

บทที่ 2

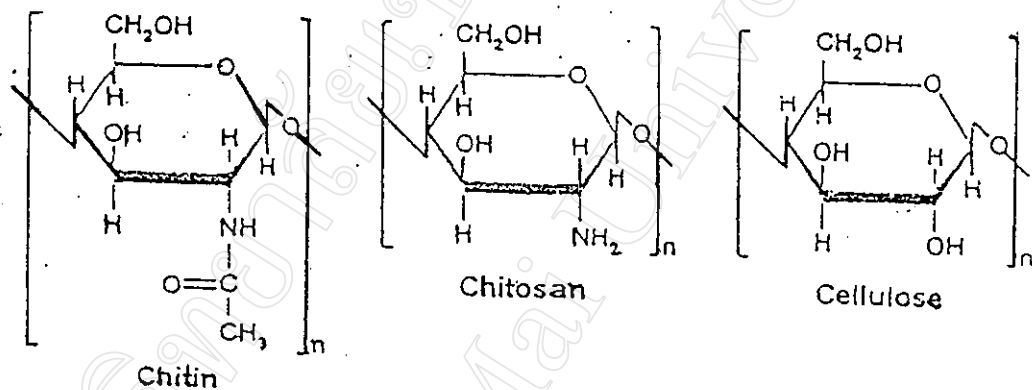
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้มากติดอันดับ 1 ใน 4 ของโลก ซึ่งผลผลิตกุ้งทะเลในประเทศไทยได้มาจาก 2 แหล่งคือโดยการจับประมาณร้อยละ 50 และโดยการเพาะเลี้ยงประมาณร้อยละ 50 ในระยะ 4 ปีที่ผ่านมา ผลผลิตกุ้งรวมได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 เท่าตัว จากการที่ผลผลิตกุ้งรวมในแต่ละปีได้เพิ่มปริมาณขึ้นทำให้ประเทศไทยมีการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งมากขึ้น ปัญหาที่ตามมาคือทำให้ปริมาณหัวกุ้งและเปลือกกุ้งซึ่งเป็นของเหลือทิ้งเหล่านี้มีมากขึ้นตามไปด้วย การใช้ประโยชน์จากหัวกุ้งและเปลือกกุ้งในปัจจุบันยังมีน้อย โดยมากจะนำไปตากแห้งแล้วบดเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เลี้ยง เช่น เป็ด ไก่ กุ้ง เพื่อใช้ทดแทนโปรตีนบางส่วน และโรงงานผลิตน้ำปลาบางแห่งได้ใช้เป็นส่วนผสมในการทำน้ำปลา แต่พบว่ามีกากและไคติน (chitin) ปนอยู่ในปริมาณสูง นอกจากนี้ มีการนำไปผลิตไซเลจ (silage) ซึ่งเป็นโปรตีนเหลวจากหัวกุ้งใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามในกรณีที่มีการคัดล้างของหัวกุ้งและเปลือกกุ้งในโรงงานจะก่อให้เกิดปัญหาต่อโรงงานหลายประการ ได้แก่ ส่งกลิ่นเหม็นรบกวนและเป็นแหล่งของเชื้อโรค ตลอดจนสัตว์ประเภทหนูและแมลงและแมลงต่างๆ รวมทั้งก่อให้เกิดมลพิษทางน้ำอีกด้วยทำให้โรงงานต้องเสียค่าใช้จ่ายในการกำจัดทิ้ง จากการศึกษาพบว่าเปลือกกุ้งเป็นแหล่งของไคตินอยู่รวมกับโปรตีนและแร่ธาตุ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนั้นการนำเปลือกกุ้งมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไคติน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุพันธ์ของไคติน คือไคโตซาน (chitosan) จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งภายในประเทศได้ ตลอดจนช่วยแก้ปัญหาให้โรงงานในการกำจัดทิ้ง (เขาวภา และคณะ, 2534)

ไคตินและไคโตซานเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างที่ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ซึ่งธรรมชาติได้สรรให้กับสิ่งมีชีวิตบางชนิด ไคตินและไคโตซานเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในลักษณะเส้นใย (fiber) ที่ทำหน้าที่ยึดสารต่างๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้นที่แข็งแรงสามารถห่อหุ้มอวัยวะของสิ่งมีชีวิต อาทิเช่น ปีกแมลง เปลือกหุ้มอวัยวะของสัตว์ที่มีเปลือก (Arthropoda) ซึ่งได้แก่ กุ้ง ตลอดจนพวกหอยที่มีเปลือกแข็งในตระกูล Mollusca ซึ่งรวมถึงพวกหอยมุก (Gastropoda) และพวกปลาหมึก (Cephalopoda) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พวกรา (molds) พวกยีสต์ (yeast) และจุลินทรีย์อีกหลายชนิด (สุวดี, 2542)

ไคติน

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly (2-acetamino-2-deoxy-D-glucose) หรือ poly (N-acetylglucosamine) ไคตินเป็นโพลิแซคคาไรด์ของ กลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งแต่ละหน่วยจับต่อกันด้วย β -(1,4) พันธะไกลโคซิดิก โมเลกุลของไคตินจัดเรียงตัวกันแบบ poly (N-acetyl-D-glucosamine) มีสูตรทางเคมีเป็น $(C_8H_{12}O_5N)_n$ ส่วนไคโดซานคือ การนำไคตินมา deacetylation ดังนั้นไคโดซานจึงเป็นโพลิเมอร์ของ D-glucosamine ไคตินและไคโดซานมีสูตรโครงสร้างดังภาพ 1



ภาพ 1 โครงสร้างของไคติน ไคโดซาน และ เซลลูโลส (รพีพรรณ และ ชีรัช, 2536)

แหล่งไคติน

ไคตินพบได้ในเปลือกของ crustacean เช่น หอย ปู กุ้งมังกร ปลาหมึก กุ้ง และในเปลือกของพวกแมลง และสัตว์ใน Pylum Arthropoda จะมีไคตินเป็นส่วนประกอบประมาณ 25-50% ของน้ำหนักแห้งของเปลือก การที่เปลือกของสัตว์เหล่านี้ประกอบด้วยไคตินจึงทำให้เปลือกของมันแข็งและคงรูปได้ในพืชชั้นต่ำ ผงเซลล์ของราบางชนิดมีไคตินประมาณ 20-44% และในสาหร่ายสีเขียวมีไคตินประมาณ 3-5% แต่ไม่พบไคตินในแบคทีเรีย (พูนศรี, 2523) นอกจากนี้เรายังพบไคตินตามผนังระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่ายแหล่งที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไคตินในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันคือ เปลือกกุ้งและกระดองปู ตาราง 1 แสดงถึงปริมาณส่วนประกอบที่สำคัญของเปลือกกุ้งและกระดองปู และปริมาณไคตินที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในปีหนึ่งๆ ประมาณ 1.5×10^5 ตัน (ตาราง 2) ซึ่งเป็นส่วนที่มีค่ามากกว่าที่จะถูกกำจัดทิ้งไปเลยๆ (วิไล, 2539)

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

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

ตาราง 2 ปริมาณไคตินที่คาดว่าจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ ($\times 10^3$ ตัน/ปี) (วิไล, 2539)

แหล่งกำเนิด	ปริมาณการเก็บเกี่ยว*	ของเสียที่มีไคตินอยู่		
		น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง	ปริมาณไคติน
กุ้งและปู**	1,700	468	154	39
ครีล	18,200	3,640	801	56
หอย	1,390	521	482	22
ปลาหมึก	660	99	21	1
ยีสต์, รา	790	790	182	32
แมลง	ปริมาณน้อย	-	-	-
รวม	22,740	5,118	1,640	150

*คิดครึ่งหนึ่งของปริมาณของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด นอกจากยีสต์, รา ซึ่งคำนวณปริมาณทั้งหมด

**ค่าเฉลี่ยจากปริมาณการจับสัตว์น้ำจากปี ค.ศ.1970-1974

การเตรียมไคตินและไคโตซาน (สิริรัตน์, 2540 และ สุวดี, 2542)

การเตรียมไคตินมีกระบวนการหลายขั้นตอน เช่น มีการกำจัดสี เมลานิน และ แคโรทีนอยด์ โดยใช้ 0.02% potassium permanganate ที่อุณหภูมิ 60°C หรือใช้ sodium metabisulfite ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดซัลฟิวริก การทำให้บริสุทธิ์ทำได้โดยสกัดด้วยน้ำเดือด เอธานอล หรือ อีเธอร์ ดังนั้นการเตรียมไคตินและไคโตซานมีหลักการที่สำคัญดังต่อไปนี้

1. กระบวนการกำจัดโปรตีน (deproteination) โดยการทำให้ปฏิกิริยากับด่าง ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ โซดาไฟ (NaOH) ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกขจัดออกไปจากวัตถุดิบ พร้อมกันนี้บางส่วนไขมันและรงควัตถุบางชนิดมีโอกาสดูกขจัดออกไปด้วย อย่างไรก็ตาม การพิจารณาใช้กระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้

2. กระบวนการกำจัดเกลือแร่ (demineralization) โดยการนำวัตถุดิบหรือวัตถุดิบซึ่งผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนมาแล้ว มาทำปฏิกิริยากับกรด ซึ่งส่วนมากใช้กรดเกลือ (HCl) ทำให้เกลือแร่ส่วนใหญ่ ได้แก่ หินปูน (CaCO_3) ซึ่งจะถูกกำจัดออกไปโดยเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมกันนี้บางส่วนของรงควัตถุและโปรตีนที่ละลายได้ในกรดยอมถูกกำจัดออกไปด้วยในขั้นตอนนี้เช่นกัน วัสดุที่ได้หลังจากกระบวนการกำจัดเกลือแร่ก็คือ ไคติน

3. กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล (deacetylation) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล ($\text{CH}_3\text{CO}-$) ที่มีอยู่บนโมเลกุลของไคติน เพื่อให้เกิดเป็นไคโตซานซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) บนโมเลกุลของไคติน และหมู่เอมีน นี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลายช่วยให้การละลายดีขึ้นเพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก ส่วนใหญ่เมื่อปริมาณของหมู่อะซิติลถูกกำจัดไปมากกว่า 60% ขึ้นไป สารไคโตซานที่ได้สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดอะซิติก (CH_3COOH) กรดโพรพานิก ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) กรดแลคติก ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) และ กรดบิวทีริก ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) เป็นต้น การลดหมู่อะซิติลกระทำได้โดยใช้ค่าที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40% ขึ้นไป ดังนั้นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการพิจารณาสารไคโตซานก็คือค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation, %DD)

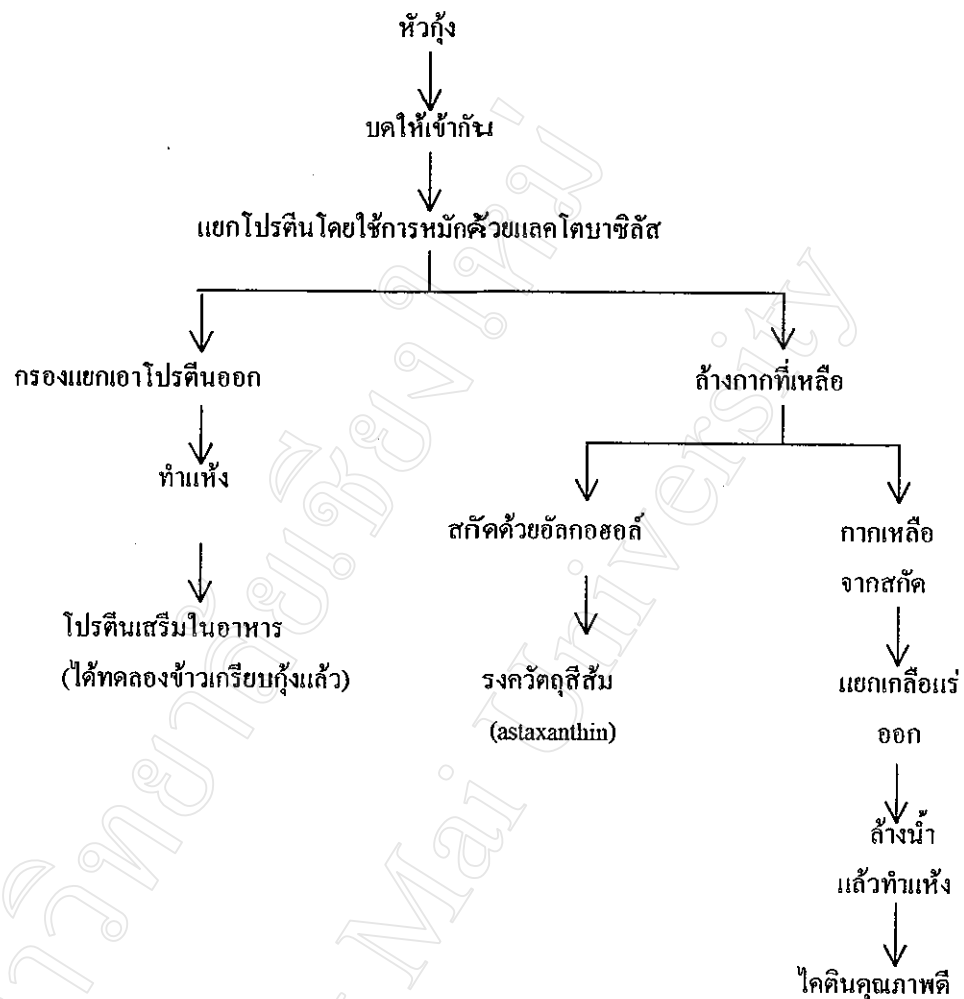
ไคโตซานได้จากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ของไคติน ซึ่งก็คือพอลิเมอร์ของ (1-4)-2amino-2deoxy- β -D-glucan หรือเรียกง่ายๆว่า พอลิเมอร์ของ glucosamine การเกิดไคโตซานนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล ซึ่งวัดจากค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation) การทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล คิดเป็นหน่วยร้อยละ (percentage degree of deacetylation, %DD) กล่าวคือถ้า %DD เกินกว่า 50% ขึ้นไปแล้วสามารถใช้พอลิเมอร์นั้นทำให้เกิดอนุพันธ์ที่ละลายในกรดอินทรีย์ได้ หรืออาจกล่าวได้ว่าการลดลงของหมู่อะซิติลในไคติน (chitin regenerated) ผลที่ได้คือ การเพิ่มหมู่เอมีน ซึ่งเป็นการเพิ่มสมบัติการเป็นสารที่มีประจุเป็นบวก (polycationic activity) บนพอลิเมอร์ทำให้เกิดสภาพของการเป็นไคโตซานเพิ่มขึ้น (chitosan generation) เพราะฉะนั้นโครงสร้างของไคโตซานต่างจากไคตินตรงหน่วยที่เป็น glucosamine ในสายพอลิเมอร์เพิ่มมากกว่า 50% ขึ้นไปนั่นเอง

ในอุตสาหกรรมปัจจุบันการผลิตสารโคตินและโคโคซานจากเปลือกกุ้ง ทำโดยใช้สารเคมี ได้แก่ ค้างและกรด (แผนภูมิ 1)



แผนภูมิ 1 การผลิตสารโคตินและโคโคซานจากเปลือกกุ้ง (สุวลี, 2542)

ปัจจุบันกลุ่มผู้วิจัยซึ่งประกอบด้วย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพแห่งสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย ได้ร่วมกันพัฒนาทางเลือกใหม่ โดยใช้การทำงานของจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) เพื่อแยกเอาโปรตีนออกแทนการต้มกับค้างดังที่เคยใช้กัน และโปรตีนที่แยกด้วยจุลินทรีย์สามารถนำมาทำแห้งเป็น shrimp protein concentrate (SCP) แล้วใช้ต่อเป็นโปรตีนเสริมในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป (แผนภูมิ 2)



แผนภูมิ 2 การใช้จุลินทรีย์แลคโตบาซิลัสเพื่อการผลิตโคติน (สุวลิ, 2542)

ผลประโยชน์ที่ได้รับจากการปรับปรุงกระบวนการทางชีวภาพ (สุวลิ, 2542)

1. เทคนิคทางเลือกใหม่ด้วยวิธีชีวภาพที่ไม่ต้องใช้ค่า และความร้อนในการแยกโปรตีน
2. โปรตีนที่แยกได้นำกลับคืนมาใช้ในรูป SCP เพื่อเพิ่มเป็น โปรตีนเสริมในอาหารบางชนิด
3. ผลพลอยได้ที่สำคัญ คือ สี astaxanthin ซึ่งใช้ผสมในอาหารสัตว์หลายชนิด
4. ลดการใช้กรดในการแยกเกลือแร่ลดลงมากกว่า 30 %

สมบัติสำคัญของสารธรรมชาติ ไคตินและไคโตซาน (สุวดี, 2542)

1. เป็นวัสดุทางชีวภาพ (biomaterial) ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) และเป็นสารที่มีส่วนรวมในกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity) อีกทั้งย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) ดังนั้นจึงปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม

2. ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (domaintly positive charge) สารละลายไคโตซาน มีความเหนียว (viscous) และมีความใส (clear solution)

3. ไคตินไม่สามารถละลายน้ำและในสารอินทรีย์ทั่วไป ส่วนไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิดแล้วเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้

4. สามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เจล เม็ด เส้นใย คอลลอยด์ (colloid) และสารเคลือบ เป็นต้น มีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อที่จะเปลี่ยนให้เป็นสารอื่นๆ ได้มากมาย ด้วยลักษณะสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์โดดเด่นเฉพาะตัวนี้ ดังนั้นจึงมีการนำเอาไคตินและไคโตซานมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย ขณะนี้ได้ผ่านการขึ้นทะเบียนเป็น Food Processing Aids แล้ว โดยคณะกรรมการ (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) ที่กรุงเฮก ประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อปี ค.ศ. 1990 นอกจากนี้ยังได้รับการยอมรับให้ใช้ผสมอาหารและยาได้ในประเทศญี่ปุ่นมานานแล้ว

ประโยชน์จากสารธรรมชาติไคตินและไคโตซานซึ่งได้รับการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ดังนี้ (วีรภัทรและสุภารัตน์, 2542, สิริรัตน์, 2540 และ สุวดี, 2542)

1. ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์

ไคโตซานสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในแชมพูสระผม ครีมนวดผม และครีมปรับสภาพผม เนื่องจากสารละลายของไคโตซานนั้นมีความหนืด และยังมีคุณสมบัติในการเคลือบนอกจากนี้แล้วยังเก็บความชุ่มชื้นไว้ได้จึงทำให้เส้นผมนุ่ม ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์หลายชนิดที่ขายในนามบริษัท เวลล่า ประเทศเยอรมันนี และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์หลายชนิดของประเทศญี่ปุ่น ก็มีสารไคโตซานประกอบอยู่ นอกจากนี้ยังสามารถทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น โฟมอาบน้ำ สบู่เหลว ยาสีฟัน และครีมทาหน้า นอกจากนี้แล้ว Guerlain Foundation ยังใช้สารไคตินเป็นส่วนประกอบในแป้งแต่งหน้า เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นความเรียบ ให้กับการแต่งหน้าได้นานๆ ไคตินยังใช้ผสมในโลชั่นทาผิวเพื่อความเนียนนุ่ม และรักษาความสะอาดบนผิวหน้า สามารถบรรเทาอาการผิวแห้งแตก (การลอกของผิวหน้าชั้นนอก) และยังสามารถใช้กับผมโดยทำเป็นสารผสม ใน volatile liquid (ethyl alcohol) เพื่อจัดน้ำมันออกจากผม

2. ผลิตภัณฑ์ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบใช้ไคโตซานเข้มข้นมากกว่า 0.02% สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และการเจริญเติบโตของศัตรูพืชหลายชนิด ดังมีรายงานการศึกษาของ สมชาย (2537) ได้ทำการทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (Dermatophytes) โดยใช้อนุพันธ์ของไคโตซานชนิด N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) ในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1-4% พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 2% NOCC สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่า *Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum canis* และที่ระดับความเข้มข้น 3% NOCC สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่า *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagophytes* แต่ NOCC ที่ระดับความเข้มข้น 2-3% ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Trichophyton rubrum* แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ NOCC เป็น 4% ก็ตาม

3. ผลิตภัณฑ์อาหารควบคุมน้ำหนัก

มีการศึกษาแล้วว่าเมื่อรับประทานไคตินหรือไคโตซานเข้าไป นอกจากจะไม่ถูกดูดซึมภายในร่างกายแล้ว ยังช่วยในการเคลื่อนตัวของกากอาหารในลำไส้ดังเช่นอาหารจำพวกไฟเบอร์ทั่วไป นอกจากนี้แล้วยังมีความสามารถในการจับคลอเลสเตอรอลและไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปก่อนที่จะเกิดการดูดซึมสารเหล่านั้น ในปัจจุบันมีการนำไคโตซานบริสุทธิ์มาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพโดยมุ่งเน้นที่การลดความอ้วนประเทศญี่ปุ่นจึงมีการผลิตขนมคุกกี้ควบคุมน้ำหนักและบะหมี่สำเร็จรูป ซึ่งมีส่วนผสมของไคโตซานออกมาจำหน่าย นอกจากนี้แล้วยังมีน้ำส้มสายชูที่มีไคโตซานผสมอยู่ออกมาจำหน่ายอีกด้วย สำหรับในประเทศไทยได้วางตลาดผลิตภัณฑ์ไคโตซานแคปซูล เพื่อลดคลอเลสเตอรอลและควบคุมน้ำหนัก ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในรูปอาหารเสริม

4. ผลิตภัณฑ์ไคโตซานขึ้นรูปเป็นเม็ด

ไคโตซานขึ้นรูปเป็นเม็ด สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับสิ่งมีชีวิตได้ เช่น เป็นตัวหุ้มและตัวยึดเกาะสำหรับเอนไซม์และโปรตีน (immobilize) และยังสามารถใช้เป็นตัวกลางในการจับโลหะ โดยปฏิกิริยาการเกิดคีเลต (chelating agents reaction) ตัวอย่างการทำเม็ดไคโตซานเคลือบด้วยสารเพื่อผลิตอัลกอฮอลล์

5. ผลิตภัณฑ์เพื่อใช้สร้างตะกอน

ไคโตซานสามารถจำหน่ายเป็นตัวสร้างตะกอน (flocculant) สำหรับใช้ในกระบวนการสร้างตะกอน (coagulation) และตกตะกอน (flocculant) เพื่อการบำบัดน้ำเสีย โดยไคโตซานที่มีประจุบวกจะจับกับสารพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ แล้วเกิดเป็นสารประกอบ polyelectrolyte ในปัจจุบันมีโรงงานชุบโลหะด้วยไฟฟ้าในประเทศเป็นจำนวนมาก โรงงานเหล่านี้ปล่อยน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซึ่งประกอบด้วยโลหะ ได้แก่ Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} และ Pb^{2+} ซึ่งถูกกำจัดโดยวิธีการ

คกตะกอนทางเคมี การใช้ไคโตซานเพื่อดูดซับโลหะหนักน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ปลอดภัยและได้ผลดี

6. ผลึกภัณฑ์ไคโตซานขึ้นรูปเป็นคัพช็อคเคาะ

ไคโตซานเมื่อทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ในสารละลายกรดอินทรีย์จะสามารถขึ้นรูปเป็นเจลได้หลายแบบ ซึ่งปฏิกิริยานี้ได้นำไปใช้ในการจับเซลล์หรืออวัยวะต่างๆ เพื่อจะนำแผ่นสไลด์ไปศึกษารายละเอียดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM)

7. ผลึกภัณฑ์ทางการแพทย์

ใช้เป็นแผ่นปิดแผลไฟไหม้และน้ำร้อนลวก ยังมีการผลิตผิวหนังเทียมจากส่วนประกอบไคโตซานใช้เป็น artificial kidney membrane เพราะมีความเหนียว ใช้ในการเตรียมสารที่ด้านการจับตัวเป็นลิ่มของเลือด (blood anticoagulants) เกิดจากการมีอนุพันธ์ของหมู่อะมิโนด้านการจับตัวเป็นลิ่มของเลือด

8. ใช้ในการเกษตรกรรม

ใช้หุ้มเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อยืดอายุการเก็บและป้องกันราและจุลินทรีย์ใช้เป็นสารกันบูดเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ในอุตสาหกรรมเกษตร

9. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์กระดาษ

ไคโตซานช่วยในการยึดติดโดยใช้เพียง 1% โดยน้ำหนัก กระดาษที่ได้จะมีความทนทานเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะขณะเปียกซึ่งเหมาะสำหรับทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้งหรือทำกระดาษเช็ดมือ

เอนไซม์ไคตินเนส (พูนสุข, 2539)

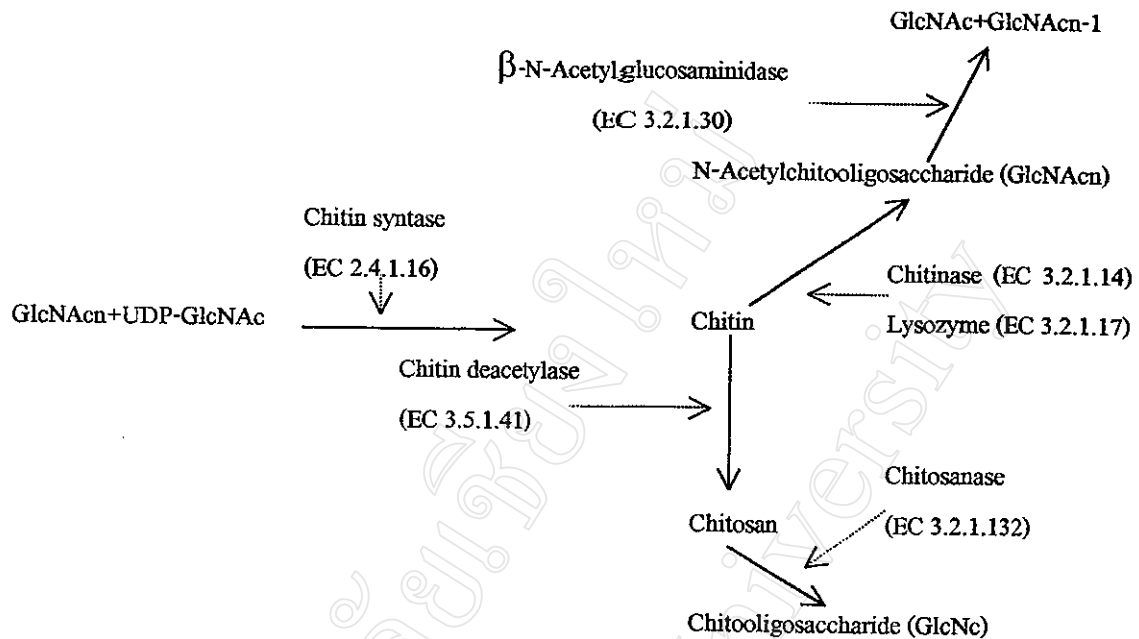
ไคตินเนส เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสลายไคติน ซึ่งเป็น unbranched polymer ของ N-acetylglucosamine (GlcNAc) แต่ละหน่วยของ GlcNAc จับกันด้วยพันธะ β -1,4

1. endochitinase

ปฏิกิริยาสลายไคตินเป็นแบบสุ่มเกิดที่พันธะ β -1,4 ตำแหน่ง ผลึกภัณฑ์ที่ได้ คือ oligomer ของ GlcNAc เช่น chitotetraose, chitotriose และ diacetylchitobiose เป็นต้น ภายในตำแหน่งต่างๆ ของโมเลกุลของไคติน เอนไซม์ที่มีกิจกรรมแบบนี้เช่น chitinase, chitasanase และ lysozyme

2. exochitinase

ปฏิกิริยาในการตัดโมเลกุลของไคตินจากปลายที่เป็น non-reducing end เข้ามาทีละครั้งให้ผลึกภัณฑ์เป็น diacetylchitobiose เรียกเอนไซม์ที่มี activity แบบนี้ว่า chitobiosidase และปฏิกิริยาของ exochitinase เกิดได้อีกลักษณะหนึ่งคือโดยการตัด GlcNAc ออกจากปลายที่เป็น non-reducing end ทีละครั้ง เรียกเอนไซม์ที่มี activity แบบนี้ว่า N-acetylglucosaminidase



แผนภูมิ 3 Participation of chitin-related enzymes in chitin metabolism (Koga, 1998)

แหล่งของไคตินที่พบในธรรมชาติ

โดยทั่วไปจะพบไคตินในสิ่งมีชีวิตที่มีไคติน เช่น *Arthropods* เชื้อราต่างๆ ซึ่งได้แก่ Ascomycetes, Basidiomycetes, Phycomycetes และ Deuteromycetes บทบาทของไคตินในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้คือการสร้าง exoskeleton ของ *Arthropods* และผนังเซลล์ของเชื้อรา ยังพบไคตินในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่มีไคตินอีกด้วย เช่น จุลินทรีย์ในดิน ระบบทางเดินอาหารของปลา และพืช มีรายงานการตรวจพบไคตินในพืชหลายชนิดเช่น ยาสูบ ข้าว ถั่ว น้ำยางพารา ข้าวสาลี และมะเขือเทศ เป็นต้น

1. สัตว์

Matsumiya *et al.* (1988) ได้ศึกษาไคตินจากปลาหมึกกล้วย (squid) 4 สายพันธุ์ ตรวจพบไคตินสบริเวณกระเพาะอาหาร ลำไส้ และตับ ซึ่งจะพบไคตินสสูงบริเวณตับ และยังพบในเปลือกหอยพัด เปลือกหอยแมลงภู (Mytilus edulis) และพบไคตินสใช้ในการลอกคราบของแมลงพวก *Bombyx mori*, *Manduca sexta* และแมลงสายพันธุ์อื่นๆ

2. ⁴ ॥४॥

เราสามารถพบไคตินในบริเวณที่พืชถูก infect จากเชื้อราก่อโรค พืช (2539) สกัดไคตินจากเมล็ดพืชพวก พืช กระถินพินาน นนทรีทอง ค้ำปู ไม้แดง สีเขียวคออสตรเลีย กระถินเทพา ข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ นนทรีป่า และ แคลฝรั่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค และ ยังพบไคตินในสาหร่ายทะเล (seaweed)

3. จุติบทวิชัย

แบบคำเรีย

โคคีนส์ที่ได้จากแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านสารควบคุมชีวภาพหรือใช้ย่อยสลายของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมทางทะเล (chitinous waste) เช่น เปลือกกุ้ง หัวกุ้ง กระดองปู เพื่อให้ได้โคคีนนำไปใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตสารที่มีคุณค่าต่อไป แบคทีเรียที่พบว่าสามารถผลิตโคคีนได้ ตัวอย่างเช่น *Bacillus cereus* (Wang and Hwang, 2001) *Vibrio alginolyticus* (Ohishi *et al.*, 1996) *Pseudomonas aeruginosa* (Wang, *et al.*, 1999) *Xanthomonas* sp. (Yamaoka *et al.*, 1999) *Aeromonas hydrophila* (Hiraga *et al.*, 1997) *Serratia marcescens* (Khoury *et al.*, 1997)

แอดคิโนมายซ์

โคตินีสที่พบในแอคติโนมัสซิสส่วนมากจะพบในกลุ่มของ *Streptomyces* เช่น *S. divaceoviridis* (Romaguera *et al.*, 1992) *S. kurssanovii* (Tikhonov *et al.*, 1998)

ខេត្ត ១

เอนไซม์โคติเนสที่พบในเชื้อราส่วนใหญ่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสารควบคุมชีวภาพ ควบคุมเชื้อราก่อโรคและแมลงศัตรูพืช ตัวอย่างเช่น *Beauveria bassiana* (Suresh and Chandrasekaran, 1998) *Penicillium ianthinellum* (Fenice et al., 1998) *Myrothecium verrucaria* (Vyas and Deshpande, 1991) *Paecilomyces varioti* (Gautam et al., 1996)

การนำโคตินีนไปใช้ประโยชน์ (Patil *et al.*, 2000, Shaikh and Deshpande, 1993)

1. ใช้เป็นสารควบคุมชีวภาพ

พืชหลายชนิดเมื่อถูก pathogen infect บริเวณที่ถูก infect จะมีการผลิต PR-protein like chitinase, β -1,3-glucanase, proteinase และ proteinase inhibitor เพื่อป้องกันตัวเอง โดยจะทำหน้าที่ในการย่อยไคตินที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคและเปลือกของแมลง Roberts and Selitrennikoff (1988) ศึกษาไคตินของพืชและไคตินของแบคทีเรียใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และไคตินของพืชจากเมล็ดข้าวสาลี บาร์เลย์ ข้าวโพด เป็นไคตินชนิด exo-chitinase

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พูนสุข (2539) ได้ศึกษาโคตินของเมล็ดพืชกระถินเทพา และเมล็ดแคฝรั่ง นำเอนไซม์ที่สกัดจากเมล็ดพืชมาทดสอบ antifungal activity พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Diplodia*, *Phytophthora* และ *Pestototiopsis* sp. เชื้อราที่สามารถยับยั้ง insect-pathogen ได้แก่ *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* และ *Verticillium lecanii*

2. ใช้เป็นสารควบคุมยุง

การแพร่ระบาดของยุงที่เป็นพาหะก่อโรคไข้หวัดสามารถพบได้ทุกประเทศ จำเป็นที่จะต้องมีการควบคุม มีการศึกษาใน *Myrothecium verrucaria* เป็นเชื้อราประเภท saprophytic สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cuticle ของแมลง จากการทดลองพบว่า crude enzyme ที่เตรียมได้จาก *M. verrucaria* สามารถฆ่า first instar และ fourth instar larvae ของยุง *Aedes aegypti* ที่เป็นพาหะโรคไข้เหลืองและไข้ส่าภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ crude enzyme พบว่าเป็น endo-chitinase.

3. ใช้ในการผลิต chitooligosaccharides

ตัวอย่าง chitooligosaccharides เช่น chitohexose และ chitoheptaose นำมาใช้เป็น anti-tumor ประโยชน์ของโคตินสามารถนำมาย่อยสลายโคตินให้ได้ chitooligosaccharides ตัวอย่างเช่น โคตินของ *Vibrio alginolyticus* นำมาย่อยโคตินได้ chitopentaose และ chitotriose โคตินของ *Serratia griseus* ใช้ย่อย colloidal chitin ให้ chitobiose ใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมตัวยับยั้งเอนไซม์

4. ใช้ในการผลิต single cell protein (SCP)

SCP ส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการใช้โคตินที่ย่อยสลาย chitinous waste นำไปใช้เป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิต SCP ต่อไป Vyas and Deshpande (1991) ใช้เอนไซม์โคตินจากเชื้อ *Myrothecium verrucaria* ย่อยสลายโคตินซึ่งโคตินที่ถูกย่อยสลายแล้วจะนำไปใช้เป็นสับสเตรทในการผลิต SCP โดย *Saccharomyces cerevisiae* ได้ปริมาณโปรตีน 61% และ กรดนิวคลีอิก 3.1% Revah-Moiseev and Carroad (1981) ใช้โคตินจากเชื้อ *S. marcescens* ย่อยสลาย chitinous waste และใช้ยีสต์ *Pichia kudriazevii* ผลิต SCP

5. ใช้ผลิต fungal protoplast

การทำ protoplast ของเชื้อราเพื่อนำมาศึกษา การสังเคราะห์ผนังเซลล์ การ secret ของ เอนไซม์ออกจากผนังเซลล์ การ transformant ของ steroid และการเกิด mutagenesis (Kelkar *et al.*, 1990) Hamlyn *et al.* (1981) เตรียม protoplast จากเชื้อราโดยใช้ไคตินเนสจำนวนมากย่อยสลาย เส้นใย การทำ protoplast เชื้อราอาจจะใช้เอนไซม์ชนิดเดียว (chitinase และ chitosanase) หรือใช้ เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันทำ protoplast ก็ได้ ได้มีการทำ protoplast ของ *Malbranchea sulfurea* มีคุณสมบัติเป็น thermophilic fungus โดยใช้ไคตินเนสและ laminarinase ซึ่งเป็น thermostable enzyme ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Paecilomyces varioti*

6. ใช้เป็นตัวติดตาม

ใช้ไคตินเนสเป็นตัวติดตามในวิธี chitin-binding protein เพื่อตรวจหาเชื้อราที่ infect ใน มนุษย์

7. ใช้ในการย่อยสลาย shellfish waste (Felse and Panda, 2000)

N-acetyl-D-glucosamine เป็น monomer ของไคติน นำไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมผลิตยา และการผลิตอาหาร เช่น เป็นสารที่ให้ความหวานและใช้เป็น growth factor N-acetyl-D-glucosamine เตรียมจากการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ด้วยสารเคมี กระบวนการแบบนี้ต้องใช้ต้นทุนสูงและมีปัญหาในด้านราคา N-acetyl-D-glucosamine จึงได้มีการใช้ไคตินมาผลิต N-acetyl-D-glucosamine ย่อยสลายไคตินจากเปลือกของสัตว์ทะเลที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ

การตรวจวัดไคตินเนส

1. Plate-clearing assay

การตรวจวัดกิจกรรมของไคตินเนส โดยการใช้ carboxymethyl chitin (CM-chitin) เป็น สับสเตรทผสมกับสีย้อม Remazol Brilliant Violet 5R ซึ่งจะทำให้ CM-chitin ติดสีย้อมด้วยพันธะ โควาเลนซ์ ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของ chitinolytic enzyme วัดกิจกรรมของไคตินเนสได้จากการเกิด clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหาร (Wirth and Wofl, 1990) Suginta *et al.* (2000) ตรวจวัดกิจกรรมของไคตินเนสโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร chitin agar plat ที่มีส่วนประกอบของ 1% (w/v) swollen chitin บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน พบ clear zone รอบแบคทีเรียที่ลงในอาหาร

2. Viscometric หรือ colourimetric

การตรวจวัดกิจกรรมของไคตินสจากการปลดปล่อย radioactive ของ oligosaccharide ซึ่งเกิดจากการติดฉลากบน insoluble chitin ซึ่งเป็นวิธีที่จำเพาะเจาะจงสูง (Suginta *et al.*, 2000)

3. ตรวจวัดปริมาณ reducing sugar หรือ end product ที่เกิดขึ้น

Dygart *et al.* (1965) ตรวจวัด reducing sugar โดยใช้สารละลายไคติน 0.5 ml (ไคติน 10 mg ละลายใน 0.2 M citrate-0.4M phosphate buffer pH 6.5 1 ml) เป็นสับสเตรทผสมเอนไซม์และน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ml นำไปบ่มที่ water bath อุณหภูมิ 37°C ใช้ stirred magnetic กวนให้เอนไซม์ผสมกับสับสเตรทนาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปตรวจวัด reducing sugar ที่เกิดขึ้น

Wood and Bhat (1988) ใช้ 0.2% colloidal chitin 200 μ l แล้วเติม crude enzyme 50 μ l บ่มที่ water bath อุณหภูมิ 50°C แล้วเติม Nelson-Somogyi reagent นำไปตรวจวัด reducing sugar ที่เกิดขึ้น

Roberts and Selitrennikoff (1988) ใช้ nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide และ nitrophenyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside เป็นสับสเตรทเมื่อมีกิจกรรมการย่อยสลายสับสเตรทเกิดขึ้นจะตรวจได้จาก p- nitrophenyl ที่เกิดขึ้น

Suresh and Chandrasekaran (1999) ใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรทผสม reaction mixture 0.5% (w/v) colloidal chitin 0.5 ml กับ 0.1M MacIlvain 's citrate phosphate buffer pH 6.0 0.5 ml และ เอนไซม์ที่เจือจาง 1 ml บ่มใน water bath อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงให้สับสเตรทตกตะกอนแล้วเติม DNS reagent นำไปตรวจวัด reducing sugar ที่เกิดขึ้น

4. วิธี Polyacrylamide gel eletrophoresis (PAGE)

Trudel and Asselin (1989) ตรวจวัดกิจกรรมของไคตินสโดยวิธี PAGE จะผสม glycol chitin ในเจล และติดฉลาก glycol chitin ด้วย Calcofluor white M2R ตรวจดูภายใต้แสง UV เมื่อมีกิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดเส้นสีดำที่บ

Wang and Hwang (2001) ตรวจวัดกิจกรรมของไคตินสโดยวิธี SDS-PAGE จะผสม CM-chitin-RBV 0.66 mg/ml ในเจล ภายหลังก็นำไปผ่านเครื่อง electrophoresis นำเจลไปบ่มใน 100 mM sodium phosphate buffer และ Triton-X-100 0.1% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง พบ clear zone ในเจล เนื่องมาจากมีการย่อย CM-chitin-RBV ด้วยเอนไซม์ไคตินสระหว่างการบ่ม

วิธีอื่นๆ ในการตรวจวัดกิจกรรมของไคตินสและการใช้สับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการหากิจกรรมของเอนไซม์ ตาราง 3

ตาราง 3 Substrate of chitinolytic enzymes and products measured (Patil *et al.*, 2000)

Product measured	Soluble substrates				Insoluble substrates			
	CMC/EGC/ HPC	Chio oligomers	4-MU- oligomers	p-NP- oligomers	CMC-RBV	Chitin colloidal chitin	[acetyl- ³ H] chitin	
Formation of reducing sugars	+	+				+	+	+
Release of Fluoro-/chromo- phore (electrophoresis)	+		+	+	+		+	
Formation of oligomers (HPLC, NMR)	+	+				+	+	
Decrease in degree of polymerization (viscosity)	+							
Decrease in degree of polymerization (straining)	+					+	+	

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Rolle, 1998)

ในกระบวนการหมักอาหารจะอาศัยวิธีการหมัก 2 แบบคือ เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักเพื่อย่อยสลาย แป้ง ไขมัน โปรตีน และ สารพิษ ปัจจุบันจุลินทรีย์เป็นแหล่งแรกที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ พบว่าได้จากราและยีสต์ 50% แบคทีเรีย 35% และอีก 15% เป็นเอนไซม์จากพืชและสัตว์ การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ทางการค้าจะใช้วิธีเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged fermentation ; SMF) และการหมักในสถานะของแข็ง (solid substrate fermentation ; SSF)

วิธีเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged fermentation ; SMF)

วิธี SMF จะผลิตเอนไซม์ในถังหมักหรือ flask ซึ่งจะมีการกวนให้อากาศ ภายใต้ระบบ batch หรือ fed-batch แต่วิธี SMF จำเป็นต้องใช้ต้นทุนและพลังงานสูง จึงทำให้เป็นสาเหตุที่ไม่สามารถพัฒนาระบบการหมักแบบ SMF ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ Gunaratna and Balasubramanian (1994) ผลิตโคตินเนสจาก *Acremonium obcavatum* ด้วยวิธี SMF โดยใช้ suspension ของโคนิเดีย 2 ml (1×10^6 conidia/ml) เติมลงในอาหาร Czapek Dox medium ประกอบด้วย ผงเนยเชลล์ของเชื้อ 0.1% และ colloidal chitin 0.1% บ่มที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 6 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที กรองเอาเส้นใยออกแล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปทดสอบ antagonist กับเชื้อก่อโรค *Puccinia arachidis* (groundnut rust)

Fenice *et al.* (1998) ผลิตโคตินเนสจาก *Penicillium janthinellum* P9 ในถังหมักแบบ Bench-Top Bioreactor ใช้เชื้อตั้งต้น $1.1 (2 \times 10^6 \text{ conidia/ml})$ ในอาหาร 2 l ประกอบด้วย colloidal chitin 15 g

ผสม CSL 0.5 g เติมน้ำป้องกันการเกิดฟอง silicic antifoam 0.5 g กวนด้วยความเร็ว 500 rpm อัตราการให้อากาศในถังหมัก 1.0 vvm อุณหภูมิ 28°C มี pH เริ่มต้น 5.0 ตรวจวัด chitinase activity สูงถึง 497 U/l

Felse and Panda (1999) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต extracellular chitinase จาก *Trichoderma harzianum* ภายในถังหมักด้วยระบบ batch fermentation สามารถผลิตโคตินเนสสูงสุดเท่ากับ 0.384 U ที่ pH 4.9 อัตราการให้อากาศ 1.5 l¹/นาที่ และอัตราการกวน 224 rpm

การหมักในสถานะของแข็ง (solid substrate fermentation ; SSF)

SSF ได้เปรียบกว่าวิธี SMF ตรงที่ใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าและใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีไม่ยุ่งยาก หลักการของการหมักแบบ SSF จะใช้สับสเตรทที่เป็นของแข็ง ภายใต้สภาวะ aerobic ไม่มี free water หรือมีในปริมาณต่ำ ไม่ต้องใช้เทคนิค aseptic มากนัก และสามารถป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ด้วย สถาบัน Central Food Technological Research Institute ประเทศอินเดีย ผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี SSF พบว่าให้ unit ของเอนไซม์สูงกว่าวิธี SMF ในกระบวนการหมักจะใช้สับสเตรทที่เป็นของแข็งทั้งทางอุตสาหกรรมการเกษตรหรืออุตสาหกรรมทางทะเล ตัวอย่างเช่นเปลือกถั่วเหลือง รำข้าวสาลี เปลือกมันสำปะหลัง เปลือกกุ้ง หัวกุ้ง และ กระดองปู เป็นต้น

นาริลักษณ์ (2542) ศึกษาการผลิตโคตินเนสโดยเชื้อรา *Basipetospora* CK44 ด้วยวิธี SSF โดยใช้เปลือกกุ้งเป็นสับสเตรทพบว่าเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) เป็นเวลา 16 วัน มีความชื้น 67% pH 5.0 มี colloidal chitin 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และ Na₂NO₃ 2% เป็นแหล่งไนโตรเจน วัดโคตินเนสได้สูงสุดเท่ากับ 34.5 mU/ml

Suresh and Chandrasekaran (1998) ผลิตโคตินเนสจาก marine fungus เชื้อ *Beauveria bassiana* ด้วยวิธี SSF ซึ่งมีเปลือกกุ้งเหลือทิ้งเป็นสับสเตรท ใช้เปลือกกุ้ง 5 g ในภาชนะ petri plate ผสม aged sea water ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว 5 : 2 (w/v) แล้วเติม inoculum 2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 27°C ความชื้น 90% จะให้ chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 248.0 U gDIS⁻¹ ที่ 120 ชั่วโมง ต่อมาในปี 1999 ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโคตินเนสของ *B. bassiana* ด้วยวิธี SSF อีกครั้งแต่ใช้ รำข้าวสาลี 5 g เป็นสับสเตรทมีขนาด 425 µm ขึ้นไป ผสมกับ 1% colloidal chitin 50 mg ใน petri plate เพิ่มความชื้นในระบบด้วยการเติม aged sea water อัตราส่วน 5 : 5 [สับสเตรท : sea water (w/v)] แล้วเติม suspension ของโคโคนิเซีย 2 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) ความชื้น 90% ให้ chitinase activity สูงสุดเท่ากับ 9.5 U gIDS⁻¹ เมื่อหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในรายงานจุลินทรีย์ที่ใช้ใน SSF ส่วนใหญ่เป็น filamentous fungi เนื่องจากมีความสามารถในการผลิต

extracellular enzyme ได้กว้างและเจริญในอาหารแข็งได้ดี ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราเช่น amylase, cellulase, pectinase และ glucoamylase พบว่า chitinase ของเชื้อราจะนำไปผลิต black koji ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมือง เชื้อราส่วนใหญ่ที่ใช้ในวิธี SSF เพื่อผลิตเอนไซม์นั้นจะเป็น marine fungus ที่มี คุณสมบัติทนเกลือได้ดีและสามารถผลิต metabolite ชนิดใหม่ๆ ได้ และเชื้อสามารถ ดูดซึมอาหารในสภาวะที่เป็นของแข็งได้ดี (Chandrasekaran, 1997)

การใช้จุลินทรีย์อื่นร่วมในการผลิตเอนไซม์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ผลิตไคตินจะใช้ไคตินหรือไคโตซานเป็นแหล่งคาร์บอน การเตรียมไคตินจะใช้หลักการกำจัดเกลือแร่และโปรตีนออกจากของเหลือทิ้งจำพวกเปลือกสัตว์ทะเล (shellfish waste) ซึ่งจะใช้กรดและด่างเข้มข้นในการกำจัดทำให้การผลิตเอนไซม์ชนิด chitinolytic enzyme ไม่แพงและสิ่งสำคัญคือสามารถนำ shellfish waste มาใช้ให้เกิดประโยชน์ไม่ก่อผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม การใช้เปลือกกุ้งเหลือทิ้งผลิตไคตินจากเชื้อ *Bacillus cereus*, *B. alvei* และ *B. sphaericus* โดยนำเปลือกกุ้งเหลือทิ้งไป treat ด้วยสารเคมีเพื่อให้ได้ไคติน (shrimp and crab shell powder ; SCSP) ออกมาเสียก่อน แล้วภายหลังการทดลองพบว่า 4% SCSP ชักนำการผลิตไคตินสของเชื้อ *B. cereus* และ 3% SCSP ชักนำการผลิตไคตินสของเชื้อรา *B. alvei* และ *B. sphaericus* ได้สูงสุด (Wang and Hwang, 2001)

แต่ก็ยังมีข้อเสียที่ต้องใช้กรดและด่างเข้มข้นซึ่งยังเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมเหมือนเดิม Yang et al. (2000) ใช้ protease จาก *Bacillus subtilis* Y-108 กำจัดโปรตีนออกจากเปลือกสัตว์ทะเล (crustacean waste) พบว่า protease กำจัดโปรตีนด้วยวิธี liquid phase fermentation ในเปลือกกุ้งกระดองปู และเปลือกกุ้ง lobster สามารถกำจัดโปรตีนได้ 88%, 67% และ 83% ตามลำดับ เปรียบเทียบการกำจัดโปรตีนด้วยวิธีใช้กรดพบว่ากำจัดโปรตีนได้ 76%, 62% และ 56% ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์จะให้ผลในการกำจัดโปรตีนออกจาก crustacean waste ได้ดีกว่า และได้มีการศึกษาในเชื้อ lactic acid bacteria (LAB) ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตกรดแลกติก และในการหมักเปลือกกุ้งกับ LAB จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ โปรตีนและ asthaxanthin การใช้ *Lactobacillus plantarum* 541 ร่วมกับ protease ในการกำจัดโปรตีนและแร่ธาตุออกจากเปลือกกุ้งเหลือทิ้งเพื่อผลิตไคติน เปลือกกุ้งเหลือทิ้งเหล่านี้จะมีองค์ประกอบของไคติน 8-10%, โปรตีน 30-35% และ แคลเซียม 10-20% พบว่าความสามารถในการกำจัดโปรตีนและแคลเซียมสูงเมื่อใช้ lactobacillus ร่วมกับ protease เปรียบเทียบกับการใช้ lactobacillus เพียงอย่างเดียว และใช้ protease เพียงอย่างเดียว การใช้เชื้อและเอนไซม์ร่วมกันในการกำจัดโปรตีนและแคลเซียมในเปลือกกุ้งเหลือทิ้ง ให้ผลในการกำจัดโปรตีน 90% และกำจัดแคลเซียมได้มากกว่า 50% แต่ในการ

ใช้ protease อย่างเดียวจะกำจัดโปรตีนได้รวดเร็ว เหมือนกับการใช้ *Lactobacillus* เพียงอย่างเดียว สามารถกำจัดแคลเซียมได้รวดเร็วเช่นกัน (Rao *et al.*, 1998) การใช้ *Lactobacillus* sp. เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปลือกกุ้งเหลือทิ้งผสม monohydrate glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทำการคัดแยกอาหารแข็งหลังหมักพบว่า ได้ของแข็งที่ละลายน้ำ 55% และของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ 45% ของแข็งที่ตกตะกอนประกอบด้วยไคติน โปรตีน pigment และแร่ธาตุ (Keiko *et al.*, 1998)

นอกจากจะมีการใช้เชื้อ LAB กำจัดโปรตีนและแร่ธาตุออกจากเปลือกกุ้งเหลือทิ้งเพื่อให้ได้ไคตินใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตไคตินาส แล้วยังมีการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *Pseudomonas aeruginosa* K-187 สามารถผลิต protease และ chitinase/lysozyme ใช้ในการกำจัดโปรตีนด้วยวิธี liquid phase fermentation ของ SCSP เปลือกกุ้ง และหัวกุ้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ถูกกำจัดออกไปเท่ากับ 55%, 48% และ 61% ภายหลังการหมัก 7, 5 และ 5 วันตามลำดับ ส่วนการกำจัดโปรตีนด้วยวิธี solid phase fermentation พบว่าเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ถูกกำจัดออกไปเท่ากับ 68%, 82% และ 81% ภายหลังการหมัก 10, 5 และ 5 วัน ตามลำดับ (Wang and Chio, 1998)

หลักในการใช้จุลินทรีย์อื่นๆร่วมในกระบวนการหมัก SSF คือใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นของแข็งเช่น เปลือกกุ้ง หัวกุ้ง และกระดองปู ให้ได้ไคตินออกมาเสียก่อนแล้วจะนำไคตินที่ได้ไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไคตินาส ทำให้ได้ไคตินาสที่มีราคาถูกและผลิตได้ในปริมาณสูง ทำให้ของเหลือทิ้งมีคุณค่าในการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

การใช้สับสเตรทอื่นๆ ร่วมในการผลิตเอนไซม์

จากที่กล่าวมาข้างต้นได้มีการใช้ของเหลือทิ้งในทางอุตสาหกรรมทางทะเลเช่น เปลือกกุ้ง หัวกุ้งและ กระดองปู มาเป็นสับสเตรทหรืออาหารแข็งในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตไคตินาส แต่ยังมีการใช้สารอาหารอื่นร่วมในการผลิตไคตินาสด้วยเช่นกัน ได้แก่ ข้าวโพดหมัก ฟางข้าว เปลือกมันสำปะหลัง รำข้าว รำข้าวสาลี และการใช้เชื้อราในการผลิตเอนไซม์ในวิธี SSF เนื่องจาก การเจริญของเชื้อราในกระบวนการหมักแบบ SSF สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมและมีความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตสูงมีองค์ประกอบของน้ำรวมอยู่ด้วย เป็นผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม ทำให้วัสดุเหลือทิ้งมีมูลค่าสูงขึ้นและเอนไซม์ที่ผลิตได้ก็จะมีราคาถูกลง

Berrocal *et al.* (2000) ศึกษาการใช้ฟางข้าวสาลีเป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยง *Streptomyces cyaneus* ด้วยวิธี SSF โดยวิเคราะห์ทางเคมีและโครงสร้างของฟางข้าวสาลีที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการหมัก พบกิจกรรม phenol oxidase เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีการย่อยสลาย

ลิกนิน 16.4% เมื่อศึกษาโครงสร้างของฟางข้าวสาธิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยเจริญอยู่ในบริเวณ phloem และ parenchyma ซึ่งมีปริมาณลิกนินต่ำ ในส่วนของ xylem และ sclerenchyma ซึ่งมีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ต่ำ

การผลิตไคตินเนสของ *Beauveria bassiana* ด้วยวิธี SSF ใช้รำข้าวสาธิตผสม colloidal chitin และ aged sea water เป็นสับสเตรท ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ในปริมาณมากและมีลักษณะการเจริญที่สม่ำเสมอภายในสับสเตรท ไคตินเนสที่ผลิตได้มีปริมาณ $9.5 \text{ U } \mu\text{IDS}^{-1}$ ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่าเชื้อจะเจริญอยู่ในรูปของ spore ส่งผลให้การกระจายของเชื้อในสับสเตรททั่วถึง (Suresh and Chandrasekaran, 1999)

ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นที่ใช้วิธี SSF ในการผลิต เช่น Ikasari and Mitchell (1994) ผลิต protease จาก *Rhizopus oligosporus* โดยใช้สับสเตรทหลายชนิดที่มีปริมาณโปรตีนสูงเปรียบเทียบในการผลิต (ตาราง 4) พบว่าในรำข้าวสาธิตให้ปริมาณ protease สูงสุดเท่ากับ $3.9 \times 10^5 \text{ PU/g solid substrate}$

ตาราง 4 Protease yield of *Rhizopus oligosporus* ACM 145F in several proteinaceous substrate (Ikasari and Mitchell, 1994)

Substrate	Protease yield
	$10^5 \text{ PU/g initial fresh substrate}$
Wheat bran	2.3
Wheat bran + soy flour (7:3, w/w)	2.1
Wheat bran + wheat flour (7:3, w/w)	2.5
Wheat bran + soy oil (9:1, w/w)	2.1
Soy bean	0.2
Soy bean + rice flour (7:3, w/w)	0.3
Soy bean + wheat flour (7:3, w/w)	0.2
Rice	0.2
Rice + rice bran (7:3, w/w)	2.6
Rice + soy flour (7:3, w/w)	1.5
Rice bran	3.9
Rice bran + wheat flour (7:3, w/w)	1.9
Rice bran + cassava starch (7:3, w/w)	1.4

Ortega *et al.* (1993) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์และการย่อยสลายสับสเตรทของ white rot fungi (*Pleurotus* spp.) เพาะเลี้ยงบนอาหารกากขานอ้อยด้วยวิธี SSF พบว่า *Pleurotus* spp. 2 สายพันธุ์ สามารถย่อยขานอ้อยให้น้ำหนักแห้งรวมลดลง 50% ภายใน 60 วัน กากขานอ้อยมีส่วนประกอบของเซลลูโลส (cellulose) 35% เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 30% และ ลิกนิน (lignin) 12% (w/w) เชื้อจะย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส และ ลิกนินได้อย่างรวดเร็ว กิจกรรมของเอนไซม์ที่พบคือ laccase (phenoloxidase), cellulase และ xylanase

Gupte and Madamwar (1997) ผลิต cellulase และ β -glucosidase ของ *Aspergillus ellipticus* ร่วมกับ *A. fumigatus* ด้วยวิธี SSF โดยมีวัสดุเหลือทิ้งที่มีส่วนประกอบของ ลิกนินและเซลลูโลส (lignocellulosic) เป็นสับสเตรท ได้แก่ ขานอ้อย รำข้าวสาลี ฟางข้าวสาลี ฟางข้าว และเปลือกถั่วลิสง พบว่าขานอ้อยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนี้ exoglucanase 14.11 U g^{-1} , endoglucanase 14.55 U g^{-1} และ β -glucosidase 21.66 U g^{-1} และในเปลือกถั่วลิสงมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุดดังนี้ exoglucanase 5.40 U g^{-1} , endoglucanase 5.49 U g^{-1} และ β -glucosidase 12.96 U g^{-1} สาเหตุที่ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันในแต่ละสับสเตรท ขึ้นกับองค์ประกอบของเซลลูโลสและลิกนินในสับสเตรท การกระจายของลิกนินในสับสเตรทระหว่างการเตรียมสับสเตรท คุณสมบัติที่เปลี่ยนไปของเซลลูโลสเมื่อผ่านการย่อยสลาย ความไม่จำเพาะต่อการดูดซึมสับสเตรทของ cellulase และกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของ cellulase ไม่ทำงาน (Romos *et al.*, 1992) ในเปลือกถั่วลิสงมีผลึกของเซลลูโลสจึงส่งผลต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ในสับสเตรทลดลง ส่วนขานอ้อยมีปริมาณของกลุ่มกลูโคสมากจึงทำการเจริญของเชื้อราดีกว่าทำให้มีการผลิตเอนไซม์สูง การใช้ cocultures ระหว่าง *A. ellipticus* กับ *A. fumigatus* ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นเพราะมีการแข่งขันในการเจริญของเชื้อทั้งสอง ทำให้ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายสับสเตรทได้สูง

Dorta *et al.* (1996) ศึกษาคุณสมบัติการเจริญและการเกิด spore ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในการเพาะเลี้ยงแบบ SSF โดยใช้อาหารพื้นฐานเป็นสับสเตรทเปรียบเทียบกับ การเติมสารอาหารชนิดอื่นลงไปเช่น รำข้าว และแกลบ พบว่าในรำข้าวเชื้อรามีอัตราการเจริญ 0.08 h^{-1} และผลิต spore ได้ $2.3 \times 10^{10} \text{ spore g}^{-1}$

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอส

ได้มีรายงานวิจัยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ตาราง 5 และ ตาราง 6

ตาราง 5 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินเอสของจุลินทรีย์บางชนิด

จุลินทรีย์	องค์ประกอบ ของอาหาร	สภาวะที่เหมาะสม	วิธีการผลิต	กิจกรรม ไคตินเอส	อ้างอิง
<i>Geotrichum</i> B11	0.5% colloidal chitin (NH ₄) ₂ SO ₄	หัวเชื้อตั้งต้น 8% Temperature: 37°C Time: 3 days pH 5.5	SMF	225 mU/ml	มยุรา, 2539
<i>Chromobacterium</i> <i>Violaceum</i> D5	1% colloidal chitin 1.5% urea 0.03% MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.03% CaCl ₂ ·6H ₂ O 1% tract element	Room Temp. Time: 2 days pH 7.0	SMF	46.92 mU/ml	สุดาพร, 2540
<i>Basipetospora</i> CK44	เปลือกกุ้ง 2% NaNO ₃ 1% colloidal chitin	Room Temp. Time: 16 days pH 5 Moisture 67%	SSF	34.5 mU/ml	นารัตกษณ์, 2542
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> S1-13	Basal medium 3ml 0.1%(NH ₄) ₂ SO ₄ เปลือกกุ้ง:ข้าวโพดหมัก (1:1)	spore suspension 30.8% Temperature: 37°C Time: 11 days pH 5	SSF	110.9 mU/ml	นพกาญจน์, 2543
<i>Pseudomonas</i> <i>psedomelli</i>	4% colloidal chitin	Temperature: 35°C pH 7	SMF	135 U/ml	Suresh <i>et al.</i> , 1995
<i>Streptoverticillum</i> sp.	8% colloidal chitin from prawn waste 9% NaCl	Temperature: 28°C pH 9 Time: 5 days	SMF	3025 U/ml	Chandrasekaran, 1997
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	12.5 kg/m ³ chitin 4.2 kg/m ³ (NH ₄) ₂ SO ₄ peptone urea	Temperature: 28°C pH 5.6	-	0.197 U	Kapat <i>et al.</i> , 1996

Figure 6 A brief summary of bacteria studies on production of microbial chitinases

(Felse and Panda, 2000)

Organism	Medium composition (kg/m ³)	Fermentation conditions	Mode of operation	Maximum enzyme activity	Assay method
<i>Bacillus lichiniiformis</i>	Colloidal chitin, 5.0; N-acetyl glucoseamine, 5.0; Yeast extract, 1.0; MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.5; Na ₂ HPO ₄ , 3.4; NH ₄ NO ₃ , 2.0; KH ₂ PO ₄ , 1.0; NaCl, 0.5	Volume: 3 l, pH = 7.0 Temperature: 50 °C Aeration: 1VVM Fermentation time: 48 h	Batch	Chitinase I: 13.7 mU Chitinase II: 3.5 mU Chitinase III: 3.1 mU Chitinase I: 2.8 mU	Reducing sugar equivalent
<i>Nocardia orientalis</i>	Colloidal chitin, 5.0; N-acetyl glucoseamine, 5.0; Yeast extract, 0.1; MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5; K ₂ HPO ₄ , 0.7; KH ₂ PO ₄ ; peptone, 2.0	Volume: 1 l, pH = 5.0 Temperature: 28 °C Fermentation time: 96 h	Batch	1.278 U	Reducing sugar equivalent
<i>Serratia marcescens</i>	(NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.0; MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.3; K ₂ HPO ₄ , 1.5; Chitin, as required; glucose, as required	Volume: 750 ml for continuous culture studies and 14L for batch studies pH = 8.0 Temperature: 30 °C Fermentation time: 100 h	Batch and continuous	2 × 10 ⁻² U	Reducing sugar equivalent
<i>Serratia marcescens</i> 990E	Purified chitin, 10; yeast extract, 0.5; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.0; MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.3; K ₂ HPO ₄ , 1.36	Volume: 6 l, pH = 8.5 Temperature: 30 °C Aeration rate 6 l min ⁻¹	Batch and fed batch	34 U	Reducing sugar equivalent
<i>Talaromyces emersonii</i>	Chitin, 10–20; plus mineral medium	Volume: 8 l, pH = 5.0 Temperature: 45 °C Fermentation time: 240 h Aeration rate: 8 l min ⁻¹ Agitation rate: 200 rpm	Batch	0.45 μmol · h ⁻¹ · ml ⁻¹	Reducing sugar equivalent
<i>Streptomyces cinereoruber</i>	<i>A. niger</i> cell wall, 5.0; yeast extract, 50; MgSO ₄ · 7H ₂ O, 1.0; K ₂ HPO ₄ , 2.0; FeSO ₄ · 7H ₂ O, 0.1	Volume: 20 l, pH = 6.8 Temperature: 30 °C Fermentation time: 96 h Aeration rate: 1 VVM Agitation rate: 500 rpm	Batch	17 U	Viscometric method
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Squid chitin, 5.0; glucose, 6; peptone, 7.5; yeast extract, 2; K ₂ HPO ₄ , 2; sea water, 75% (v/v)	Volume: 20 l, pH = 7.0 Temperature: 37 °C	Batch	Chitinase C1: 3.3 U/mg protein Chitinase C2: 5.8 U/mg protein	Reducing sugar equivalent
<i>Trichoderma viride</i> F-9	Chitin, 10; plus mineral medium	Volume: 5 l, pH = 7.0–8.0 Temperature: 40 °C	Batch	–	Reducing sugar equivalent
<i>Trichoderma harzianum</i>	Chitin 12.5; plus mineral salts	Volume: 2 l, pH = 4.9 Temperature: 30 °C Fermentation time: 120 h Aeration rate: 1.5 VVM Agitation rate: 224 rpm	Batch	0.391 U	Reducing sugar equivalent