บทที่ 1
บทนำ

ไคทิเนส (chitinase)

ไคทิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา พืชชั้นสูง แมลง ครัสเตเชียน และสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด บทบาทของไคทิเนสอาจจะแบ่งเป็นหลายประเภท ตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยไคทินที่พบในรา ครัสเตเชียน และแมลง นอกจากนี้ไคทิเนสที่ได้จากเชื้อราจะมีหน้าที่อื่น ๆ อีก เช่น ย่อยผนังเซลล์ ย่อย spore ส่วนในพืชซึ่งไม่มีไคทินเป็นองค์ประกอบจะผลิตไคทิเนสในกลไกการป้องกันเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค เพื่อป้องกันการถูกรุกรานจากเชื้อรา ในแบคทีเรียจะผลิตไคทิเนสเพื่อย่อยไคทินซึ่งเป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ *N*-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ β1-4 โดยตัดพันธะระหว่าง C1 และ C4 ที่เชื่อมระหว่าง *N*-acetyl-D-glucosamine ของไคทิน เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต (Sakai และคณะ, 1998) แบคทีเรียที่สามารถย่อยไคทินได้จะสร้างไคทิเนสหลากหลายชนิดโดยจะถูกควบคุมจากยีนที่แตกต่างกัน การพบไคทิเนสหลายชนิดที่เป็นที่รู้จักกันดีได้แก่สกุล *Aeromonas*, *Serratia*, *Myzobacter*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Nocardia* และ *Bacillus* และพบว่า *Serratia marcescens*, *Bacillus* และ *Vibrio* จะผลิตเอนไซม์เป็นปริมาณมาก (Cody และคณะ, 1989) *Bacillus licheniformis* X-7u จะผลิตไคทิเนสทนร้อน ส่วนใน *B. circulans* WL-12 จะมีการหลั่งไคทิเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีไคทินเป็นองค์ประกอบ (Wiwat และคณะ 1999) ได้รับการยอมรับให้ใช้ควบคุมการเกิดโรคเชื้อรา และได้มีการรายงานที่สนับสนุนว่าแบคทีเรียที่สามารถสลายไคทินที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ในเชื้อรานั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อรา มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ยกตัวอย่างเช่น ใช้ควบคุมการเกิดโรคในพืชที่เกิดจากการติดเชื้อรา หรือผลจากแมลง เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อราและเปลือกแข็งของแมลงมีไคทินเป็นส่วนประกอบหลัก (Thamthiankul และคณะ 2001) และได้มีการสร้างสายพันธุ์ของแบคทีเรียจำนวนมากที่สร้างไคทิเนสซึ่งความสนใจเหล่านั้นส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและพยาธิในดินและเพิ่มการเจริญเติบโตของพืช โดยควบคุมกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืช แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของเอนไซม์ชนิดนี้ยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด (Xia และคณะ, 2001)

ไคทินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ในราวปี ค.ศ. 1823 Odier ให้ชื่อโพลิเมอร์ชนิดนี้ว่าไคทิน คำว่าไคทิน (chitin) มาจากคำว่า "Chiton" ในภาษากรีก ซึ่ง

มีความหมายว่า เกราะหุ้ม ไคทินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำของ N-acetyl-β-D-glucosamine (GlcNAC) (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกลูโคส ชื่อทางเคมีของไคทิน คือ Poly β-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่พบมากเป็นอันดับ 2 ในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส (cellulose) โดยจะเป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้างบริเวณเปลือกนอกของแมลง และสัตว์พวกปูและกุ้ง นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ในเชื้อรา เห็ด และสาหร่ายบางสายพันธุ์ชนิดต่าง ๆ ไคทินในธรรมชาติพบอยู่ในรูปของสารประกอบที่ปนอยู่กับสารอื่น เช่น เปลือกหุ้มแข็งของแมลงจะประกอบด้วย ไคทินในรูปของไคทิน-โปรตีน (chitin-protein complex) ขณะที่เปลือกนอกของสัตว์พวกกุ้ง ปู จะพบปนอยู่กับหินปูนหรือแคลเซียมคาร์บอเนต นอกเหนือจากโปรตีน และในผนังเซลล์ของพืชพวกเห็ดรา ไคทินจะอยู่ร่วมกับสารอินทรีย์อื่น ๆ ไคทินมีโครงสร้างผลึก (crystal structure) ที่แข็งแรง และมีระดับของผลึก (degree of crystallinity) สูง รูปแบบผลึกของไคทินมี 3 ลักษณะคือ α-chitin β-chitin และ γ-chitin แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่การเกิดระบบของผลึก (crystal system) และปัจจัยของการเกิดแลตติซผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซล (unit cell) ภายในโครงสร้างผลึก ความแตกต่างกันนั้นเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในแลตติซผลึก สายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคทินจะมีการเรียงตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกัน (plated sheet) ในแลตติซผลึกของหน่วยเซล ซึ่งอาจเรียงตัวกันได้ 2 แบบ คือ แบบขนานที่มุ่งไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกันแบบสวนทางกัน (anti-parallel pattern) α-chitin มีโครงสร้างการเรียงตัวแบบสวนทางกันพบในไคทินของเปลือกกุ้ง และปู ส่วนไคทินที่พบในแกนปลาหมึกจะมีโครงสร้างที่เรียงตัวมุ่งไปทางเดียวกันเกิดเป็น β-chitin การจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแบบ γ-chitin นั้นเกิดจากโครงสร้างเรียงสลับกันระหว่างสองแบบที่กล่าวมาแล้ว โดยธรรมชาติจะพบ α-form ของไคทินมากกว่า β- และ γ-form ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular and intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี (chemical stability) มากกว่าแบบอื่น β-chitin มีเสถียรภาพทางเคมีรองลงมาจาก α-chitin ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่าการมีเสถียรภาพที่น้อยทำให้มันมีโอกาสเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจาก β-form เป็น α-form ในสารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวร เป็นไคทินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ได้อีกทางหนึ่ง (ภาวดี และคณะ)

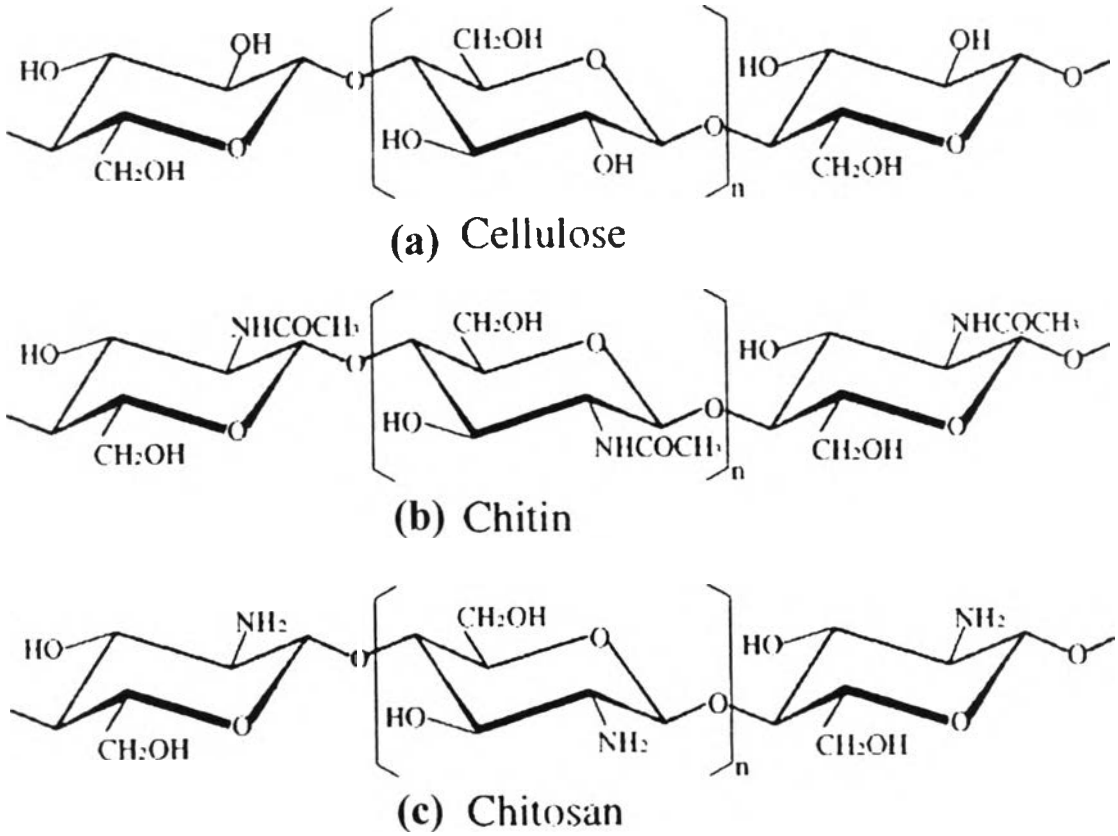
ไคโทซาน คือ ไคทินในรูปที่มีปริมาณหมู่อะซิติลต่ำที่เกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ของไคทินด้วยด่างเข้มข้นหรือไคทินดีอะเซทิเลสทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคทินเปลี่ยนไป โดยหมู่อะซิตามิโด ($-NHCOCH_3$) เปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ที่

คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังนั้นไคโทซานคือ โพลิเมอร์ของ D-glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose) ไคโทซานถูกพบครั้งแรกโดยบังเอิญ ในปี ค.ศ. 1859 โดย Rouget ได้ต้มไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น โดยปกติการเตรียมไคทินจะมีไคโทซานผสมอยู่ประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ภาวดี และคณะ) ไคโทซานสามารถพบได้ในธรรมชาติแต่พบน้อยกว่าไคทินโดยจะพบในผนังเซลของรา รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคทิน และไคโทซาน

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ประกอบด้วยไคทินจะมีไคทิเนสประกอบด้วยอยู่เสมอ ซึ่งคาดว่าเป็นตัวกำหนดรูปร่างของผนังเซลล์และเปลือกนอกของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ แต่ก็มีสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่ไม่มีไคทินเป็นส่วนประกอบแต่สร้างไคทิเนสขึ้นมาเพื่อที่จะย่อยสายโพลิเมอร์ของไคทินเพื่อใช้เป็นอาหาร อย่างเช่น แบคทีเรียในดินที่หลั่งเอนไซม์ออกมาในการตอบสนองต่อไคทินที่อยู่บริเวณรอบๆ

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในดินพบว่ามีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น สามารถสร้าง endospore ได้ และสามารถทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี เช่น ทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH อุณหภูมิ และ สภาวะ osmotic ต่างๆ ได้ดี แบคทีเรียกลุ่มนี้จะพบได้ที่ผิวของรากพืชมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชและมีผลให้เชื้อราตายได้ Basha และคณะ 2002 ได้แยกตัวอย่างแบคทีเรียจากรากพืช คือ *Bacillus* BC 121 และหาความสามารถในการย่อยไคทินพบว่าหลังจากเลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วย colloidal chitin นาน 3 วัน จะพบวงใสเกิดขึ้น ส่วน *Bacillus thuringiensis* เป็นเชื้ออีกชนิดที่พบว่าสามารถสร้างไคทิเนสและมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายตัวอ่อนของยุง (Thamthiankul และคณะ 2001) *Bacillus cereus* เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินอีกชนิดที่พบว่าสามารถย่อย colloidal chitin ได้โดยสร้างไคทิเนสที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 36 kDa และมีความสามารถในการลดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ (Pleban และคณะ, 1997) แบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพราะมีประสิทธิภาพในการย่อยไคทินสูง สามารถสร้างฮอร์โมนที่เร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมต่ำ (Liu และคณะ, 2002; Regev และคณะ, 1996)

อย่างไรก็ตามความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของไคทิเนส ที่ได้มาจากแบคทีเรียที่เกี่ยวกับโครงสร้างของยีน กลไกการย่อยไคทิน โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อที่จะพยายามตอบคำถามเกี่ยวกับกลไกและความสามารถในการย่อยไคทินของเอนไซม์ชนิดนี้ และขั้นตอนใดที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างและกำจัดไคทินในเซลล์



(a) Cellulose

(b) Chitin

(c) Chitosan

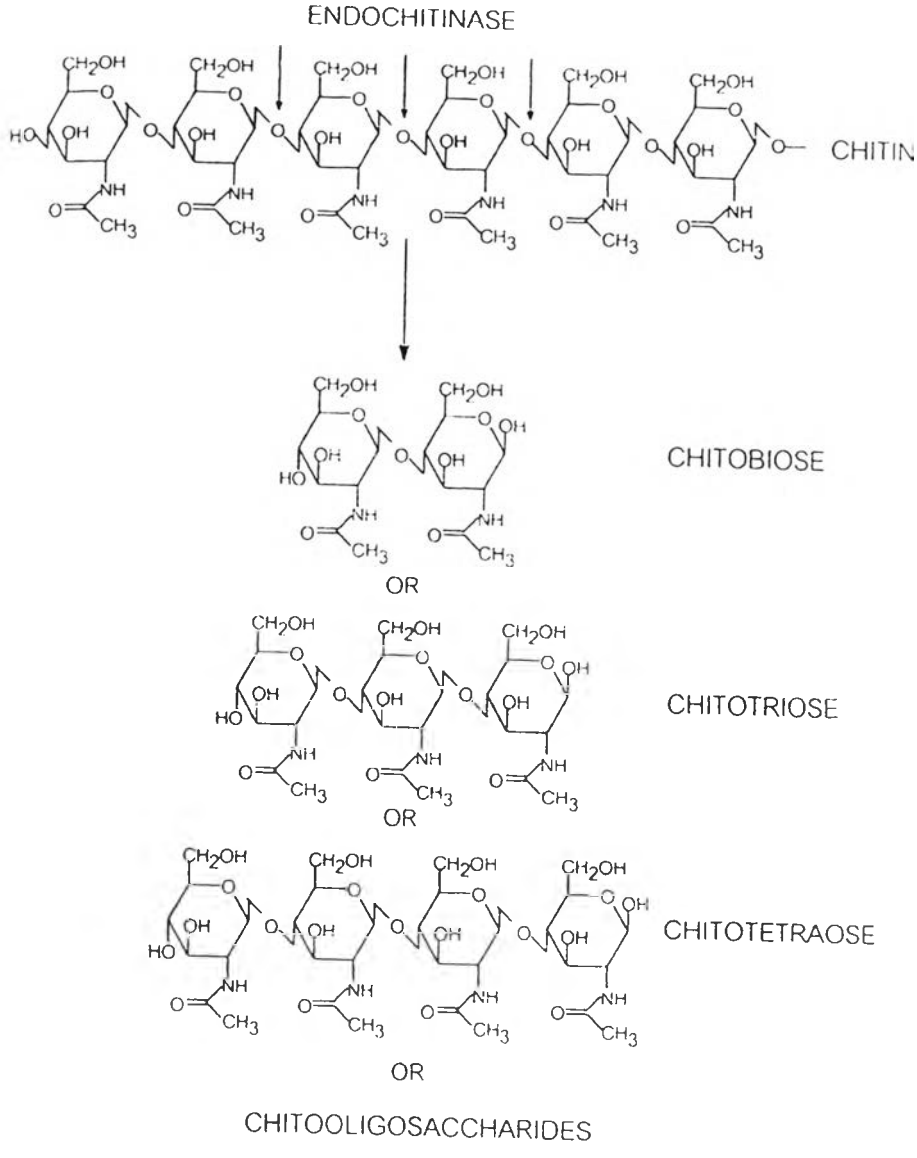
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมี (a) cellulose (b) chitin (c) chitosan (Ravi Kumar,2000)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

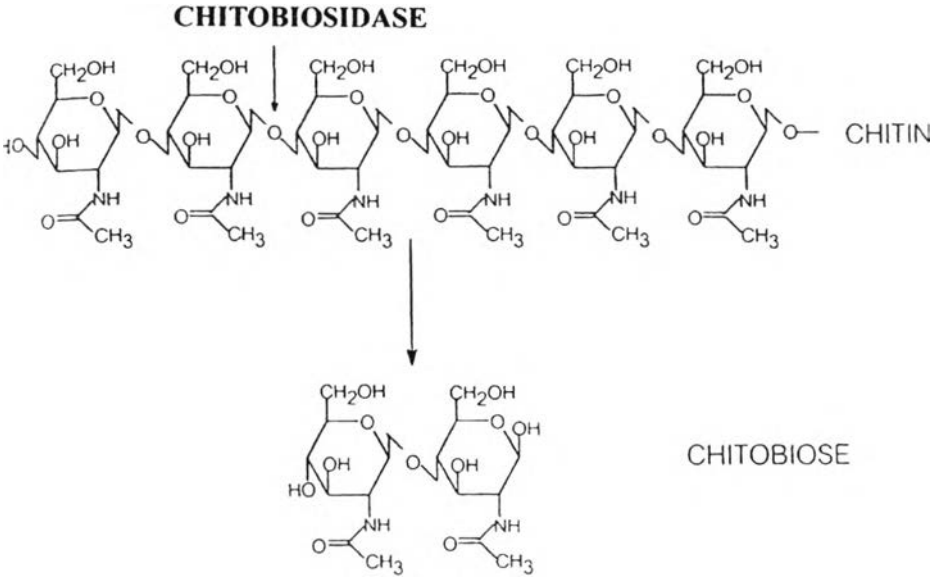
ของแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับไคทิเนสในปัจจุบันนี้ก็ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายกระบวนการดังกล่าวได้

แม้ว่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับไคทิเนสจำนวนมาก การจัดประเภทและการตั้งชื่อของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ย่อยไคทินก็ยังไม่มีข้อสรุป มีการแบ่งไคทิเนสออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ endochitinase (EC 3.2.1.14) ออกฤทธิ์แยกพอลิเมอร์ของไคทินภายในสายพอลิเมอร์ของไคทิน exochitinase (EC 3.2.1.52) จะย่อยสายพอลิเมอร์ของไคทินซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์เป็น chitobiose จากปลายสายพอลิเมอร์ของไคทิน และ β–N-acetylglucosaminidase จะย่อย chitobiose แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-acetyl-D-glucosamine (NAG) monomers (Mabuchi และคณะ 2000) ดังในรูปที่ 2 จากการศึกษาของ Harman และคณะได้พบว่าไคทิเนสที่ได้จาก *Trichoderma harzianum* เป็น endochitinase โดยจะตัดแบบสุ่มและต้องการ tetramer ของ N-acetyl-D-glucosamine ในการแสดงฤทธิ์ ส่วนผลของ chitobiosidase จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น chitobiose จากสายไคทิน และต้องการ trimer ของ N-acetyl-D-glucosamine ในการแสดงฤทธิ์ ส่วน glucosaminidase จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น monomer ออกมาและต้องการ dimer ของ N-acetyl-D-glucosamine ในการแสดงฤทธิ์ ซึ่งกลุ่มของ chitobiosidase มักจะเรียกว่า exochitinase

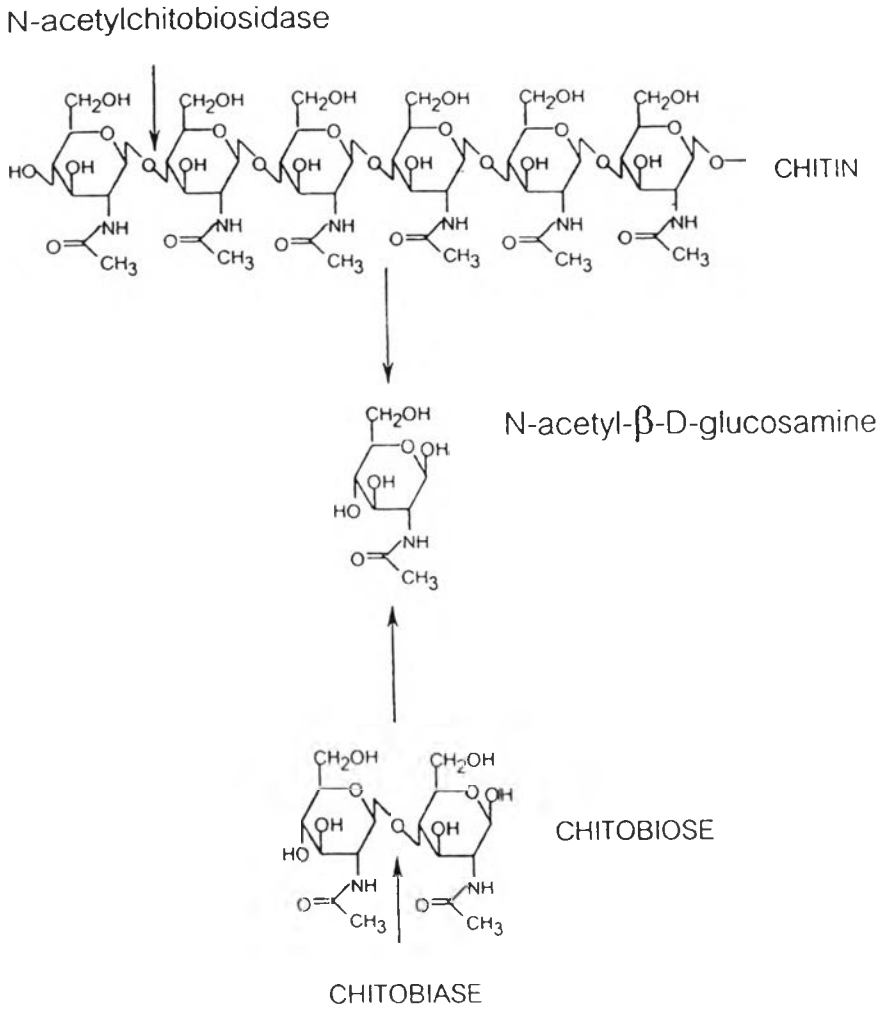
นอกจากนี้ Henrissat และ Bairoch ได้เสนอการจัดกลุ่มของไคทิเนสได้เป็น 2 กลุ่มหลักตามความสามารถในการย่อย (hydrolyse) หมู่ glycosyl ซึ่งจะสัมพันธ์กับโครงสร้างและกลไกการทำงานของเอนไซม์ (Henrissat และ Bairoch 1993) ได้จำแนกเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม chitinase family 18 โครงรูปจะมี $(\beta/\alpha)_8$ barrel fold (Scheltinga และคณะ, 1996; van Aalten และคณะ, 2001) จะเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดโดยพบว่ามีมากถึง 180 ชนิดของเอนไซม์ซึ่งจะพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวก ยูคาริโอต โปรคาริโอต และไวรัส (Watanabe และคณะ, 1999) กลุ่ม chitinase family 18 ที่สร้างมาจากแบคทีเรียสามารถแบ่งย่อยเป็น 3 subfamilies ได้แก่ subfamilies A ซึ่ง จะมีส่วนของ insertion domain เป็นแบบ 7-8 β–strands ของ $(\beta/\alpha)_8$ barrel fold และ subfamilies B และ C ไม่ได้มี insertion domain (Uchiyama และคณะ 2001) ในขณะที่กลุ่ม chitinase family 19 มีส่วนประกอบของ α–helix เป็นจำนวนมากและมีโครงสร้างคล้ายกับกลุ่มเอนไซม์ chitosanase และ lysozyme (Brameld และ Goddard, 1998) จะพบจากพืชทั้งหมด ยกเว้นเอนไซม์ที่ได้จาก *Streptomyces griseus* และ *Haemophilus influenzae* ก็มีคุณสมบัติของเอนไซม์ในกลุ่ม family 19 อยู่ด้วยเช่นกัน (Watanabe และคณะ, 1999) โดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์กลุ่ม



รูปที่ 2ก. รูปแบบของ endochitinase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542)



รูปที่ 2ข. รูปแบบของ chitobiosidase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542)



รูปที่ 2ค. รูปแบบของ N-acetylglucosaminidase และ chitobiase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและไคโทไบโอส ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542)

family 18 chitinase แต่ก็มีแบคทีเรียบางจำพวกที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม chitinase family 19 อย่าง เช่น *Streptomyces* และ *Haemophilus influenzae* เป็นต้น

การทำบริสุทธิ์และสมบัติของไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus sp.*

ในปัจจุบันได้มีการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของไคทิเนสที่แยกได้จากแบคทีเรียและพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีการใช้ butyl-toyopearl ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบ hydrophobic interaction และ Mono Q column ในการทำเอนไซม์จาก *Bacillus licheniformis* B-6839 ให้บริสุทธิ์ (Trachuk และคณะ, 1995) ต่อมาได้มีการศึกษาใน *Bacillus* strain MH-1 ซึ่งใช้การดูดซับแบบแอฟฟินิตี้กับคอลลอยดัลไคทิน เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงและพบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการทำไคทิเนสที่ได้ให้บริสุทธิ์ได้ดี (Sakai และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังมีการใช้โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน และคอลัมน์แบบการแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งส่วนใหญ่ในการทำบริสุทธิ์ไคทิเนสไม่สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียว และเอนไซม์ที่ได้ส่วนใหญ่จะมีขนาด 10-90 กิโลดาลตัน มีอุณหภูมิที่เหมาะสมตั้งแต่ 40-90 องศาเซลเซียส โดยส่วนใหญ่เอนไซม์ที่ได้เป็นเอนไซม์ทนร้อน และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-10 ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. มีทั้งเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีทั้งในช่วงที่เป็นด่าง เป็นกลาง และเป็นกรดแตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งที่มาของเอนไซม์ การวิจัยที่เกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์ไคทิเนสและสมบัติที่ได้ของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สรุปไว้ในตารางที่ 1

คุณสมบัติทางชีวเคมีของไคทิเนส

1.มวลโมเลกุล

ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนี้มีความหลากหลายตั้งแต่ประกอบด้วย 350 กรดอะมิโน จนถึงมากกว่า 800 กรดอะมิโน โดยจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา เช่น ในพืชหรือสาหร่ายจะมีขนาดโมเลกุล 30 kDa ส่วนในแบคทีเรียและเชื้อราก็มีตั้งแต่ 30 ถึง 120 kDa และในแบคทีเรียแต่ละชนิดก็ให้เอนไซม์ที่มีขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันได้แก่ *Serratia marcescens* ให้ไคทิเนสสามชนิดคือ ChiA ChiB และ ChiC ซึ่งมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 57-58 และ 52-54 และ 48-52 kDa ตามลำดับ (Roberts และ Cabib, 1982) ในแมลงและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง จะมีขนาดโมเลกุลสูงถึง 120 kDa แต่บางครั้งอาจพบเอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กได้เนื่องจากถูกตัดโดยเอนไซม์ชนิดอื่น นอกจากนี้แล้วไคทิเนสที่พบในพืชชั้นสูง หรือแมลงบางชนิดจะมีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (Hu และคณะ, 1996)

ตารางที่ 1 การทำบริสุทธิ์และสมบัติของไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus* sp.

Source of chitinase (References)	Method of purification	M.W. (kDa)	Optimal pH	Optimal Temperature
1. *Bacillus* sp. NCTU2 (Wen และคณะ 2002)	1. 85 % Ammonium sulfate precipitation 2. Phenyl-Separose column 3. Sephadex-G-75 column	30	7.0	50-60 °C
2. *Bacillus amyloliquefaciens* V656 (Wang และคณะ 2002)	1. DEAE-Sepharose CL-6B column			
-Chitinase FI		14	7	40
-Chitinase FII		17	6	40
3. *Bacillus cereus* CH (Mabuchi และคณะ 2002)	1. 75 % Ammonium sulfate precipitation 2. DEAE-Sepharose column 3. SP- Sepharose column			
- Chitinase A	4. Sephacryl S-100 HR	35	5.0-7.5	60 °C
- Chitinase B1	column	47	5.0-7.5	60 °C
- Chitinase B2		58	5.0-7.5	60 °C
- Chitinase B3		64	5.0-7.5	60 °C
4. *Bacillus thuringiensis*, subsp. Pakistani (Thamthiankul และคณะ 2001)	-	66 60 47 32	-	-

Source of chitinase (References)	Method of purification	M.W. (kDa)	Optimal pH	Optimal Temperature
5. *Bacillus circulans* No.4.1 (Wiwat และคณะ 1999)	1. 80% Ammonium sulfate precipitation 2. DEAE-Sephacel column 3. Sephadex G-100 column	45	8.0	40 °C
6. *Bacillus* strain, MH-1 (Sakai และ คณะ 1998) - Chitinase L - Chitinase M - Chitinase S	1. Mono P column (HR 5/20)	 71 62 53	 6.5 5.0 5.5	 75 °C 65 °C 75 °C
7. *Bacillus* sp. BG-11 (Bhushan และ Hoondal, 1998)	1. 50-80% Amminium sulfate precipitation 2. Affinity binding to chitin 3. Sephadex G-100 column	-	7.5-9.0	45-55 °C
8. *Bacillus licheniformis*, B-6839 (Trachuk และคณะ, 1996) -	1. Butyl-Toyopearl 650S column 2. Mono Q HR5/5 column (ion-exchange colunm)	66 62 53 49 42	4.5-5.5, 9.0-9.5 4.5-5.5, 9.0-9.5 4.5-5.5, 9.0-9.5 4.5-5.5, 9.0-9.5 5.0	62 °C 90 °C 62 °C 62 °C 62 °C
9. *Bacillus stearothermophilus*, CH-4 (Sakai และคณะ, 1994)	1. 80 % Ammonium sulfate 2. DEAE-cellulose column 3. Butyl-Toyopearl column 4. Sephadex G-100 column 5. Mono-Q-column	74	6.5	75 °C

Source of chitinase (References)	Method of purification	M.W. (kDa)	Optimal pH	Optimal Temperature
10. *Bacillus licheniformis*, X-7u (Takayanagi และคณะ, 1991)	1. Butyl-Toyopearl 650M column 2. Q-Sepharose column 3. Sephacryl S-200 column			
-Chitinase I		89	6.0* -**	70°C* -**
-Chitinase II		76	6.0* 10.0**	70°C* 80°C**
-Chitinase III		66	5.0* 10.0**	70°C* 80°C**
-Chitinase IV		59	5.0* 10.0**	70°C* 80°C**
11. *Bacillus stearothermophilus* CH-4 (Sakai และคณะ, 1994)	1. 80 % Ammonium sulfate precipitation 2. DEAE-cellulose column 3. Butyl-Toyopearl column 4. Sephadex G-100 collumn	74	6.5	75 °C
12. *Bacillus circulans* WL-12 (Watanabe และคณะ, 1990)	1. 40 % Ammonium sulfate precipitation 2. Chitin adsorption column			
-Chitinase A1	3. Sephadex G-100 collumn	74	-	-
-Chitinase A2		69	-	-
-Chitinase B1		38	-	-
-Chitinase B2		38	-	-
-Chitinase C		39	-	-
- Chitinase D		52	-	-

Source of chitinase (References)	Method of purification	M.W. (kDa)	Optimal pH	Optimal Temperature
13. *Bacillus cereus* (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542)	1. regenerated chitin column	45 58 60 70 80	5.0	50°C
14. *Bacillus licheniformis* (สัญญา กุดั่น, 2544)	1. colloidal chitin adsorption 2. DEAE-cellulose	58 70 72	5.0	55°C

หมายเหตุ : * การตรวจสอบฤทธิ์โดยใช้ p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose เป็นสารตั้งต้น

** การตรวจสอบฤทธิ์โดยใช้ glycol chitin เป็นสารตั้งต้น

2.แอคติวิตีของเอนไซม์

pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในช่วง pH 4-9 ในเอนไซม์ที่ได้มาจากพืชชั้นสูง pH 4.8-7.5 สำหรับเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ และ pH 3.5-8.0 สำหรับเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังจะขึ้นอยู่กับชนิดของ substrate ที่ใช้ด้วย ได้มีการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบค่า pH ที่เหมาะสมของไคทิเนสโดยใช้สารตั้งต้นที่ต่างกันระหว่าง glycol chitin และ N-acetyl-chitooligosaccharide พบว่าค่า pH เหมาะสมที่ได้เมื่อใช้ glycol chitin เป็นสารตั้งต้นจะสูงกว่าเมื่อใช้ N-acetyl-chitooligosaccharide ถึง 2-3 หน่วย ตัวอย่างเช่น ไคทิเนสที่แยกได้จาก *Bacillus licheniformis* X-7u จะมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 เมื่อใช้ p-nitrophenyl-β-D-N,N'-diacetylchitobiose เป็นสารตั้งต้น แต่ในขณะที่ใช้ glycol chitin เป็นสารตั้งต้นค่า pH ที่เหมาะสมจะเท่ากับ 10.0 (Takayanagi และคณะ, 1991)

ความคงทนของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิจากแหล่งต่างๆ ก็มีค่าต่างกัน ตัวอย่างเช่น ไคทิเนสที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* ที่พบในน้ำพุร้อนจะทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 80^{o}C *Bacillus* Strain, MH-1 ที่แยกได้จากอาหารซึ่งมีไคทินเป็นองค์ประกอบจะได้ไคทิเนสทั้งหมด 3 รูปแบบที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันได้แก่ chitinases L, M, และ S มีมวลโมเลกุลขนาด 71, 62 และ 53 กิโลดาลตัน ซึ่งจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานสูง คือ 75, 65, และ 75°C ตามลำดับ (Sakai และคณะ, 1998) แต่สำหรับไคทิเนสที่แยกได้จากตัวหนอนจะไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 40^{o}C ได้เนื่องจากอุณหภูมิของตัวหนอนต่ำกว่า 40^{o}C

ตัวยับยั้งการทำงานของไคทิเนส allosamidin เป็นสารเคมีตัวแรกที่มีการรายงานว่าเป็นตัวยับยั้งการทำงานของไคทิเนสซึ่งพบในแมลงที่มีความจำเพาะโดยจะยับยั้งแบบแย่งจับกับสารตั้งต้น ได้มีการปรับปรุงโครงสร้างของ allosamidin เพื่อพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไคทิเนสได้เป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ ได้แก่ demethyl-allosamidin, didemethy allosamidin เป็นต้น และยังมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไคทิเนสโดยโครงสร้างต่างจาก allosamidin เช่นสาร styloguanidin เป็นสารที่แยกได้จากฟองน้ำ Stylotella aurantium นอกจากนี้ โลหะหนักต่างๆ ก็มีผลต่อการทำงานของไคทิเนส เช่น divalent ion ได้แก่ Cu^{2+}, Zn^{2+} และ Hg^{2+} มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไคทิเนสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย แมลง และ พืชบางชนิด ในขณะที่ ion ได้แก่ Na^{+}, K^{-}, Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีผลกระตุ้นการทำงานของไคทิเนสที่ได้จาก *Alteromonas*

3. กลไกการเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนส

เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่น อย่างเช่น lysozyme ซึ่งจะย่อยพันธะ β-1,4 ที่เชื่อมระหว่าง C-1 ของ N-acetylmuramic acid และ C-4 ของ N-acetylglucosamine ที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความแตกต่างจากไคทิเนสที่จะตัดพันธะ β-1,4 ที่เชื่อมระหว่าง C-1 ของ N-acetylglucosamine และ C-4 ของ N-acetylmuramic acid แต่ในการแยกความแตกต่างระหว่าง ไคทิเนส และ ไคโทซาเนส จะตรวจสอบจากผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยไคทิเนสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetylglucosamine ส่วนไคโทซาเนสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น glucosamine โดยไคโทซาเนสจะทำหน้าที่ย่อยไคโทซาน นอกจากนี้แล้วแม้ว่าเป็นเอนไซม์ใน family เดียวกันและมีบริเวณที่จับกับสารตั้งต้นใกล้เคียงกันแต่ถ้ามาจากแหล่งที่ต่างกันกลไกการทำงานของเอนไซม์อาจจะต่างกันได้ เช่น ไคทิเนส ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียกับที่ได้จากพืชแม้ว่าจะจัดอยู่ใน family 18 เหมือนกัน แต่กลไกการย่อยไคทินแตกต่างกัน (Sasaki และคณะ 2002)

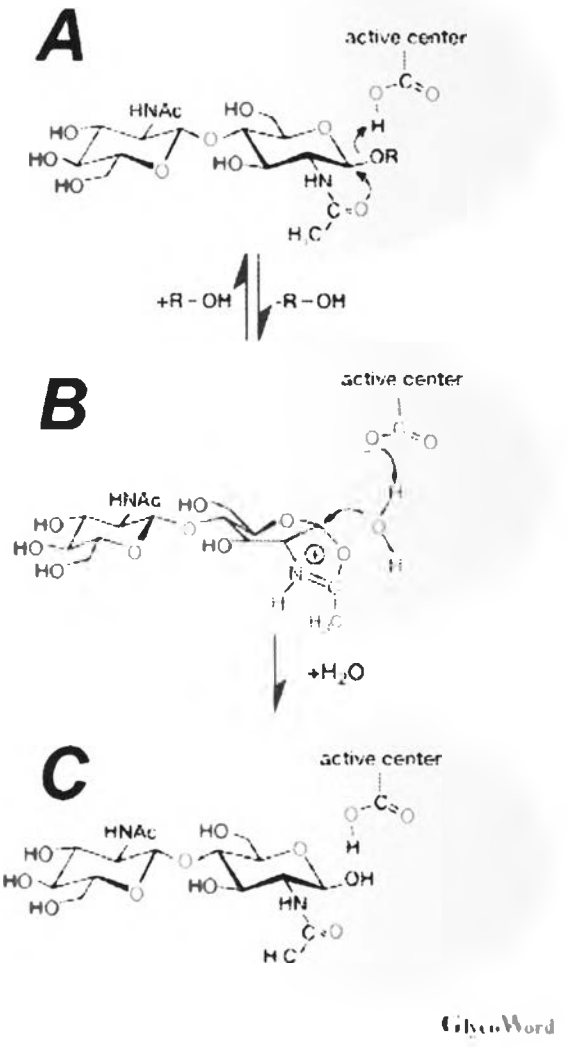
เมื่อเปรียบเทียบกลไกการทำงานของเอนไซม์ไคทิเนสที่จัดอยู่ในกลุ่มของ family 18 และ family 19 จะมีความแตกต่างกันคือ family 18 จะย่อยไคทินโดยอาศัยกลไก double displacement ซึ่งจะเติมโปรตอนไปที่ N-acetylglucosamine ในโครงสร้างของไคทินแล้วทำให้เกิดสาร intermediate คือ oxazoline ซึ่งจะถูกย่อยต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์แล้วหลังจากนั้นก็มีการจัดเรียงตัวใหม่เป็นแบบ anomeric ในขณะที่เอนไซม์ในกลุ่ม family 19 มีกลไกการย่อยไคทินเป็นแบบ single displacement (Brameld และ Goddard, 1998)

การนำเอนไซม์ไคทิเนสไปประยุกต์ใช้

ไคทิเนสได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมและการเกษตรประเภทต่างๆ ซึ่งจะใช้ในรูปแบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราและแมลงที่เป็นศัตรูพืช ควบคุมการเจริญของยุง ผลิต chitooligosaccharides ใช้ในการผลิต single cell protein จาก shellfish waste และใช้เตรียม protoplast

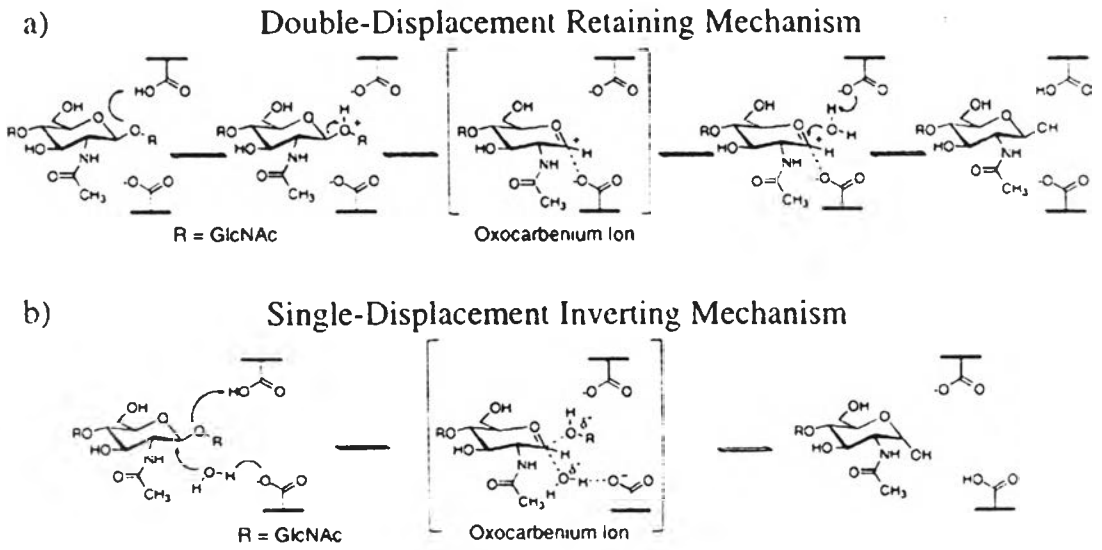
ประโยชน์ของไคทิน-ไคโทซาน

ในระยะสองทศวรรษที่ผ่านมาได้มีผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ที่เกิดจากโพลิเมอร์ชีวภาพชนิดนี้ออกมาอย่างแพร่หลาย ทั้งในและนอกประเทศ โดยปกติแล้วไคทินและไคโทซานมีสมบัติคล้ายคลึงกัน แต่การนำไคทินไปใช้ประโยชน์มีน้อยมาก เนื่องจากข้อจำกัดในตัวเองคือ การที่ไคทินไม่สามารถละลายในตัวละลายต่าง ๆ ได้ เนื่องจากมีโครงสร้างที่เป็นผลึก ดังนั้นการนำไคทินไปใช้



รูปที่ 3 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ในการเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนส

(Sasaki และคณะ, 2002)



รูปที่ 4 เปรียบเทียบกลไกการย่อยไคทินของไคทิเนสในกลุ่ม family 18 (a) และ family 19 (b) (Brameld และ Goddard, 1998)

ประโยชน์จึงมีน้อยมากเมื่อเทียบกับไคโตซาน ปัจจุบันได้มีการค้นคว้าและวิจัย นำไคทิน-ไคโทซานไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายสามารถสรุปได้ดังนี้ (ภาวดี และคณะ)

ด้านสิ่งทอและกระดาษ

การผลิตเส้นใยจากไคโทซานเกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1981 เส้นใยที่ทำจากไคทิน-ไคโทซานมีสมบัติทนทานต่อความร้อน ไอน้ำ และสารเคมีหลายชนิด ติดสีและสารอื่นได้ดี เมื่อเทียบกับเส้นใยจากเซลลูโลส เช่น ฝ้าย นอกจากนี้บริษัทในญี่ปุ่นหลายแห่งได้ทำการผลิตเส้นใยสังเคราะห์ที่เคลือบด้วยไคทิน-ไคโทซาน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการควบคุมความชื้น ซับเหงื่อได้ดี ทำให้รู้สึกสวมใส่สบาย ทนต่อการซักล้าง สีติดทนนาน และยังป้องกันแบคทีเรียและเชื้อรา ในอุตสาหกรรมกระดาษ ไคโทซานมีส่วนเพิ่มความแข็งแรงให้กับกระดาษ ทำให้งานพิมพ์สวยงาม คมชัด เมื่อใช้ร่วมกับหมึกพิมพ์ที่มีประจุลบ

วัสดุทางการแพทย์

เนื่องจากไคทินเป็นสารธรรมชาติ ดังนั้นร่างกายมนุษย์มักจะไม่ทำการต่อต้าน นอกจากนี้ไคทินยังสามารถป้องกันการติดเชื้อ ซึ่งจากข้อดีต่าง ๆ นี้เองจึงสามารถนำไคทินมาใช้งานในส่วนของวัสดุทางการแพทย์ได้อย่างมากมาย เช่น วัสดุตกแต่งแผล ไหมเย็บแผล ตัวควบคุมการปลดปล่อยยา ผิวหนังเทียม สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น

อาหารและเครื่องดื่ม

ไคทินเป็นอาหารเสริม (nutritional additives) ที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากในร่างกายคนไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไคทิน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอาหารสำหรับควบคุมน้ำหนัก (diet food) อีกทั้งไคทินยังมีสมบัติเป็น barrier จึงมีการนำมาใช้ในเรื่องบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร ตัวอย่างการนำไคทินไปใช้ในด้านนี้คือ food stabiliser สารเติมแต่งในอาหาร อาหารเสริมควบคุมน้ำหนัก การถนอมรักษาอาหาร บรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร

การเกษตร

ไคทินมีสมบัติพิเศษบางอย่างที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ทางการเกษตรกรรม ได้มีการพัฒนาการนำไปใช้ทางเกษตรกรรมอย่างมากมาย เช่น การเคลือบเมล็ดพันธุ์ ส่วนผสมในอาหารสัตว์ ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าไส้เดือน ยาฆ่า/ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา สารเร่งในการเจริญเติบโตของพืช

เครื่องสำอาง

ไคทินถูกใช้เป็นสารทำให้ข้น (thickening agent) และสารเติมแต่ง (additive) ในผลิตภัณฑ์ประเภท hair care, skin care และ oral care

การบำบัดน้ำเสีย

ในด้านนี้จะอาศัยสมบัติความเป็น polyelectrolyte และความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะหนักของไคโทซานในกระบวนการ เช่น น้ำดื่ม การ recoveries ของโลหะ การบำบัดน้ำเสียในสระว่ายน้ำในโรงงานอุตสาหกรรม

Product separation and recovery

ไคทิน-ไคโทซานในรูปต่าง ๆ เช่น แผ่นบาง (membrane) ผง สารละลาย ถูกนำไปพัฒนาใช้ใน membrane separation เป็น encapsulating adsorbent ใช้ใน chromatographic columns

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เนื่องจากไคทินเป็นสารพอลิเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ ซึ่งจำเป็นที่จะต้องกำจัด โดยการนำไคทิเนสมาช่วยย่อยสลายในการกำจัดของเสียดังกล่าว เพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม และปัจจุบันได้มีการใช้ไคทิเนสอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อรา ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยยังต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแหล่งผลิตไคทิเนสภายในประเทศได้และมีราคาถูกซึ่งจะช่วยลดภาระการนำเข้าจากต่างประเทศได้ นางสาวเกื้อการุณย์ ครูส่ง และ อ.ดร. รัฐ พิชญางกูร จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แยก *Bacillus cereus* จากดินภายในประเทศและพบว่าสามารถผลิตไคทิเนสได้ และมีความสามารถในการย่อยคอลลอยดัลไคทินที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ นางสาวมณีรัตน์ มีพลอยได้นำ *Bacillus cereus* ที่ได้ทำการเตรียมและศึกษาสมบัติของไคทิเนสที่ผลิตจากเชื้อนี้ พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ได้มีไคทิเนสอยู่ 5 ขนาด มีน้ำหนักโมเลกุล 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตันจากการแยกด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส แต่หากแยกโดยพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ไม่เสียสภาพ จะพบเพียง 2 แถบ และเอนไซม์ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน pH ที่เหมาะสมคือ 4.0-6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 40-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทินได้ดีที่สุดและพบว่าเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีของไคโทไบโอซิเดสและเอ็นโดไคทิเนส และพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีแอคติวิตีสูงกว่าไค

ทิเนสจาก *Serratia macescens* ที่ใช้ในทางการค้า (มณีรัตน์ มีพลอย, 2542)แต่เนื่องจากไคทิเนสที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทำวิทยานิพนธ์นี้จึงต้องการศึกษาต่อจากงานของมณีรัตน์ มีพลอยโดยจะทำการแยกเอนไซม์ให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์และนำเอนไซม์ที่ได้มาศึกษาสมบัติบางประการ