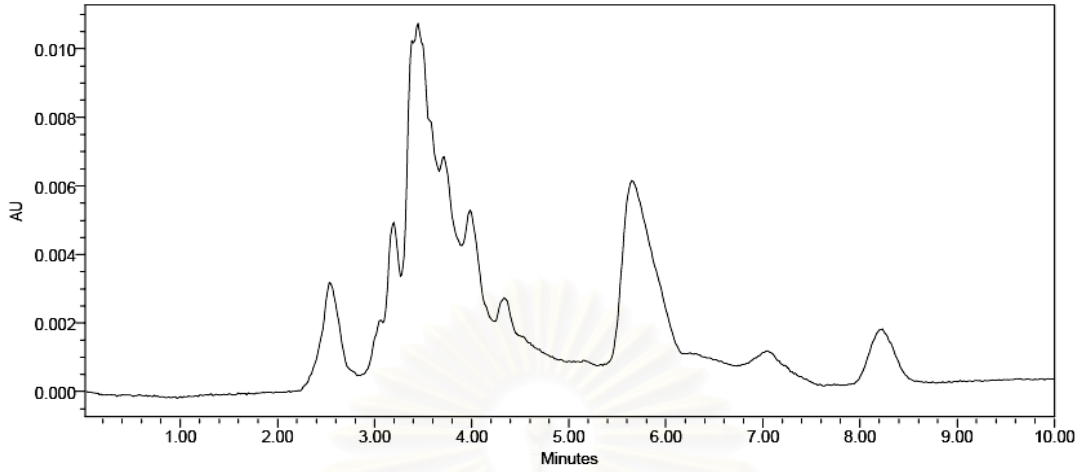



ค. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินกุ้งด้วยไคทิเนสจาก Chi60

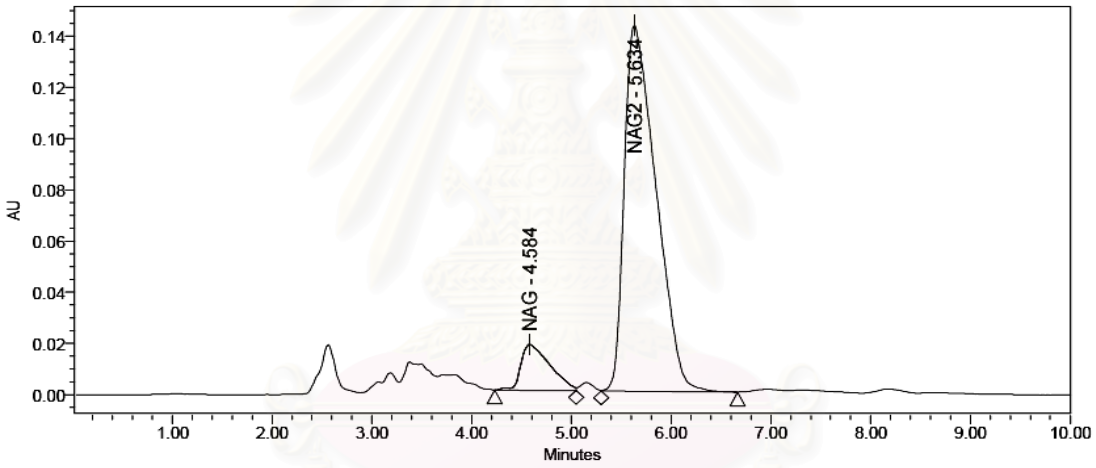



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

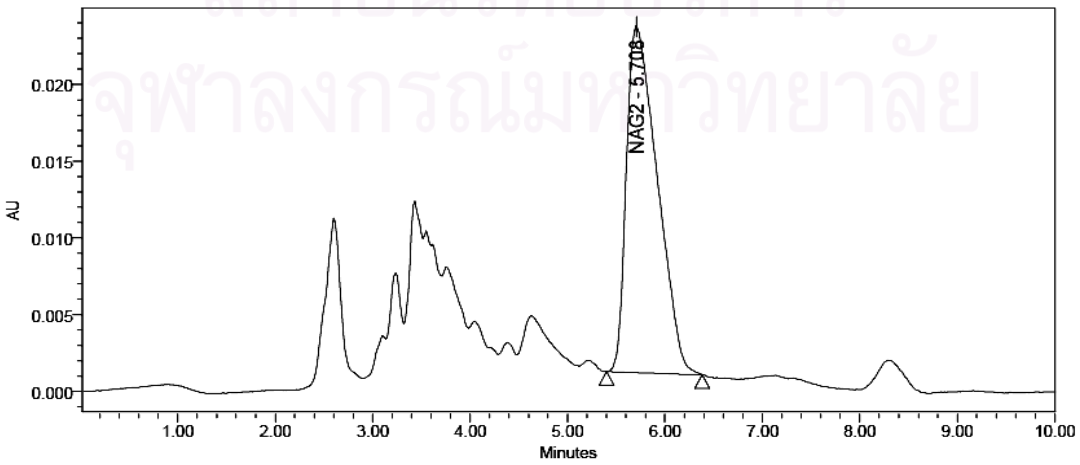
ง. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินปูด้วยไคทิเนสจาก Chi60




จ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก Chi60

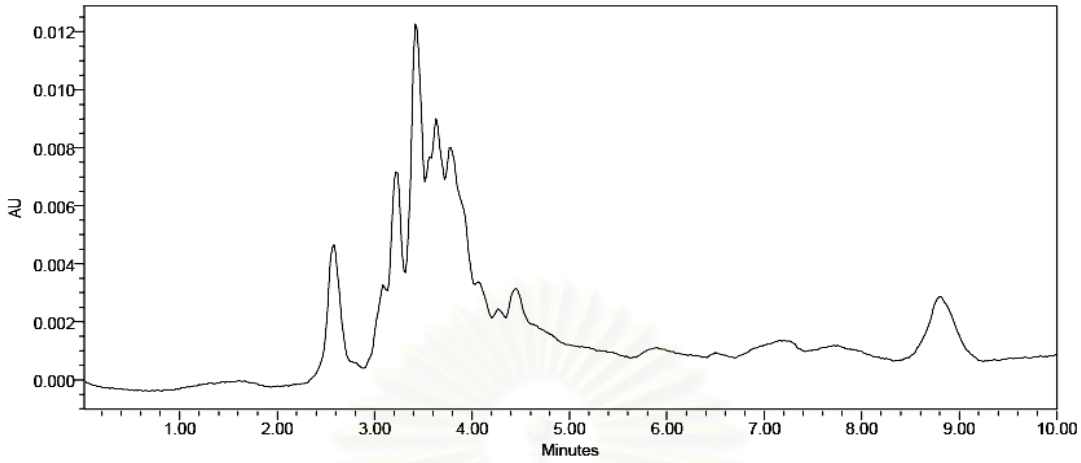



ฉ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกกุ้งด้วยไคทิเนสจาก Chi60

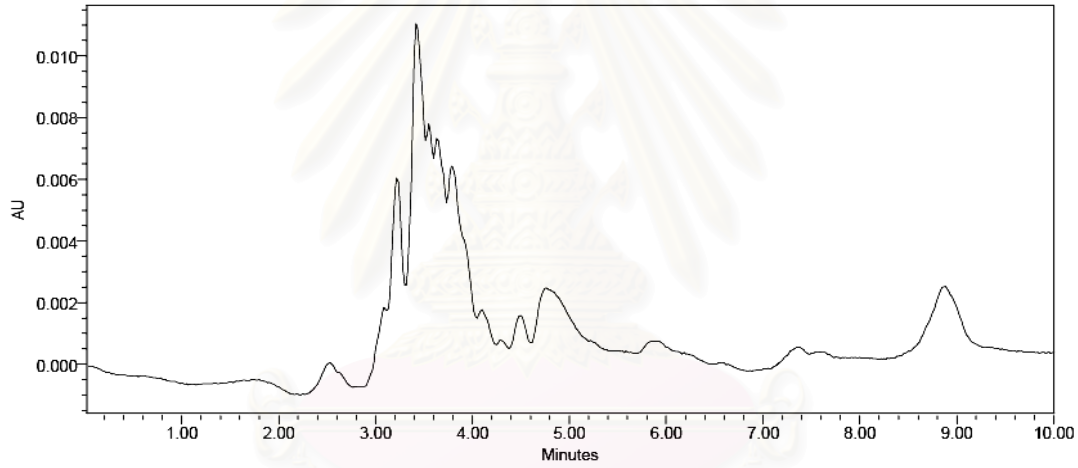



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกปูด้วยไคทิเนสจาก Chi60




ซ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก Chi60




**รูปที่ 3.5** ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก Chi60 ที่ผลิตได้และซึ่งนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดย

รูป ก. คือ สารมาตรฐานพอลิเมอร์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ

รูป ข. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย CC ด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป ค. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินกุ้งด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป ง. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินปูด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป จ. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป ฉ. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกกุ้งด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป ช. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกปูด้วยไคทิเนสจาก Chi60

รูป ซ. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก Chi60

***Aeromonas caviae* D6**

**ลักษณะของเชื้อ D6**

เชื้อ D6 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกดินที่จังหวัดนครปฐม (จากห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร) ที่มีไคทิเนสแอคติวิตีสูงและให้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยไคทินเป็นมอนอเมอร์อย่างเดียว และพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยวิธีชีวเคมีและซีโรโลยี (Biochemical และ Zerology) โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่า เป็น *Aeromonas caviae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะโคโลนีกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล (รูปที่3.6)

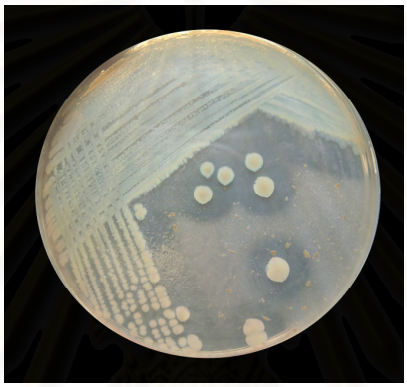
**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับขวดเขย่า**

เนื่องจาก *A. caviae* D6 เป็นเชื้อจากห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร ได้ทำการคัดแยกไว้ ดังนั้นจึงนำ *A. caviae* D6 มาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส โดยจะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไคทิเนส เช่น อากาศ ส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ

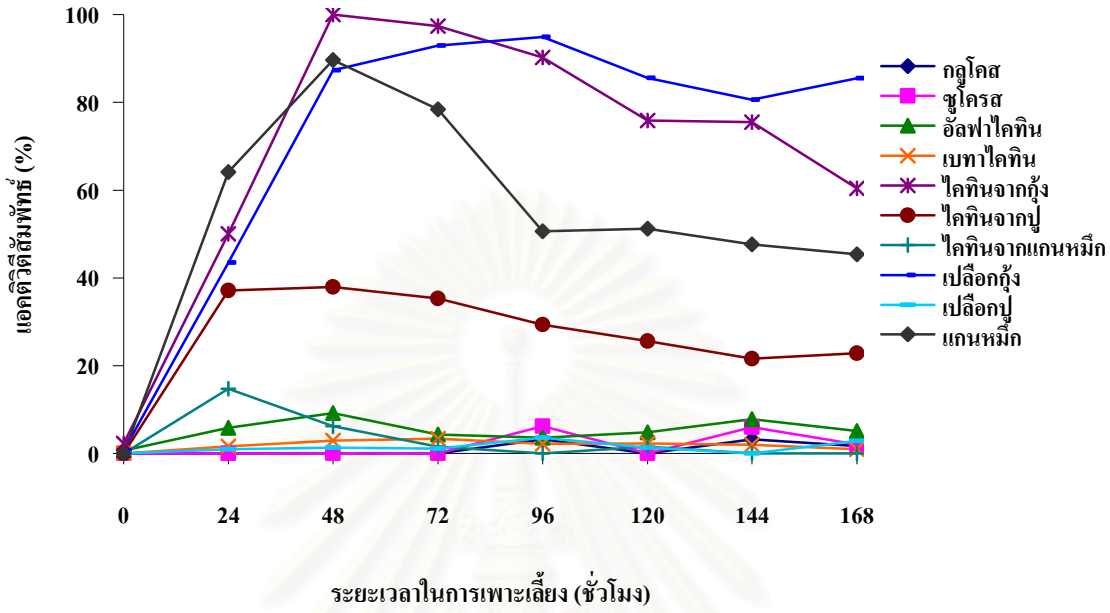
**ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน เป็นการศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่สามารถชักนำการผลิตไคทิเนสให้ได้แอคติวิตีมากที่สุด โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียดแล้ว จากการศึกษา พบว่า กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินแกนหมึก และเปลือกปู ที่ปั่นละเอียดแล้ว มีการผลิตไคทิเนสน้อยมาก ในขณะที่ไคทินกุ้ง ไคทินปู เปลือกกุ้ง และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียดแล้ว สามารถชักนำให้ *A. caviae* D6 ผลิตไคทิเนสได้ ซึ่งมีแนวโน้มของการผลิตไคทิเนสเหมือนกัน คือ มีการผลิตไคทิเนสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรก หลังจากนั้นการผลิตไคทิเนสค่อนข้างคงที่ และมีการผลิตลดลงบ้างเล็กน้อยโดยไคทิเนส



**รูปที่ 3.6** โคโลนีของเชื้อ *A. caviae* D6 ที่มีวงใสรอบโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCMM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่ 3.7** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 40 เปอร์เซ็นต์ ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 1 เปอร์เซ็นต์ คือ กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียดแล้ว บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.090 U/ml.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จาก *A. caviae* D6 จะมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ไคทินกุ้งและเปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยง (ดังรูป 3.7)

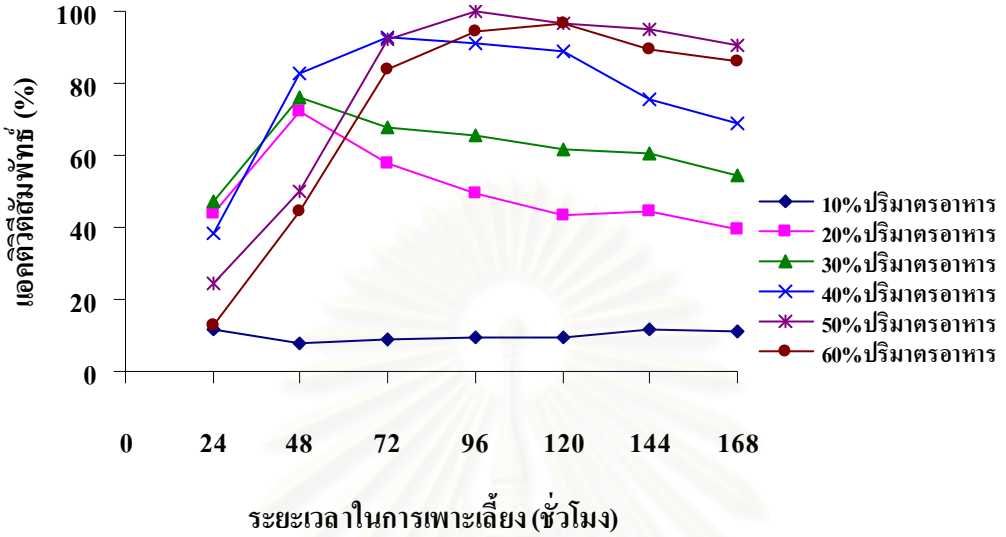
**ผลการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าต่อการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

ในการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำ และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำ จากผลการทดลองชนิดของแหล่งคาร์บอนข้างต้น แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถชักนำไคทิเนสได้แอคติวิตีสูงสุด และในการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า พบว่าในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดแหล่งคาร์บอน ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 50% มีแอคติวิตีไคทิเนสสูงสุด และแอคติวิตีของไคทิเนสลดลงตามปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ลดลง แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่ามากกว่า 50% แอคติวิตีไคทิเนสลดลงด้วย และเมื่อเลี้ยง *A. caviae* D6 ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตไคทิเนสให้ผลตรงกันข้ามกับในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียด ซึ่งจะเห็นว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 10% การผลิตไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด และการผลิตไคทิเนสลดลงเมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า จากผลการทดลองข้างต้นเห็นว่าถ้าใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดชักนำให้ *A. caviae* D6 ผลิตไคทิเนสจะใช้ปริมาณอากาศน้อยกว่าการใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียดชักนำให้ *A. caviae* D6 ผลิตไคทิเนส (ดังรูป 3.8)

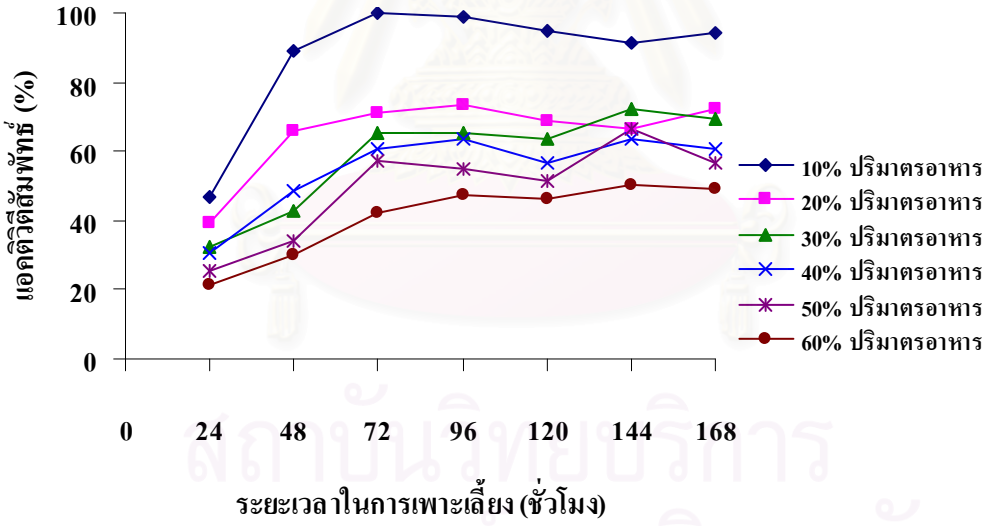
**ผลการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

จากผลการศึกษาข้างต้น จึงศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดที่ 50% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดที่ 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า ในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% เมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนไคทิเนสมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น โดยมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ 2.0 % ของไคทินกุ้งปั่นละเอียด และแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนมากกว่า 2% และอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดใน 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตไคทิเนสมีแนวโน้มเหมือนกับในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียด แต่แอคติวิตีไคทิเนสไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากกว่า 1.5% โดยการผลิตไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียด (ดังรูป 3.9)

ก.

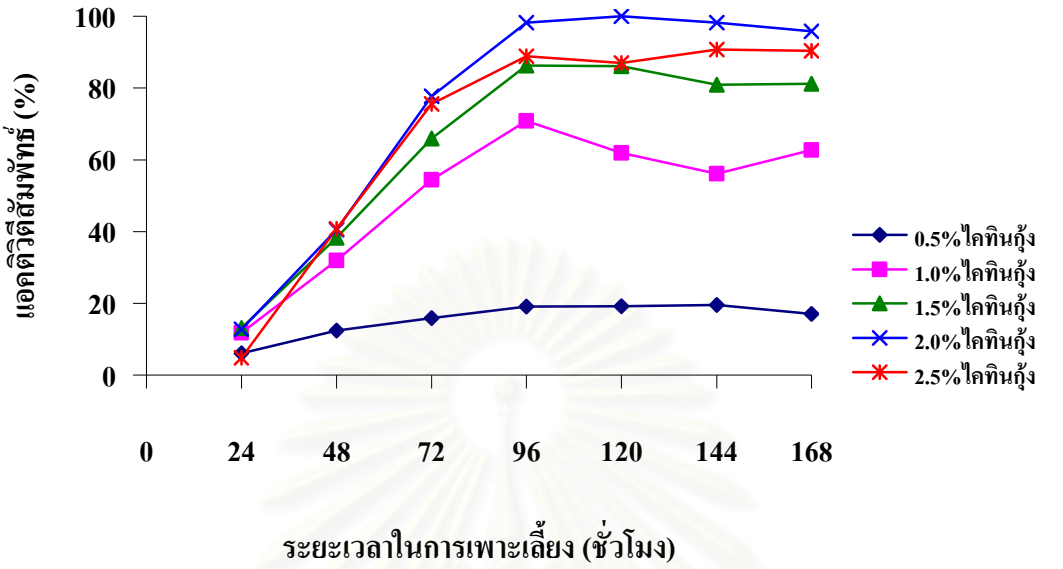



ข.

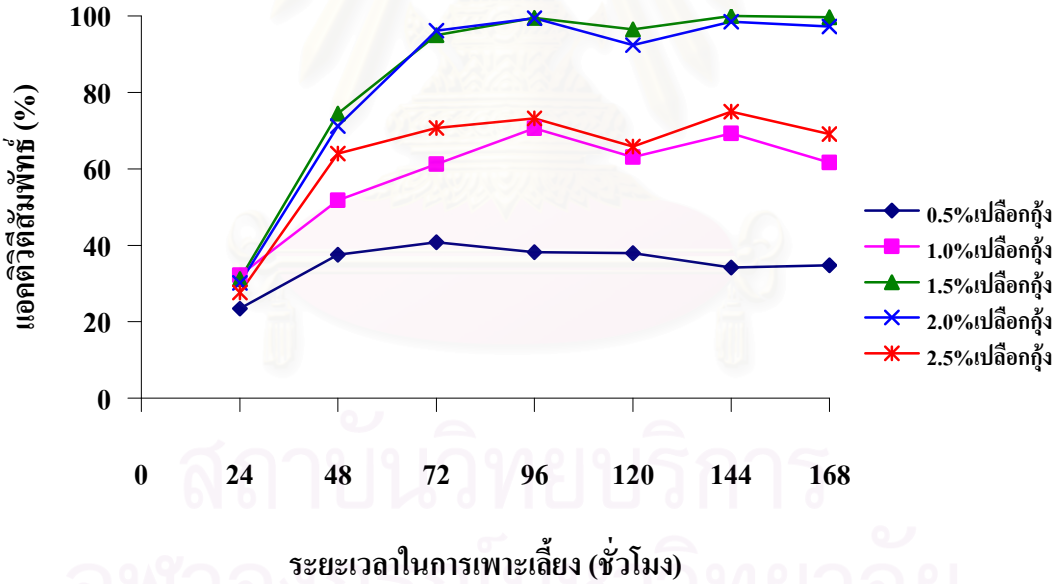



**รูปที่ 3.8** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ในอาหารที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) อาหารที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.110 U/ml.) รูป ข) อาหารที่มี 1 เปอร์เซ็นต์เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.124 U/ml.)

ก.




ข.




**รูปที่ 3.9** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) อาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.235 U/ml.) รูป ข) อาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.194 U/ml.)

**ผลการศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

ในการศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสทำการศึกษาในภาวะที่ได้ศึกษาข้างต้น คือ อาหารที่มี 2% ไคทินกุ้งปั่นละเอียดในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 50% และอาหารที่มี 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียดใน 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาปริมาณของ yeast extract พบว่า ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการผลิตไคทิเนสเหมือนกัน คือ ปริมาณ yeast extract ที่ 0.25 % ไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด และจะมีแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของ yeast extract และถ้าให้ปริมาณ yeast extract น้อยกว่า 0.25 % แอคติวิตีของไคทิเนสก็จะลดลง (ดังรูป 3.10)

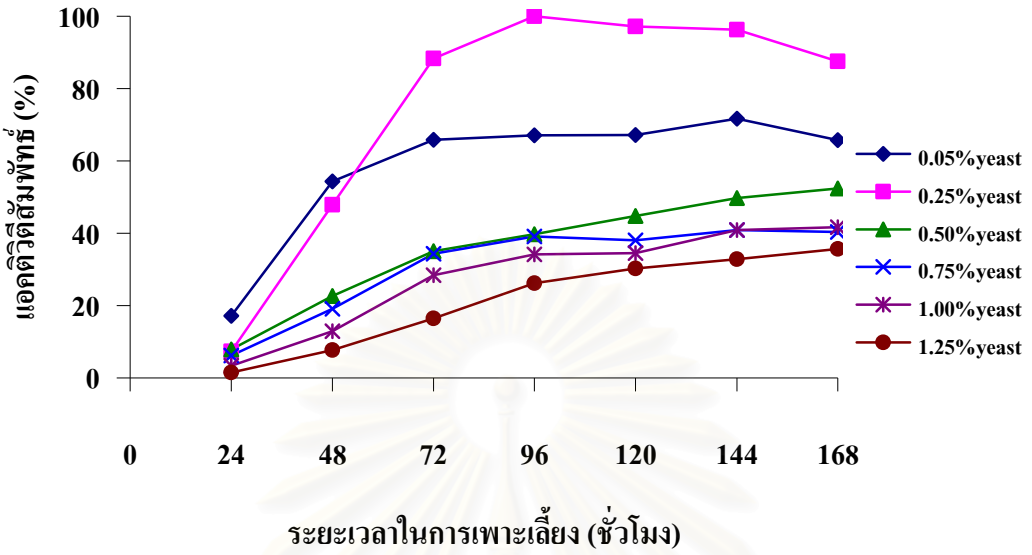
**ผลการศึกษาปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6**

ในการศึกษาผลของแร่ธาตุต่างๆ ต่อการผลิตไคทิเนส ซึ่งแร่ธาตุที่ใช้ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca และ Cu โดยทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังที่ได้ทำการศึกษาไว้ข้างต้น คือ อาหารที่ใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนส ใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียด 2% ที่มี 0.25% yeast extract ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 50% และอาหารที่ใช้เปลือกกุ้งเป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนส ใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียด 1.5% ที่มี 0.25% yeast extract ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 10% ในการศึกษาทำการใส่แร่ธาตุ 2 ความเข้มข้น คือ 0.001% และ 0.01% จากการทดลอง พบว่า แร่ธาตุมีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนสน้อยมาก ยกเว้น 0.01% Cu มีไคทิเนสแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3.11)

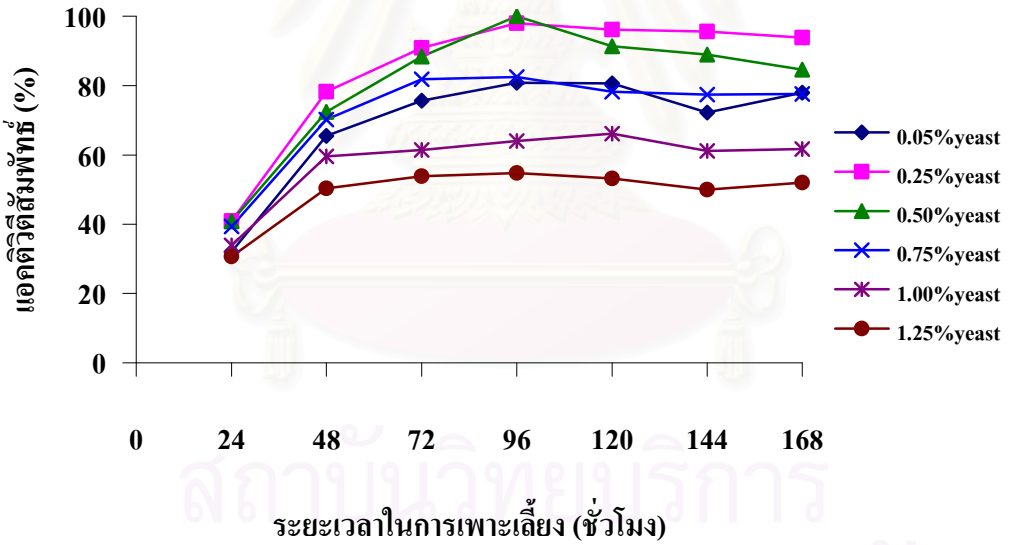
**ผลการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับถังหมัก**

หลังจากทำการหาภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าแล้ว ก็นำภาวะเบื้องต้นมาเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับถังหมัก โดยในระดับถังหมักจะเลือกใช้ภาวะในการใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำ คือใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียด 1.5% ที่มี 0.25% yeast extract ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 10% เนื่องจากเป็นการนำของเสียมาเพิ่มคุณค่าให้เกิดประโยชน์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตไคทิเนสถูกกว่าถ้าเลือกใช้ไคทิน ซึ่งเป็นการนำเปลือกกุ้งมาผ่านกระบวนการแปรรูปให้เป็นไคทินก่อน โดยระดับถังหมักทำการศึกษาถึงผลของ DO ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักและจากการศึกษาความเข้มข้นของออกซิเจนต่อการเจริญ

ก.

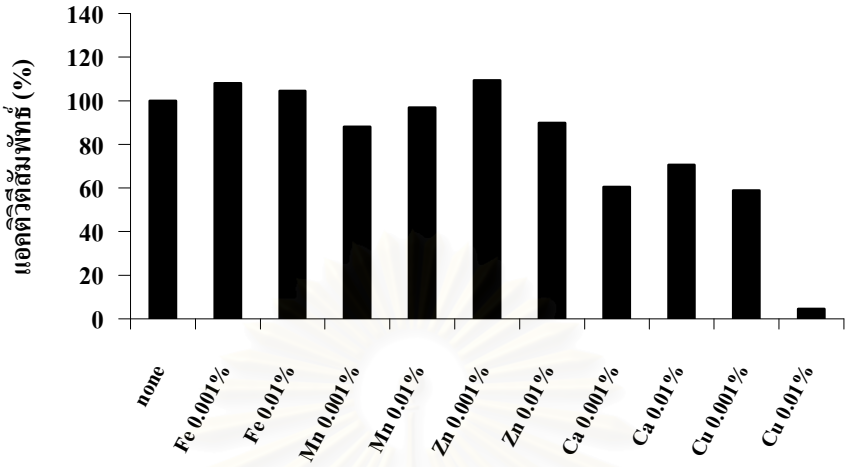



ข.

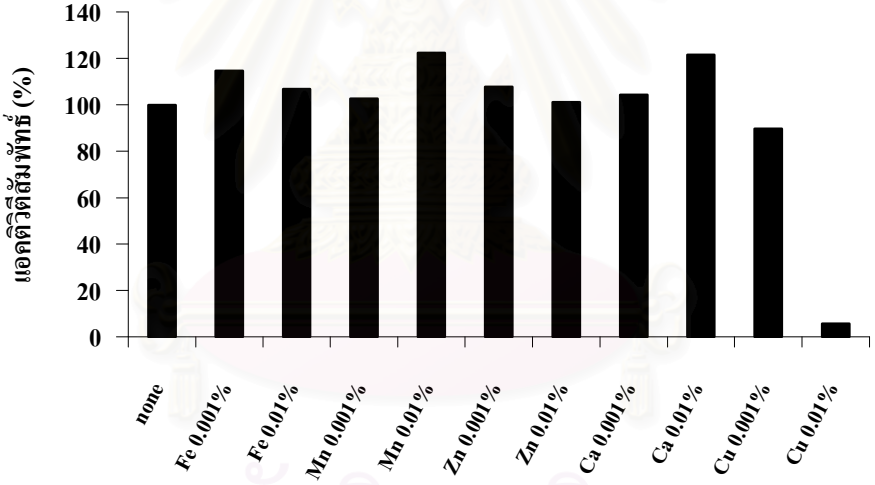



**รูปที่ 3.10** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีปริมาณของ yeast extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ คือ 0.05, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) อาหารที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 0.381 U/ml.) รูป ข) อาหารที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.382 U/ml.)

ก.

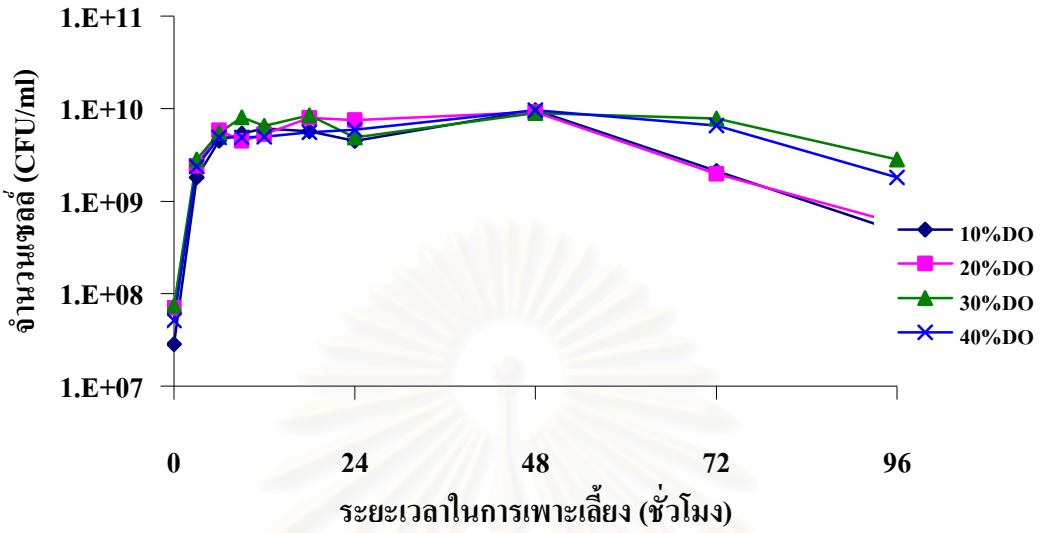



ข.

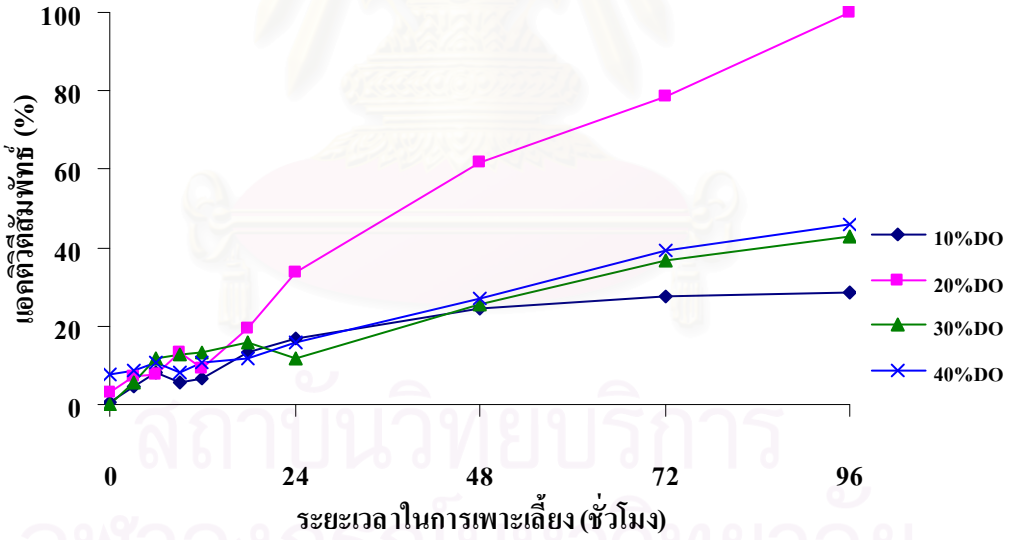



**รูปที่ 3.11** ลักษณะการผลิตไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มีแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca, Cu บ่มที่ 37 ˚C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) อาหารที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.368 U/ml.) รูป ข) อาหารที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.369 U/ml.)

ก.




ข.




**รูปที่ 3.12** ลักษณะการเจริญและลักษณะการผลิตไคทิเนสของ *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ DO ต่างๆ คือ 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยรูป ก. คือ จำนวนเซลล์ (CFU/ml) รูป ข. คือ แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.312 U/ml.)

เติบโตของเชื้อและการผลิตไคทิเนสที่ DO ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการปั่นกวนระหว่าง 100-300 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศให้คงที่ที่ 0.5 vvm พบว่า ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อที่ DO ต่างๆ คล้ายกัน คือ เชื้อมีการเจริญเติบโตของอย่างรวดเร็วใน 18 ชั่วโมงแรก และการเจริญเติบโตเริ่มคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมง ส่วนการผลิตไคทิเนสมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย คือ การผลิตไคทิเนสที่ DO 10, 30 และ 40% มีลักษณะการผลิตคล้ายกัน คือมีการผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและเริ่มคงที่เมื่อชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่ DO 20% การผลิตไคทิเนสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย DO ที่ 20% มีการผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุด (รูปที่ 3.12)

**ผลการศึกษาคุณสมบัติและลักษณะบางประการของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6**

หลังจากศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A. caviae* D6 แล้วนำไคทิเนสที่ผลิตได้จากไคทินกุ้งปั่นละเอียด และเปลือกกุ้งปั่นละเอียด มาทำการศึกษาลักษณะสมบัติของไคทิเนสต่างๆ ดังนี้

**ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6**

เมื่อนำไคทิเนสหยาบที่ผลิตได้มาหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไคทิเนสที่ผลิตจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียด และเปลือกกุ้งปั่นละเอียด ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง คือ ตั้งแต่ pH 5 -10 โดยทำงานได้ดีที่สุดใน Tris-HCl buffer pH 7 (ดังรูป 3.13)

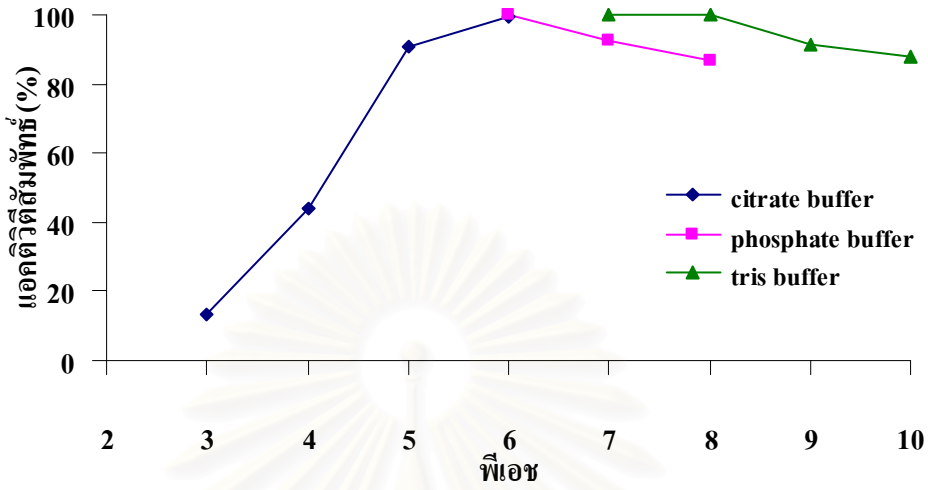
**ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6**

เมื่อนำไคทิเนสหยาบที่ผลิตได้มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าไคทิเนสที่ผลิตจาก *A. caviae* D6 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C (ดังรูปที่ 3.14)

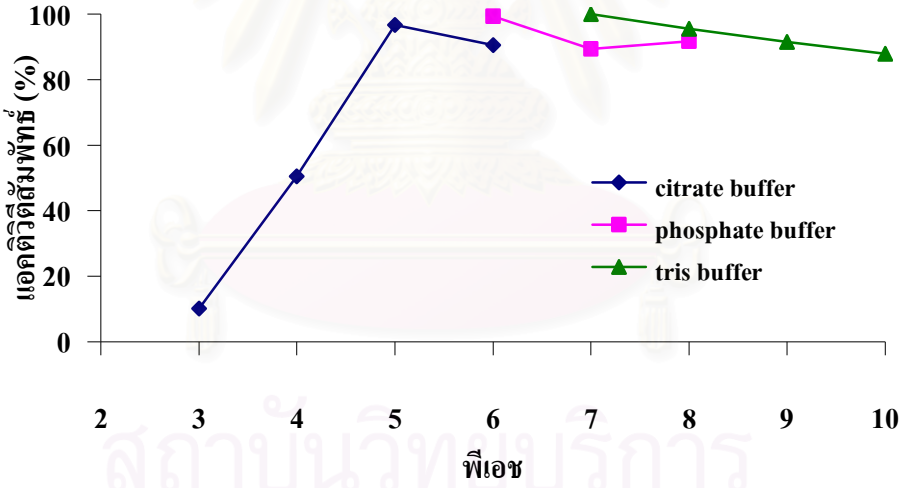
**ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6**

เมื่อนำไคทิเนสหยาบที่ผลิตได้มาย่อยไคทินชนิดต่างๆ ได้แก่ PNAC (Partially-*N*-acetylated chitin) คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ผงไคทินปู ไคทินกุ้ง ไคทินจากปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ปั่นละเอียด พบว่าไคทิเนสที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียดและเปลือกกุ้งปั่นละเอียด ต่างย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ คอลลอยดอลไคทิน และเบทาไคทิน ตามลำดับ (ดังรูปที่ 3.15)

ก.

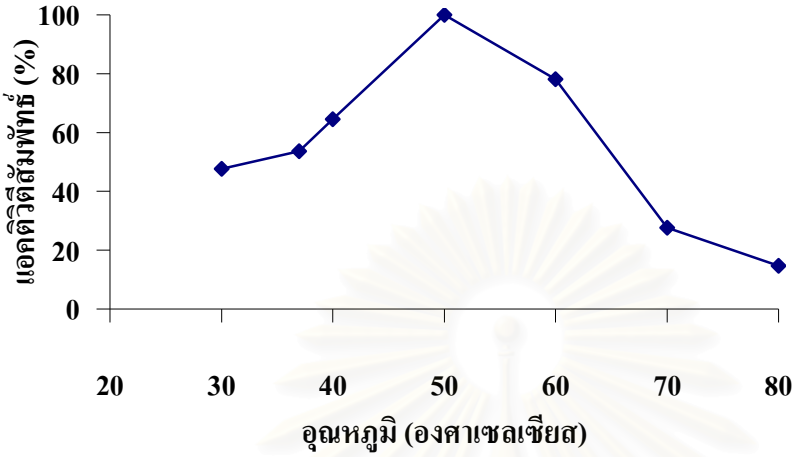



ข.

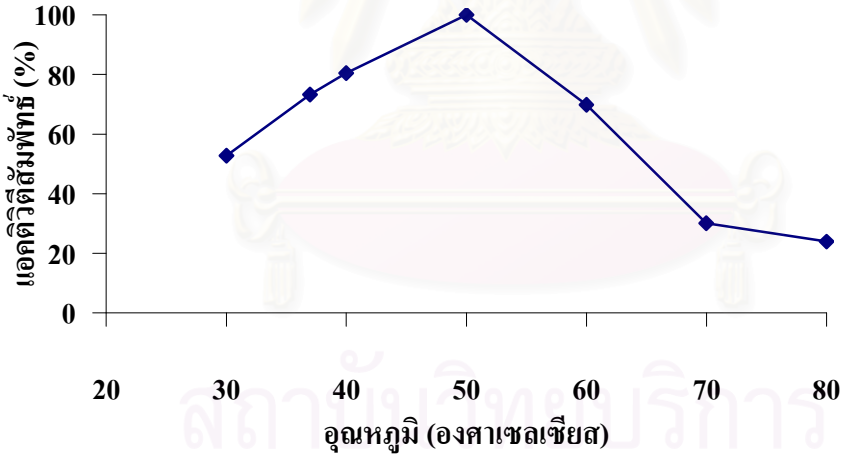



**รูปที่ 3.13** pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.224 U/ml.) รูป ข) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.234 U/ml.)

ก.

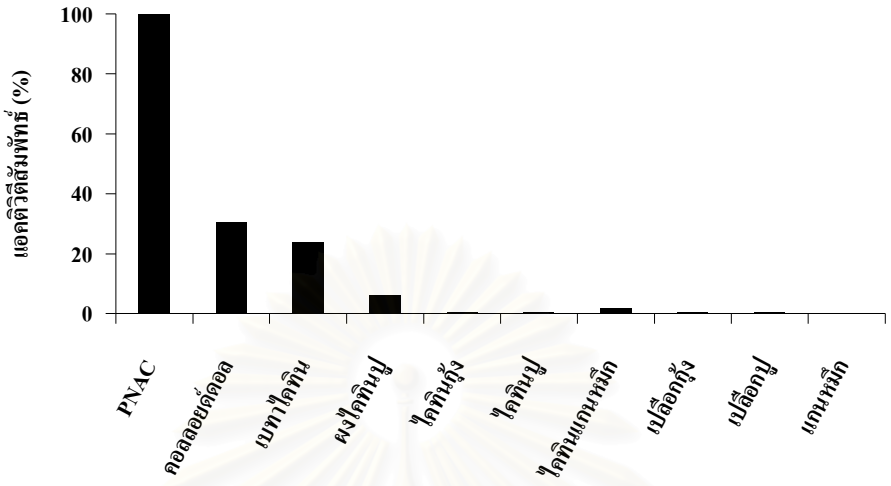



ข.

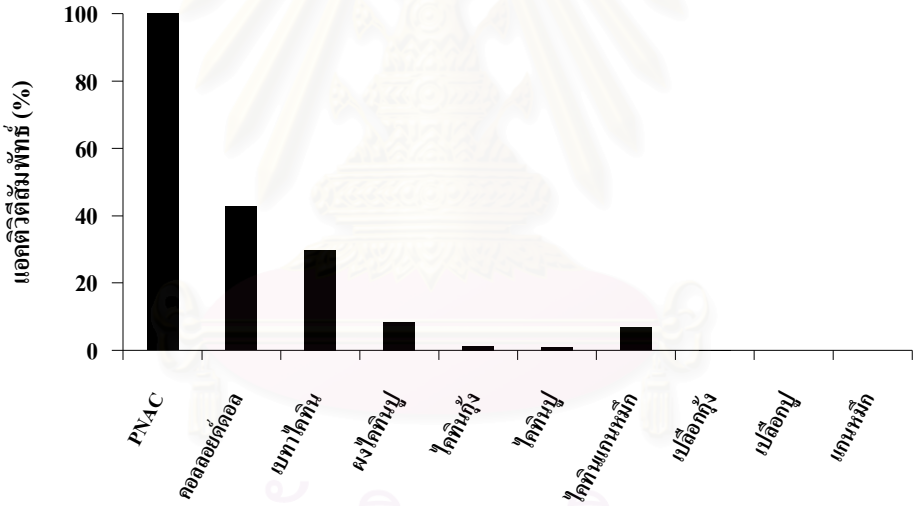



**รูปที่ 3.14** อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM บ่มที่ 37 °C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.404 U/ml.) รูป ข) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.331 U/ml.)

ก.

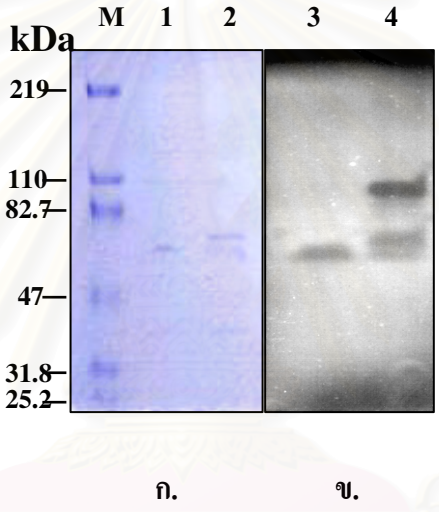



ข.




สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**รูปที่ 3.15** ความจำเพาะต่อสับสเตรทของไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM บ่มที่ 37 ˚C, เขย่า 250 รอบต่อนาที รูป ก) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.328 U/ml.) รูป ข) ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า (100 เปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เท่ากับ 2.066 U/ml.)




**รูปที่ 3.16** SDS-PAGE แสดงไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM รูป ก) ย้อมโปรตีน รูป ข) ย้อมแอคติวิตี

แถว 1,3 ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มี 2 % ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 50 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า

แถว 2,4 ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่มี 1.5 % เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน ใน 10 % ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า

**ผลการหาขนาดโมเลกุลของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6**

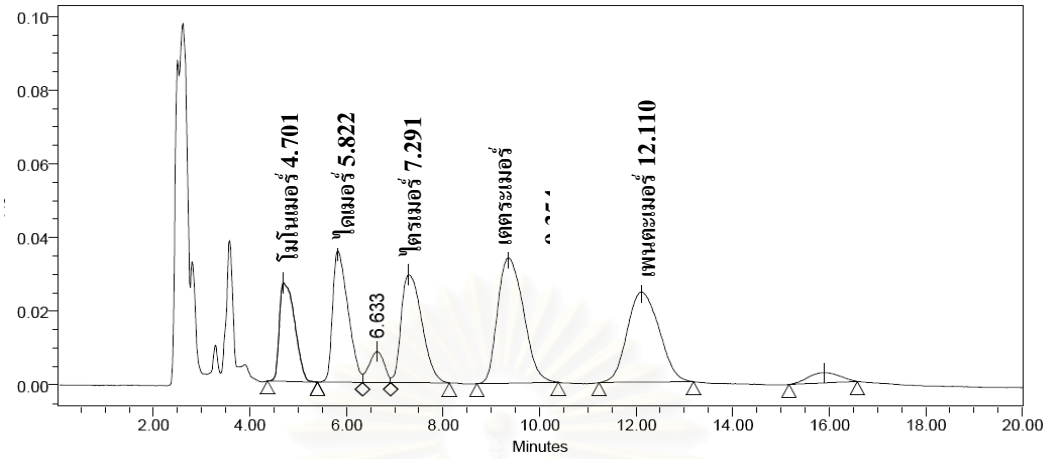
จากการนำน้ำเลี้ยง *A.caviae* D6 มาแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตี พบว่าไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตี 1 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60 kDa และพบว่าไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยเปลือกกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตีอย่างน้อย 3 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60, 70 และ 90 kDa (ดังรูป3.16)

**ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6 ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)**

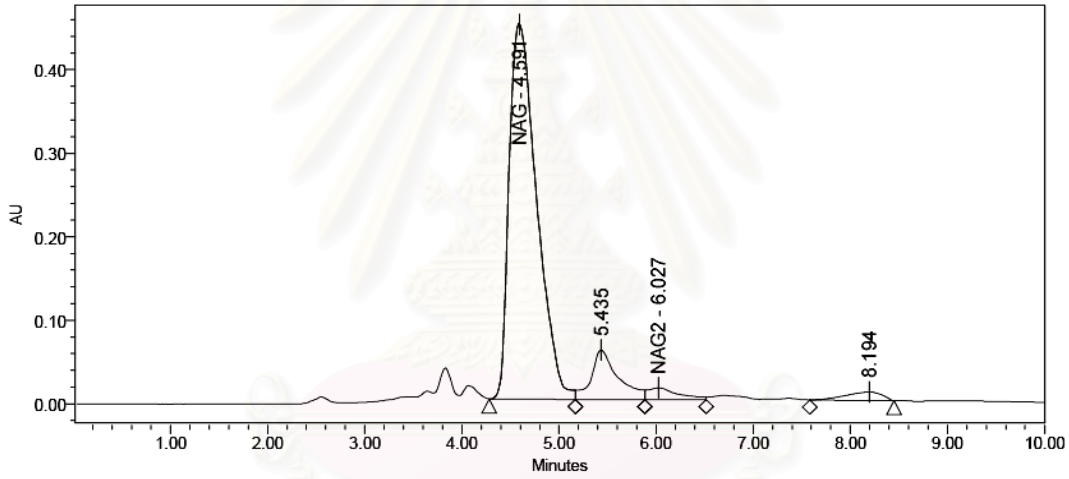
เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ เช่น สับสเตรทที่เป็น amorphous chitin ได้แก่ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารมาตรฐานเป็น เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ พบว่า พบว่า ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 สามารถย่อยสับสเตรทที่เป็น amorphous chitin คือ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin คือ ไคทินแกนหมึก ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ มอนอเมอร์ นอกจากนี้ยังพบไดเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์รองด้วย โดยจะได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อใช้คอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินจากหมึก (รูปที่ 3.17)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

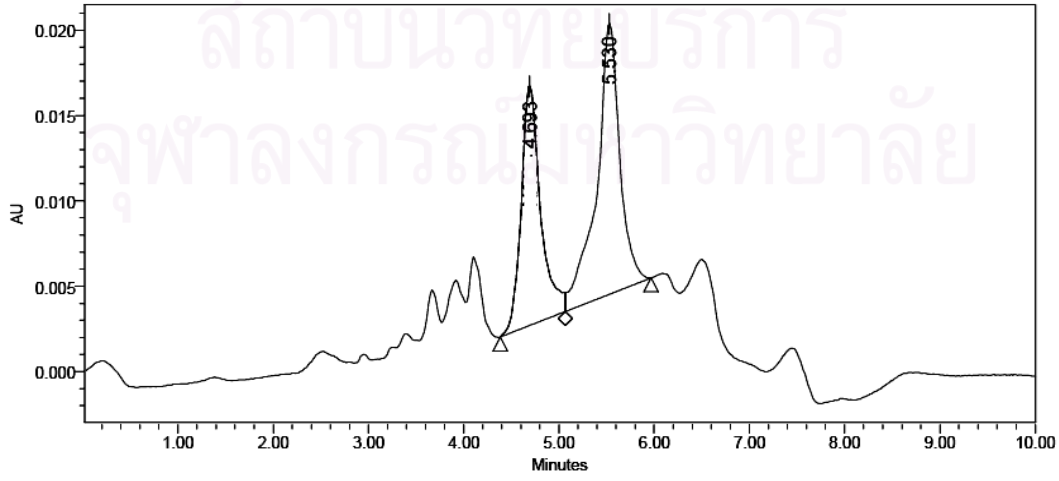
ก. สารมาตรฐานพอลิเมอร์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ



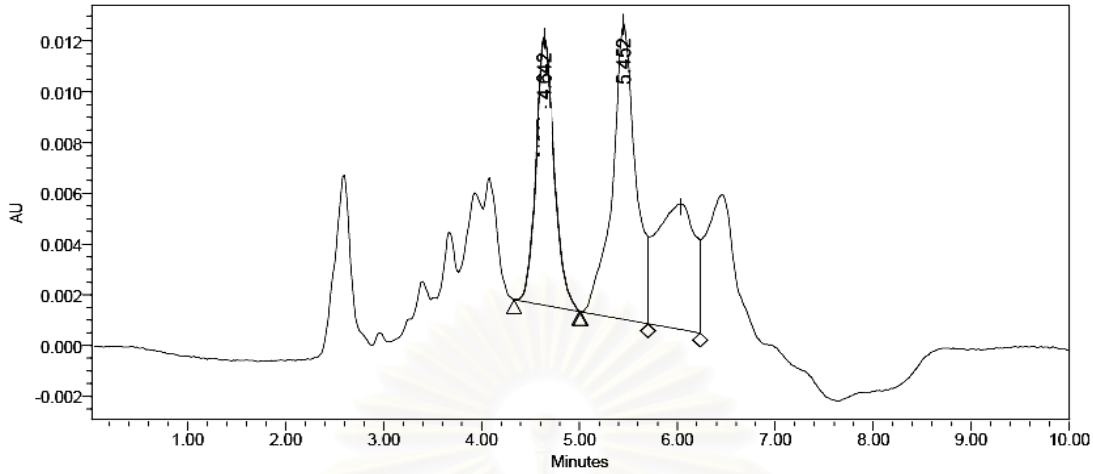

ข. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย CC ด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6



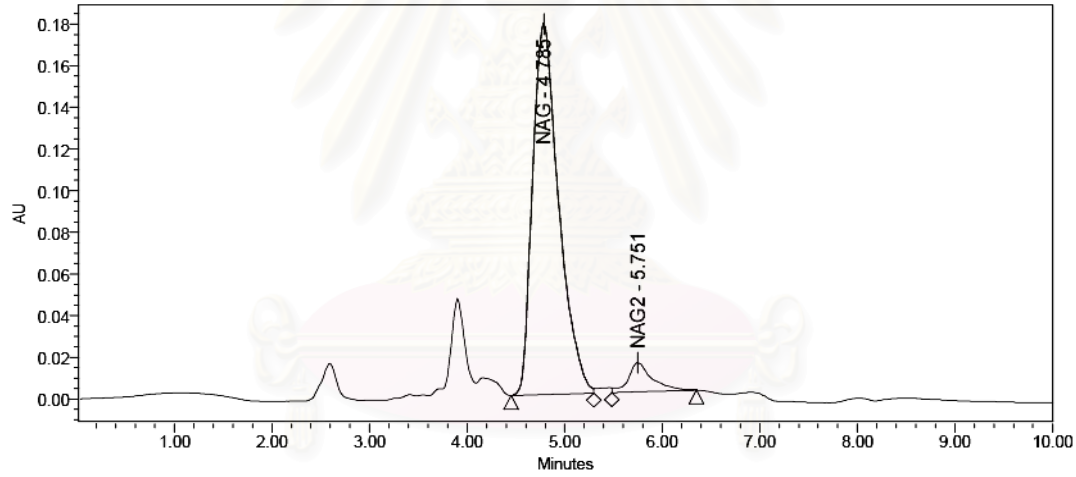

ค. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินกุ้งด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6



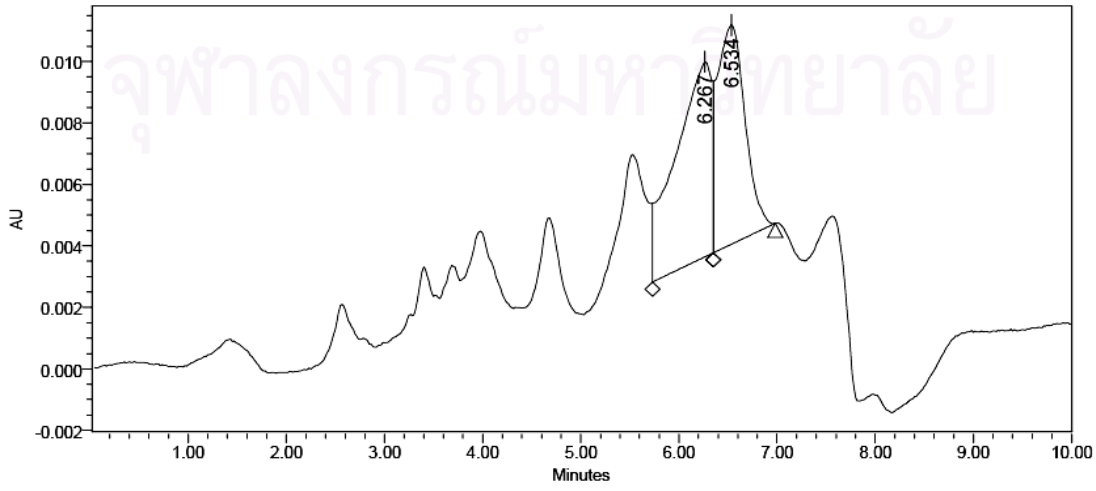
ง. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินปูด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6



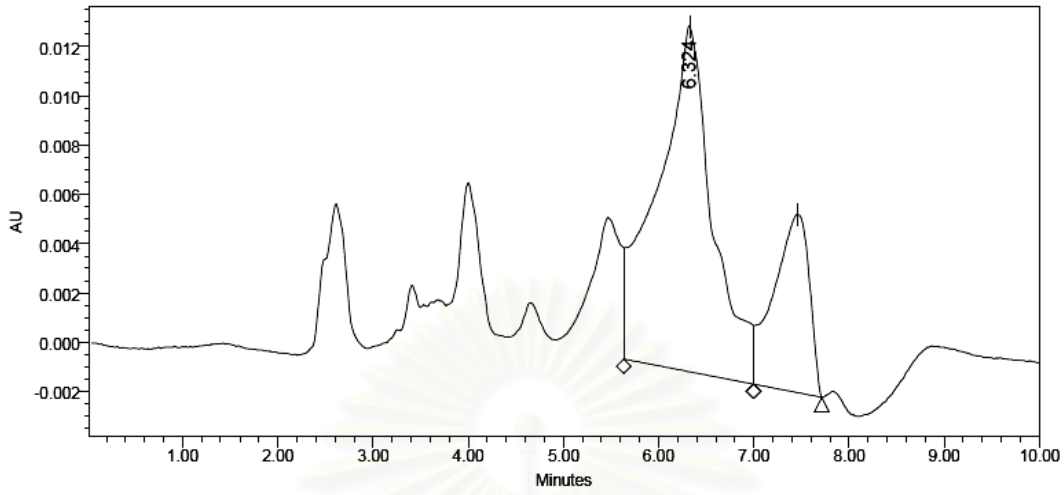

จ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6



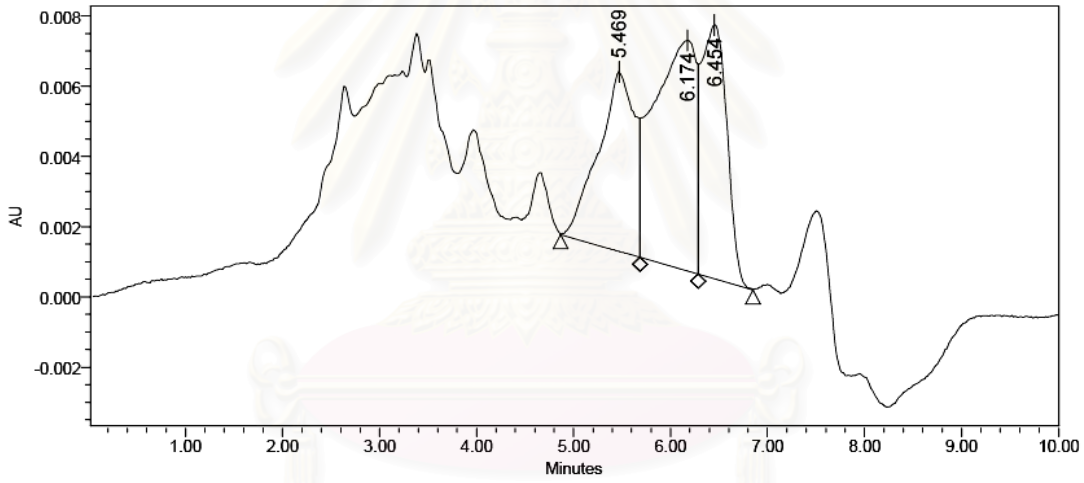

ฉ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกกุ้งด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6



ช. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกปูด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6




ซ. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6




**รูปที่ 3.17** ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคทินชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่ผลิตได้ และซึ่งนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดย

รูป ก. คือ สารมาตรฐานพอลิเมอร์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ

รูป ข. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อย CC ด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป ค. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินกุ้งด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป ง. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินปูด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป จ. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคทินแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป ฉ. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกกุ้งด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป ช. คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเปลือกปูด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

รูป . คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยแกนหมึกด้วยไคทิเนสจาก *A. caviae* D6

# บทที่ 4

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเชื้อโคลน Chi60 และเชื้อ *Aeromonas caviae* D6

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเชื้อโคลน Chi60**

เชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อที่ได้จากคุณกมลทิพย์ โดยการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp. TU09 ซึ่งโคลนด้วยวิธี shot gun cloning เข้าสู่ *E.coli* DH5$\alpha$ โดยใช้ pBluescriptSK$^-$ เป็นดีเอ็นเอพาหะ โดยได้มีการศึกษาภาวะในการเลี้ยงเบื้องต้นแล้ว พบว่าสามารถเจริญเติบโตและผลิตไคทิเนสได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และ LB ที่มี 0.02% คอลลอยดอลไคทิน ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนและเวลาในการเตรียมคอลลอยดอลไคทิน จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ LB มาใช้ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อไป โดยทำการศึกษาปัจจัยด้านอากาศเพิ่มเติม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าและความเร็วในการเขย่า

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับขวดเขย่า**

ในการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับขวดเขย่า ได้ศึกษาปัจจัยด้านอากาศเพิ่มเติม เพราะอากาศถือเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญต่อการเลี้ยงเชื้อ โดยทำการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า และศึกษาความเร็วในการเขย่า ซึ่งปัจจัยทั้ง 2 จะเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นว่าเชื้อต้องการปริมาณอากาศมากน้อยเพียงใดในการผลิตไคทิเนส และแสดงถึงการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) และแรงเฉือน (shear stress) ที่เกิดขึ้นต่อการผลิตไคทิเนส จากการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า และการศึกษาความเร็วในการเขย่า พบว่า ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 40% และความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ส่งผลให้ไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด ซึ่งจากการศึกษาเห็นว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 เป็นภาวะกลางๆ คือ เป็นภาวะที่มีปริมาณอากาศ การถ่ายเทมวลสาร และแรงเฉือนที่ไม่น้อยหรือมากเกินไปซึ่งพอเหมาะต่อการเจริญเติบโต และการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ขณะที่ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่ามากกว่า 40% หรือลดความเร็วในการเขย่าเหลือ 150 รอบต่อนาที ทั้งนี้อาจ

เป็นผลมาจากเมื่อปริมาตรของอาหารมากขึ้น ปริมาตรของอากาศภายในขวดรูปชมพู่ลดลงทำให้เชื้อได้ปริมาณอากาศ และสารอาหารที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 จึงเป็นผลให้เชื้อเจริญเติบโตและผลิตไคทิเนสได้ลดลง ในขณะเดียวกันถ้าลดปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่ำกว่า 20% หรือเพิ่มความเร็วในการเขย่าเป็น 350 รอบต่อนาที ก็ทำให้ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลงด้วย ทั้งที่มีปริมาณอากาศและการถ่ายเทมวลสารดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของแรงเฉือนที่มากขึ้นจึงทำให้ผนังเซลล์แตกหรือไคทิเนสเสียสภาพ จึงทำให้ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลง

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับถังหมัก**

หลังจากหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่าแล้ว จึงนำภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นมาเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับถังหมัก แต่ก่อนที่จะทำการศึกษาในระดับถังหมัก ได้ทำการทดสอบแอมพิซิลลินที่เป็นยาเม็ดสำหรับรับประทานกับแอมพิซิลลินแบบแลปเกรด เนื่องจากเชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อโคลนซึ่งต้องใช้แอมพิซิลลินเป็น stabilizer พลาสมิดที่มียีนไคทิเนสและในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักต้องใช้แอมพิซิลลินเป็นจำนวนมาก จึงต้องหาแอมพิซิลลินเกรดอื่นที่มีราคาถูกมาใช้แทน เพราะถ้าใช้แอมพิซิลลินแบบแลปเกรด ซึ่งมีราคาแพงจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง จากการทดสอบ พบว่า แอมพิซิลลินที่เป็นยาเม็ดเชื้อโคลน Chi60 ผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีไม่แตกต่างจากแอมพิซิลลินแบบแลปเกรดมากนัก ดังนั้นสามารถนำแอมพิซิลลินที่เป็นยาเม็ดมาใช้ในการเลี้ยงในระดับถังหมักได้

ในระดับถังหมักทำการศึกษาปัจจัยของอากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด โดยพิจารณาที่ค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำได้ (Dissolved oxygen concentration: DO) จากการศึกษา DO ต่างๆ ต่อการผลิตไคทิเนส เมื่อเลี้ยงเชื้อโคลน Chi60 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการให้อากาศและควบคุมการปั่นกวนให้คงที่ที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อโคลน Chi60 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเชื้อโคลน Chi60 มีการเจริญเติบโตลดลงเรื่อยๆ ในขณะที่แอคติวิตีของไคทิเนสค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการผลิตไคทิเนสสูงสุดที่ DO 2.5% และเมื่อเพิ่ม DO มากขึ้นเป็น 5.0% ทำให้แอคติวิตีไคทิเนสลดลง ทั้งที่มีจำนวนเซลล์เท่าๆ กัน อาจมีสาเหตุเดียวกับการศึกษาในระดับขวดเขย่า คือ เป็นผลของแรงเฉือนที่มากขึ้นจึงทำให้เซลล์แตกหรือไคทิเนสเสียสภาพ จึงทำให้ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลง จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก จะเห็นว่าแรงเฉือนมีผลต่อไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ค่อนข้างมาก ซึ่งพิจารณาได้จากการที่ในระดับขวดเขย่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสมีภาวะกลางๆ แต่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักค่อนข้างใช้อากาศน้อย และเมื่อเทียบแอคติวิตี

ไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 ในระดับถังหมักที่ DO 2.5% กับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า พบว่า ในระดับถังหมักที่ DO 2.5% มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นจากระดับขวดเขย่าประมาณ 50%

**การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)**

จากการนำไคทิเนสของเชื้อโคลน Chi60 มาย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ เช่น สับสเตรทที่เป็น amorphous chitin ได้แก่ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารมาตรฐานเป็น เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ พบว่า ไคทิเนสจาก Chi60 สามารถย่อยสับสเตรทที่เป็น amorphous chitin คือ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin คือ ไคทินกุ้ง ไคทินแกนหมึก และเปลือกกุ้ง ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ ไดเมอร์ นอกจากนี้ยังพบมอนอเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์รองเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทินและไคทินแกนหมึก โดยเชื้อโคลน Chi60 สามารถให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก ไคทินกุ้ง และเปลือกกุ้ง ตามลำดับ การที่ไคทิเนสจาก Chi60 สามารถย่อยคอลลอยดอลไคทินได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด เพราะคอลลอยดอลไคทินเป็น amorphous chitin มีการจัดเรียงตัวไม่แข็งแรงเหมือนสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ทำให้ไคทิเนสจาก Chi60 ย่อยคอลลอยดอลไคทินได้ง่ายกว่าสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin พบว่า ย่อยไคทินแกนหมึกและเบทาไคทินได้ดีกว่าไคทินกุ้งและเปลือกกุ้ง ทั้งนี้เป็นเพราะไคทินแกนหมึกและเบทาไคทินมีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแบบเบทาไคทินมีความแข็งแรงน้อยกว่าไคทินกุ้ง และเปลือกกุ้งที่มีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแบบอัลฟาไคทิน

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6**

เชื้อ D6 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกดินที่จังหวัดนครปฐม (จากห้องปฏิบัติการของอาจารย์ ดร.รัฐ พิชญางกูร) ที่มีไคทิเนสแอคติวิตีสูงและให้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยไคทินเป็นมอนอเมอร์อย่างเดียว และพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยวิธีชีวเคมีและซีโรโลยี (Biochemical และ Zerology) โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่า เป็น *Aeromonas caviae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะโคโลนีกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน สีขาวนวล จากการที่ *A. caviae* D6 เป็นเชื้อที่ทำการคัดแยกไว้ ดังนั้นจึงนำ *A. caviae* D6 มาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส โดยจะศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไคทิเนส เช่น อากาศ ส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับขวดเขย่า**

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนส โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียดแล้ว พบว่า กลูโคส ซูโครส คอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน ไคทินแกนหมึก และเปลือกปูที่ปั่นละเอียดแล้ว มีการผลิตไคทิเนสน้อยมาก ในขณะที่ไคทินกุ้ง ไคทินปู เปลือกกุ้ง และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียดแล้ว มีการผลิตไคทิเนส ซึ่งมีแนวโน้มของการผลิตไคทิเนสเหมือนกัน คือ มีการผลิตไคทิเนสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรก และการผลิตไคทิเนสค่อนข้างคงที่ แต่มีการผลิตลดลงบ้าง โดย *A.caviae* D6 จะมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดและเปลือกกุ้งปั่นละเอียด เป็นแหล่งคาร์บอน การที่กลูโคส ซูโครส มีการผลิตไคทิเนสน้อยมาก อาจเป็นเพราะ *A.caviae* D6 สามารถใช้กลูโคส ซูโครส ในการเจริญเติบโตได้ ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องผลิตไคทิเนสออกมาแม้ว่าจะเป็นเชื้อที่ผ่านการคัดแยกด้วยคอลลอยดอลไคทิน ว่ามีแอคติวิตีของไคทิเนสก็ตาม ซึ่งเป็นปกติของเชื้อทั่วไปที่จะสร้างแต่สิ่งที่มีความจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่เท่านั้น ส่วนคอลลอยดอลไคทินและเบทาไคทิน *A.caviae* D6 มีการผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเป็นสับสเตรทที่ย่อยง่ายเนื่องจากคอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน และไคทินแกนหมึกปั่นละเอียด มีการจัดเรียงตัวที่ไม่แข็งแรงเหมือนสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin *A.caviae* D6 จึงผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีน้อยๆก็เพียงพอกับความต้องการใช้ย่อยคอลลอยดอลไคทิน เบทาไคทิน และไคทินแกนหมึกปั่นละเอียด ส่วนเปลือกปูปั่นละเอียดมีการผลิตไคทิเนสน้อยมาก อาจเป็นเพราะ *A.caviae* D6 ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีเปลือกปูเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เนื่องจากเปลือกปูมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบมาก หรือ *A.caviae* D6 อาจผลิตไคทิเนสออกมาย่อยเปลือกปูเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แต่ก็อาจมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นด่างมากขึ้น เนื่องจากมีแคลเซียมคาร์บอเนตมาก และในภาวะนี้ก็อาจมีผลให้ไคทิเนสเสียสภาพได้ นอกจากนี้ไคทินกุ้งปั่นละเอียด ไคทินปูปั่นละเอียด เปลือกกุ้งปั่นละเอียด และ แกนหมึกปั่นละเอียด สามารถใช้เป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนสได้ โดยไคทินกุ้งปั่นละเอียดและเปลือกกุ้งปั่นละเอียดใช้เป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนสได้สูงสุด อาจจะเป็นเพราะไคทินจากกุ้งและเปลือกกุ้งที่มีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแบบอัลฟาไคทิน ซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างที่แข็งแรงกว่าแกนหมึกที่มีการจัดเรียงโครงสร้างเป็นแบบเบทาไคทินทำให้เชื้อ *A.caviae* D6 ต้องผลิตไคทิเนสออกมามากเพื่อที่จะย่อยไคทินจากกุ้งและเปลือกกุ้งเป็นอาหารเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดได้ ส่วนไคทินปูปั่นละเอียดสามารถชักนำให้ผลิตไคทิเนสได้แต่มีแอคติวิตีน้อยกว่าไคทินจากกุ้งและเปลือกกุ้งทั้งที่มีโครงสร้างแบบอัลฟาไคทินเหมือนกันทั้งนี้อาจมีผลคล้ายกับการใช้เปลือกปูเป็นตัวชักนำ คือ ไคทิเนสอาจเสียสภาพเพราะในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นด่างมากขึ้นเนื่องจากมีแคลเซียมคาร์บอเนตหลงเหลืออยู่จากขั้นตอนการเตรียมไคทิน

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถชักนำให้ *A.caviae* D6 ผลิตไคทิเนสได้แอคติวิตีสูงสุดแล้ว พบว่า ไคทินกุ้งปั่นละเอียดและเปลือกกุ้งปั่นละเอียดใช้เป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนสได้สูงสุด ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไป ก็จะใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดและเปลือกกุ้งปั่นละเอียด เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตไคทิเนส การศึกษาต่อมาเป็นการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าซึ่งการศึกษาเบื้องต้นว่าเชื้อต้องการปริมาณอากาศมากน้อยเพียงใดในการผลิตไคทิเนส โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าต่ำแสดงว่ามีปริมาณอากาศมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่าสูง จากการศึกษาปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า พบว่าในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่า 50% การผลิตแอคติวิตีสูงสุดและแอคติวิตีของไคทิเนสลดลงเมื่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าลดลง และเมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่ามากกว่า 50% ไคทิเนสมีแอคติวิตีลดลงด้วย และเมื่อเลี้ยง *A. caviae* D6 ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียด พบว่า การผลิตไคทิเนสให้ผลตรงกันข้ามกับในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียด ซึ่งจะเห็นว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าที่ 10% การผลิตไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด และการผลิตไคทิเนสลดลงเมื่อเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า จากผลการทดลองข้างต้นเห็นว่าถ้าใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดชักนำให้ *A. caviae* D6 ผลิตไคทิเนสจะใช้ปริมาณอากาศน้อยกว่าการใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียดชักนำให้ *A. caviae* D6 ผลิตไคทิเนส

จากผลการศึกษาข้างต้น จึงศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดที่ 50% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดที่ 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า ในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียดที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 50% เมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนไคทิเนสก็มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น โดยมีแอคติวิตีสูงสุด เมื่อใช้ 2.0 % ของไคทินกุ้งปั่นละเอียด และแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนมากกว่า 2% และอาหารที่มีเปลือกกุ้งปั่นละเอียดใน 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตไคทิเนสมีแนวโน้มเหมือนกับในอาหารที่มีไคทินกุ้งปั่นละเอียด แต่แอคติวิตีไคทิเนสไม่เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนมากกว่า 1.5% โดยการผลิตไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียด ในการศึกษาปริมาณของ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสจะทำการศึกษาในภาวะที่ได้ศึกษาข้างต้น คือ อาหารที่มี 2% ไคทินกุ้งปั่นละเอียดในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 50% และอาหารที่มี 1.5% เปลือกกุ้งปั่นละเอียดใน 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาปริมาณของ yeast extract พบว่า ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการผลิตเหมือนกัน คือ ปริมาณ yeast extract ที่ 0.25 % ไคทิเนสมีแอคติวิตีสูงสุด และจะมีแอคติวิตีลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของ yeast extract และถ้าให้ปริมาณ yeast extract น้อยกว่า 0.25 % แอคติวิตีของไคทิเนสก็จะลดลง ในการศึกษาผลของแร่ธาตุต่างๆ ต่อการผลิตไคทิเนส ซึ่งแร่ธาตุที่ใช้ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca และ Cu

โดยทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังที่ได้ทำการศึกษาไว้ข้างต้น คือ อาหารที่ใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนสจะใช้ไคทินกุ้งปั่นละเอียด 2% ที่มี 0.25% yeast extract ในอาหารที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 50% และอาหารที่ใช้เปลือกกุ้งเป็นตัวชักนำในการผลิตไคทิเนสจะใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียด 1.5% ที่มี 0.25% yeast extract ในอาหารที่มีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 10% ในการศึกษาจะทำการใส่แร่ธาตุ 2 ความเข้มข้น คือ 0.001% และ 0.01% จากการทดลอง พบว่า แร่ธาตุมีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนสน้อยมาก ยกเว้น 0.01% Cu มีไคทิเนสแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Cu ที่ 0.01% เป็นพิษต่อเซลล์ เพราะมีประมาณมากเกินไป

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสของ *Aeromonas caviae* D6 ในระดับถังหมัก**

หลังจากทำการหาภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าแล้ว ก็นำภาวะเบื้องต้นมาเป็นแนวทางในการศึกษาในระดับถังหมัก โดยในระดับถังหมักจะเลือกใช้ภาวะในการใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียดเป็นตัวชักนำ คือใช้เปลือกกุ้งปั่นละเอียด 1.5% ที่มี 0.25% yeast extract ในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า 10% เนื่องจากเป็นการนำของเสียมาเพิ่มคุณค่าให้เกิดประโยชน์ ทำให้ต้นทุนในการผลิตไคทิเนสถูกกว่าถ้าเลือกใช้ไคทิน ซึ่งเป็นการนำเปลือกกุ้งมาผ่านกระบวนการแปรรูปให้เป็นไคทินก่อน และในระดับถังหมักจะทำการศึกษาถึงผลของ DO ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมัก และจากการศึกษาความเข้มข้นของออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตไคทิเนสที่ DO ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MM 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 ˚C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยควบคุม DO ด้วยการควบคุมอัตราการปั่นกวนระหว่าง 100-300 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการให้อากาศให้คงที่ที่ 0.5 vvm พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อที่ DO ต่างๆ คล้ายกัน คือ เชื้อมีการเจริญเติบโตของอย่างรวดเร็วใน 18 ชั่วโมงแรก และการเจริญเติบโตเริ่มคงที่หลังจาก 24 ชั่วโมง ส่วนการผลิตไคทิเนสมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย คือ การผลิตไคทิเนสที่ DO 10, 30 และ 40% มีลักษณะการผลิตคล้ายกัน คือมีการผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆและเริ่มคงที่เมื่อชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่ DO 20% การผลิตไคทิเนสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดย DO ที่ 20% มีการผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุด

**การศึกษาคุณสมบัติและลักษณะบางประการของไคทิเนสจาก *Aeromonas caviae* D6**

หลังจากศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคทิเนสของ *A.caviae* D6 แล้วนำไคทิเนสที่ผลิตได้จากไคทินกุ้งปั่นละเอียด และเปลือกกุ้งปั่นละเอียด มาทำการศึกษาลักษณะสมบัติของไคทิเนสต่างๆ พบว่า ไคทิเนสที่ผลิตจาก *A.caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียด และเปลือกกุ้งปั่นละเอียด ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง คือ ตั้งแต่ pH 5 -10 และทำงานได้ดีที่สุดใน Tris-HCl buffer pH 7 เมื่อนำไคทิเนสที่ผลิตได้มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไคทิเนสที่ผลิตจาก *A.caviae* D6 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50˚C เมื่อนำเอนไซม์หยาบมาย่อยสับสเตรท

ชนิดต่างๆ เช่น สับสเตรทที่เป็น soluble และ amorphous chitin ได้แก่ PNAC และ คอลลอยดอลไคทิน และใช้สับสเตรทที่เป็น crystalline chitin ได้แก่ เบทาไคทิน ผงไคทินปู ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด พบว่า ไคทิเนสที่ได้จากทั้งที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งและเปลือกกุ้ง ปั่นละเอียด ต่างย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ คอลลอยดอลไคทิน และเบทาไคทิน จากการที่ไคทิเนสจาก *A.caviae* D6 ย่อย PNAC ได้ดีที่สุดเป็นเพราะ PNAC เป็น soluble chitin ที่เป็นพอลิเมอร์สายยาว ที่กระจัดกระจายอยู่ในสารละลายและไม่ได้มีการจัดเรียงตัวซ้อนกันแน่น ทำให้มีการย่อยได้ดี โดยเป็นการย่อยภายในสายไคทินทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นพอลิเมอร์สายสั้นๆ ทำให้เกิดปลายรีดิวซ์มากขึ้นส่งผลให้วัดแอคติวิตีได้สูง เพราะการวัดแอคติวิตีเป็นการวัดปลายรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ ส่วนสับสเตรทชนิดอื่นๆ ที่มีการจัดเรียงตัวซ้อนตัวแน่น จึงทำให้เกิดการย่อยที่ปลายสายไคทินเท่านั้น จากการนำน้ำเลี้ยง *A.caviae* D6 มาแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตี พบว่า ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตี 1 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60 kDa และพบว่าไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยเปลือกกุ้งปั่นละเอียดมีแถบแอคติวิตีอย่างน้อย 3 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60, 70 และ 90 kDa ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้เปลือกกุ้งชักนำในการผลิตไคทิเนส *A.caviae* D6 อาจต้องใช้ไคทิเนสมากกว่า 1 ชนิดในการช่วยย่อยเปลือกกุ้งเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเป็นผลเพราะเปลือกกุ้งมีอย่างอื่นเป็นส่วนประกอบมาก เช่น โปรตีน ไขมัน แคลเซียมคาร์บอเนต

**การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนส *Aeromonas caviae* D6 ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)**

จากการนำไคทิเนสที่ผลิตได้มาย่อยไคทินชนิดต่างๆ ได้แก่ คอลลอยดอลไคทิน ไคทินกุ้ง ไคทินปู ไคทินแกนหมึก เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ที่ปั่นละเอียด มาวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้พอลิเมอร์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ขนาดต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน พบว่า มีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนส *A. caviae* D6 จากสับสเตรทเพียง 2 ชนิด คือ คอลลอยดอลไคทิน และไคทินแกนหมึก โดยได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นมอนอเมอร์ และมีไดเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์รอง ไคทิเนส *A. caviae* D6 สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดเมื่อใช้คอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก การที่ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 สามารถย่อยคอลลอยดอลไคทินได้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด เพราะคอลลอยดอลไคทินเป็น amorphous chitin มีการจัดเรียงตัวแข็งแรงน้อยกว่าไคทินแกนหมึก ซึ่งเป็น crystalline chitin ทำให้ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ย่อยคอลลอยดอลไคทินได้ง่ายกว่าสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin

# บทที่ 5

## สรุปผลการทดลอง

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเชื้อโคลน Chi60**

เชื้อโคลน Chi60 เป็นเชื้อที่ได้จากการโคลนยีนไคทิเนสจากเชื้อ *Serratia* sp. TU09 ได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก ในระดับขวดเขย่า พบว่าเชื้อโคลน Chi60 ผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ 40% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรขวดเขย่าและความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ในระดับถังหมักเชื้อโคลน Chi60 ผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 6 ลิตร ในถังหมักขนาด 15 ลิตร ที่ DO 2.5% เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรทชนิดต่างๆ ของไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi 60 ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) พบว่าไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 สามารถย่อยสับสเตรทที่เป็น amorphous chitin คือ คอลลอยดอลไคทิน และสับสเตรทที่เป็น crystalline chitin คือ ไคทินกุ้ง ไคทินแกนหมึก และเปลือกกุ้ง ได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือ ไดเมอร์ และพบมอนอเมอร์เป็นผลิตภัณฑ์รองเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทินและไคทินแกนหมึก โดยไคทิเนสจากเชื้อโคลน Chi60 ให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อย่อยคอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก ไคทินกุ้งและเปลือกกุ้ง ตามลำดับ

**การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเชื้อ *Aeromonas caviae* D6**

เชื้อ *Aeromonas caviae* D6 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกดินที่จังหวัดนครปฐม เมื่อนำมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก พบว่าในระดับขวดเขย่า เชื้อ *Aeromonas caviae* D6 ผลิตไคทิเนสที่มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MM ที่ใช้ไคทินกุ้งและเปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ 2.0% ของไคทินกุ้งที่ปั่นละเอียด ที่ 50% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า และใช้ 1.5% เปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียด ที่ 10% ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของขวดเขย่า นอกจากนี้ผลของแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Ca, Cu มีผลต่อแอคติวิตีของไคทิเนสน้อยมาก ยกเว้น 0.01% Cu มีไคทิเนสแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนสในระดับถังหมักไคทิ

เนสมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MM 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ DO 20% ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ทำงานได้ดีในช่วง pH กว้าง คือ ตั้งแต่ pH 5 -10 โดยทำงานได้ดีที่สุดใน Tris-HCl buffer pH 7 อุณหภูมิ 50 ˚C สามารถย่อย PNAC ได้ดีที่สุด รองลงมา คือคอลลอยดอลไคทิน และเบทาไคทิน เมื่อหาขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตี พบว่า ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยไคทินกุ้งที่ปั่นละเอียด มีแถบแอคติวิตี 1 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60 kDa และพบว่า ไคทิเนสจาก *A. caviae* D6 ที่เลี้ยงด้วยเปลือกกุ้งที่ปั่นละเอียด มีแถบแอคติวิตีอย่างน้อย 3 แถบ คือ ขนาดประมาณ 60, 70 และ 90 kDa จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของไคทิเนสด้วย ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) โดยนำไคทิเนสของ *A. caviae* D6 มาย่อยไคทินชนิดต่างๆ พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ คือ มอนอเมอร์ โดยให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุดเมื่อใช้คอลลอยดอลไคทิน รองลงมา คือ ไคทินแกนหมึก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง

(1) Muzzarelli, R.A.A. (1977). **Chitin**. Pergamon Press, Oxford, England.

(2) Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. (1993) Chitinolytic enzyme : their contribution to basic and applied research . **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 9 : 468-475.

(3) Tracey, M. V. (1957). Chitin. **Reviews of Pure and Applied Chemistry**. 7: 1-14.

(4) Kramer, K., and Koga, D. (1986). Insect chitin. **Insect Biochemistry**. 16: 851-877.

(5) Blackwell, J. (1988). Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. **Methods in Enzymology**. 161: 435-442.

(6) Rudall, R. M. (1963). The chitin/protein complexes of insect cuticles. In: Beament, J.W.L, Treherne, J.E., and Wigglesworth, V.B., editors. **Advances in insect physiology**. London, New York: Academic Press., pp 257-313.

(7) Reissing, J. L. ,Strominger, J. L. and Leloir, L.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugar . **Journal of Biological Chemistry**. 217: 959-966.

(8) Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W. and Goosen, M. F. A. (1992) Application and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymer**. 7: 370-395.

(9) Struszczyk, H., Pospieszny, H., and Kotlinski, S. (1988). Some new applications of chitosan in agriculture, **Chitin and Chitosan: Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chtiosan.**, Elsevier Applied Science, London., 733-742.

(10) Hirano, S., Hayashi, M., Nishida, T., and Yamamoto, T. (1988). Chitinase activity of some seeds during their germination process, and its induction by treating with chitosan and derivatives, **Chitin and Chitosan: Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chtiosan**. Elsevier Applied Science, London., pp 743-747.

(11) Hirano, S., Hayashi, M., and Okuno, S. (1996). Cellular response of cultured soybean calli and seeds to chitin and chitosan, **Chitin and chitiosan: Proceedings of the 2nd Asia Pacific Symposium**. Bangkok., pp188-192.

(12) Boonkerd, N., Chandrkrachang, S., and Stevens, W. F. (1996). Effect of chitin on nodulation and $N_2$ fixation rhizobia-soybean symbiosis, **Chitin and Chitosan: Proceedings of the 2nd Asia Pacific Symposium**. Bangkok., pp 183-187.

(13) No, H. K. and Meyers, S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan. **Journal of Aquatic Food Product Technology.** 4: 27-52.

(14) Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. **Polymer International**. 48: 732-734.

(15) Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., and Jeon, Y-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science Technology.** 10: 37-51.

(16) Foster, A. and Webber, J. M. (1960) Chitin. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. 15: 371-393.

(17) Hirano, S. (1996). Chtin biotechnology applications. **Biotechnology Annual Review.** 2: 237-258.

(18) Aiba, S. (1994). Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially *N*-acetylated chitosans. **Carbohydrate Research.**, 267: 297-306.

(19) Monreal, J. and Reese, E.T. (1969) The chitinase of Serratia marcescens . **Canadian Journal of Microbiology**. 15 : 689-696

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(20) Park, J. K., Morita, K., Fukumoto, I., Yamasaki, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Matsuda, H. (1997) Purification and characterization of the Chitinase (ChiA) from Enterobacter sp. G-1. **Bioscience Biotechnology Biochemistry.** 61: 684–689.

(21) Taira, T., Ohnuma, T., Yamagami, T., ASO, Y., Ishiguro, M., Ishihara, M. (2002) Antifungal activity of rye (Secale cereale) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell wall. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. 66: 970–977.

(22) Patil, S. R., Ghormade, V., Deshpande, M. V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**. 26: 473–483.

(23) Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A., and Fujii,T. 1984. Rapid method of converting fungal cells into protoplast with a high regeneration frequency. **Experimental Mycology.** 8: 386-390.

(24) Ramaguera, A., Tsehech, A., Bender, S., Platter, H. J., and Dickmann, H. 1993. Protoplast formation from mycolase from *Streptomyces olivaceoviridis* and purification of chitinase. **Enzyme and Microbial Technology.** 15: 412-417.

(25) Bhushan ,B. and Hoondal , G.S. (1998) Isolation ,purification and properties of a thermostable chitinase from an alkalophilic *Bacillus sp.* BG-11. **Biotechnology Letter**. 20 :157-1592

(26) Yabuki,M.,Mizushina,K.,Amatatsu,T.,Ando,A.,Fujii,T.,Shimada,M. and Yamashita,M.(1986) Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp.*anaerogenes* A52 . **Journal of General Applied Microbiology**. ,32 :25-38

(27) Ho–Seong, L. , Sang-Dal, K. (1994) The production and enzymatic properties of chitinase from *Pseudomonas Stulzeri* YPL-1 as a biocontrol agent **. Journal of Microbiology and Biotechnology.** ,4 :134-140

(28) Tantimavanich, S. ,Pantuwatana, S. ,Bhumiratana, A. and Panbangred, W. (1998) Multiple chitinases enzymes from a single gene of *B. licheniformis* TP-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 85(3) : 259-265

(29) Sutrisno, A. ,Ueda, M. ,Inui, H. ,Kawaguchi, T. ,Nakano, Y. ,Arai, M. And Miyatake, K. (2001) Expression of a Gene Encoding Chitinase (pDA 8 ORF) from *Aeromonas sp.*no.10S-24 in *Escherichia coli* and Enzyme Characterization**. Journal of Bioscience and Bioengineering** , 91(6)

(30) Khoury,C., Minier ,M.,van Huynh ,N. and le Goffic, F. (1997) Optimal dissolved oxygen concentration for the production of chitinases *Serratia marcescens*. **Biotechnology Letters,** 19 (11) : 1143-1146

(31) Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. (1995) **Principles of Fermentaiton Technology**. Elsevier Science Ltd., N. Y.

(32) Skujins, J. J., Potgieter, H. J., and Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and b-1, 3-glucanase. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 111: 358-364.

(33) Popoff M (1984). Genus III *Aeromonas* Kluyver and van Niel 1936 398AL. In: Krieg NR, Holt JG, eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Vol. 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins: 545–548.

(34) Colwell RR, MacDonell MR, De Ley J (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* family nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 36: 473–477.

(35) Kamontip, K. (2001) **Cloning and nucleotide sequencing of chitinase gene from *Burkholderia cepacia* TU 09.** Master's Thesis. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn university.

(36) Kamontip, K. (2006) **Effects of mutation on the mode of action of CHI60 from *Serratia* sp.TU 09.** Doctor's Thesis. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn university.

(37) Imoto, T. and Yagishita, K. (1971). A simple activity measurement of lysozyme. **Agricultural and Biological Chemistry.**, 35: 599-602.

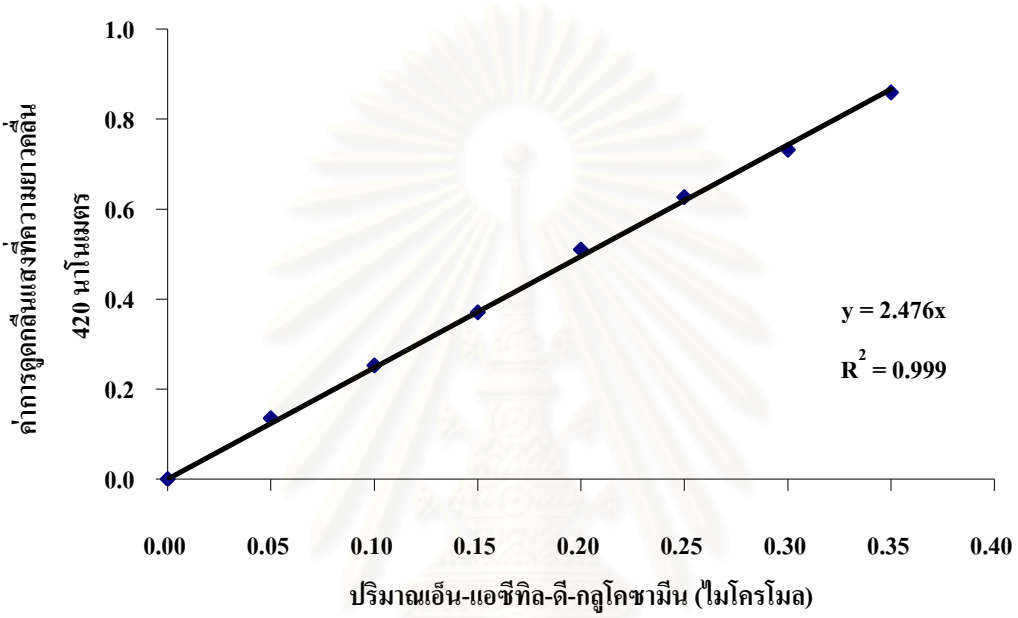
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

## กราฟมาตรฐานของเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามิน




สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข

## การเตรียมคอลลอยดอลไคทิน

การเตรียมคอลลอยดอลไคทิน มีขั้นตอนการเตรียมโดยนำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในขวดเขย่าขนาด 1 ลิตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง (ทิ้งไว้สักครู่รอให้กรดเย็น) จากนั้นเติมไคทินปั่นลงไป 10 กรัม ปิดปากขวดเขย่าด้วยพาราฟิลม์หลาย ๆ ชั้น และปิดทับด้วยฟลอยด์อีกชั้นหนึ่ง กวนทิ้งไว้ประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมงครึ่ง เพื่อให้ไคทินละลาย (คอยเติมน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อให้สารละลายเย็นอยู่เสมอป้องกันไม่ให้ไคทินถูกย่อยด้วยกรด) เมื่อครบเวลาสังเกตว่าอนุภาคของไคทินจะใสขึ้น ให้นำขวดเขย่าไปแกว่งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อทำการย่อยไคทิน ประมาณ 10 ถึง 15 นาที สารละลายจะหนืดขึ้นแล้วกลับมาใสอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง ลงในน้ำกลั่นที่เย็น 4 ลิตร โดยไคทินจะเกิดการรวมของผลึกขึ้นมาใหม่ เมื่อผ่านลงในน้ำเย็น จะเห็นเป็นลักษณะขุ่นๆ เก็บสารละลายไว้ในที่เย็นตลอดเวลา จนตะกอนตกผลึกสมบูรณ์ จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำกลั่นลงไปเขย่าเพื่อทำการล้างกรดออก ทำซ้ำไปเรื่อยๆ จนกว่าจะไม่เกิดการตกตะกอนอีก เมื่อได้แล้วเทส่วนใสด้านบนออก นำส่วนล่างไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ถึง 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ค่า pH เป็นกลาง (มี pH เท่ากับน้ำกลั่น) จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปหาความเข้มข้นของคอลลอยดอลไคทินที่เตรียมได้โดยการชั่งน้ำหนักของ microfuge tube ก่อน จากนั้นดูดคอลลอยดอลไคทินปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง นำไปชั่งหาน้ำหนักเปียก จากนั้นนำ microfuge tube ที่มีตะกอนอยู่ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ให้แห้งสนิท นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้น จนมีน้ำหนักคงที่ สามารถหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์**

นางสาวธัญญลักษณ์ ศรีรังสิต เกิดเมื่อวันที่ 15 มีนาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาระดับชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนวัดไผ่ล้อม (พูลประชาอุปถัมภ์) ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสิงห์บุรี ที่จังหวัดสิงห์บุรี และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย