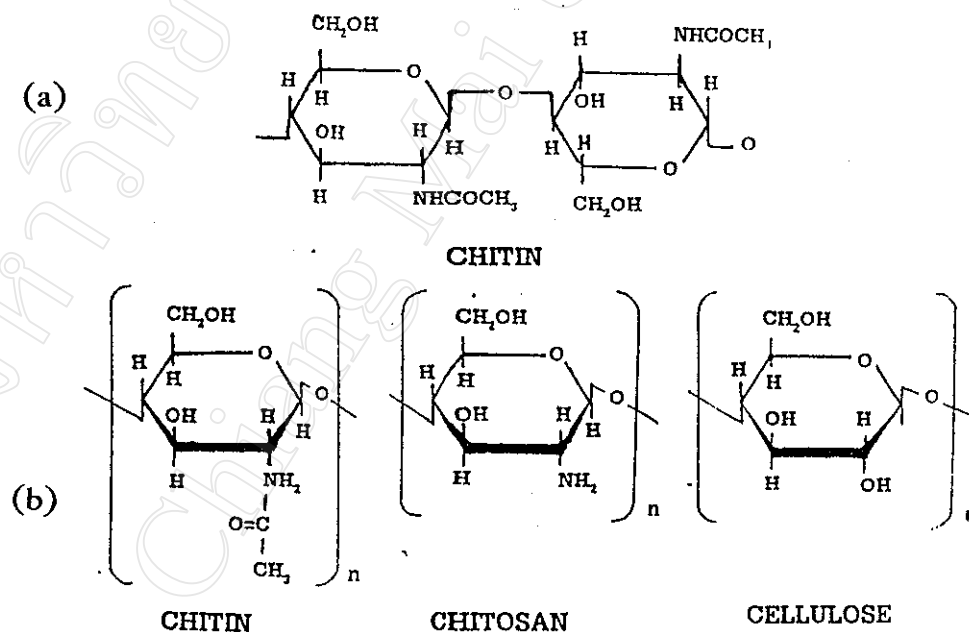


บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไคติน เป็นสารโพลิเมอร์จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจากสารที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ โดยที่ไคตินเป็นโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ แหล่งวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเป็นไคติน คือ สัตว์ที่มีเปลือก มีกระดองแข็งหุ้มตัว ทั้งที่เป็นสัตว์บก เช่น แมลงสาบ ตัวไหม และสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู ฯลฯ

ไคตินและไคโตซาน (อนุพันธ์ของไคติน) เป็นสารประเภทโพลิแซคคาไรด์ ที่ประกอบด้วย N-acetylglucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วย β -1,4-linked คล้ายกับโครงสร้างของเซลลูโลสที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย D-glucose ไคตินที่สูญเสีย acetyl groups จะกลายเป็นไคโตซานซึ่งมีโครงสร้างดังภาพ 1



ภาพ 1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส (อ้างโดย นาริลักษณ์, 2542)

- a) โครงสร้างของไคติน
- b) เปรียบเทียบโครงสร้างของไคติน ไคโตซานและเซลลูโลส

ผนังเส้นใยของฟังไพบว่ามีไคตินและไคโตซานเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของฟังไจ ดังตาราง 1

ตาราง 1 โพลีเมอร์หลักที่พบในผนังเซลล์ของฟังไจ

Taxonomic group	More fibrous polymers	More gel-like polymers
<i>Basidiomycetes</i>	Chitin β -(1-3), β -(1-6)-Glucan	Xylomanoproteins α -(1-3)-Glucan
<i>Ascomycetes</i>	Chitin β -(1-3), β -(1-6)-Glucan	Galactomanoproteins α -(1-3)-Glucan
<i>Zygomycetes</i>	Chitin Chitosan	Polyglucuronic acid Glucuronomanoproteins
<i>Chytridiomycetes</i>	Chitin Glucan	Polyphosphate Glucan
<i>Hyphochytridiomycetes</i>	Chitin Cellulose	Glucan
<i>Oomycetes</i>	β -(1-3), β -(1-6)-Glucan Cellulose	Glucan

ที่มา : Gow and Gadd, 1995.

ไคตินและไคโตซานมีคุณสมบัติเด่นคือไม่ก่อปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเหมือนสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากกรรมวิธีทางเคมี เช่น พลาสติก โฟม ฯลฯ ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไคตินและไคโตซาน รวมทั้งการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

ประโยชน์ของไคตินและไคโตซาน

1. การใช้เป็นใยอาหาร

เนื่องจากไคตินมีโครงสร้างทางไบโอโพลีเมอร์คล้ายกับเซลลูโลส คือมีลักษณะเป็นมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) มีอัตราการย่อยสลายและการละลายต่ำ ไคตินมีความแข็งแรง คงตัวและไม่เป็นพิษ จึงนิยมใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด เช่น ขนมปัง จะช่วยทำให้ขนมปังฟู ทั้งยังให้คุณค่าทางอาหารสูงและไม่ทำให้สีหรือกลิ่นของขนมปังเปลี่ยนแปลงขณะที่มีกาบอบอีกด้วย

2. การบรรจุผลิตภัณฑ์

ไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นฟิล์มที่ดีมาก สามารถนำมาเคลือบบนกระดาษได้ กระดาษเคลือบไคโตซานนี้ใช้ห่อเนื้อปลาและเนื้อสัตว์อื่นที่เป็นอาหารได้ดี ปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้น เนื่องจากแผ่นไคโตซานทนความร้อนได้ดี ไม่เป็นพิษ ง่ายต่อการกำจัด และไม่มีสารตกค้างเหมือนพลาสติก จึงสามารถช่วยลดมลภาวะเป็นพิษได้ด้วย

3. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

สามารถสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง ขณะเดียวกันก็เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ โดยเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วยไคตินได้ไคติเนส ซึ่งเอนไซม์นี้จะย่อยไคตินเป็นโมเลกุลย่อยคือ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นสารที่มีคุณค่าทางอาหารสูงมากเมื่อนำไปเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์สำหรับทำขนมปัง หรือ ยีสต์สำหรับผลิตอาหารสัตว์

4. การประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์

มีการใช้ไคโตซานในการรักษาบาดแผล ทำเนื้อเยื่อเทียม ทำคอนแทคเลนส์ และใช้เกี่ยวกับศัลยกรรมตกแต่งผิวหนัง และยังใช้เป็นส่วนผสมในยาบางชนิดอีกด้วย

5. การกำจัดสารที่ไม่ต้องการ

ไคตินใช้ในการกำจัดโลหะหนักบางชนิดออกจากสารละลาย เช่น ยูเรเนียม และพลูโตเนียม จึงสามารถใช้ไคตินในการกำจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ ไคโตซานใช้ในการกำจัดแทนนินและลดความเป็นกรดของผงกาแฟสกัดได้เป็นอย่างดี (วิไล, 2536)

เอนไซม์ไคติเนส

ไคติเนสเป็น multi-complex enzyme โดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. endo-chitinase หรือ chitinase (EC 3.2.1.14)
2. exo-chitinase หรือ N-acetylglucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) บางครั้งจะใช้คำว่า chitobiase

Endo-chitinase จะย่อยไคตินแบบสุ่มภายในสายของโพลิเมอร์แล้วได้เป็น multimer ของ N-acetylglucosamine ซึ่งส่วนมากเป็น diacetylchitobiose และได้ triacetylchitotriose บ้างเล็กน้อย ในขณะที่ N-acetylglucosaminidase จะย่อยจากปลายด้าน non-reducing ของสายไคตินได้เป็น chitobiose หรือ N-acetylglucosamine โมเลกุลเดี่ยว การแบ่งเอนไซม์ไคติเนสออกเป็น exo-chitinase และ endo-chitinase จะขึ้นกับชนิดของสับสเตรทเช่น chitinase complex ที่สร้างจากเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* จะย่อย pure crystalline β -chitin ของ diatom spines จากด้าน non-

reducing เท่านั้น และได้ผลิตภัณฑ์จากการย่อยเป็น diacetylchitobiose แต่ถ้าสับสเตรท เป็น colloidal chitin จะได้ oligomer ผสมกับ diacetylchitobiose (Shaikh and Deshpande, 1993; Tronsmo and Harman, 1993; Haran *et al.*, 1995)

การนำเอนไซม์ไคตินเนสไปใช้ประโยชน์

1. ตรวจหาตำแหน่งของไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์โดยใช้สารประกอบของ chitinase และ chitosanase-gold

ในผนังเซลล์ของฟังไจส่วนมากพบสารพวกโพลีแซคคาไรด์มากกว่า 80% ซึ่งจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับสัณฐาน การเรียงตัวของเซลล์ และการแทรกผ่านผนังเซลล์ของโฮสต์ ไคตินและไคโตซานเป็นโพลิเมอร์ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในผนังเซลล์ของฟังไจ การทราบตำแหน่งของไคตินและไคโตซานอาจทำให้ทราบถึงหน้าที่พิเศษของโพลิเมอร์นี้

การใช้ lectins (ซึ่งมีการจับแบบจำเพาะกับโมโนแซคคาไรด์) ที่จับอยู่กับ colloidal gold สามารถใช้หาตำแหน่งของน้ำตาลในชิ้นส่วนพืชและฟังไจที่ตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ได้ chitinase-gold complex สามารถใช้เป็นตัวติดตามหาตำแหน่งไคโตซานในสปอร์และผนังเซลล์ของฟังไจ

2. เทคโนโลยีการเตรียมโปรโตพลาสจากฟังไจ

การแยกโปรโตพลาสจากฟังไจมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา เพราะโปรโตพลาสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้ศึกษาการสร้างผนังเซลล์ การขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ การเปลี่ยนรูปของสเตียรอยด์ และศึกษาเกี่ยวกับสารก่อมะเร็ง เพราะไคตินเป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้างของผนังเซลล์ของฟังไจ เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินจึงมีบทบาทสำคัญในการแยกโปรโตพลาสจากฟังไจ การใช้เอนไซม์ไคตินเนสในระดับสูงช่วยให้แยกโปรโตพลาสจากเส้นใยของฟังไจได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ mycolytic enzyme ร่วมกับเอนไซม์ไคตินเนส จะทำให้ได้โปรโตพลาสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งเป็นที่ต้องการมากสำหรับเทคโนโลยีด้านโปรโตพลาสในปัจจุบัน

3. การเตรียม Chito-oligosaccharides

Chito-oligosaccharides นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้หลายทาง เช่น ใช้ลดความเข้มข้นของพลาสมาเมื่อมีโคเลสเตอรอลสูง ช่วยเร่งบาดแผลให้หายเร็ว กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (chitohexose, chitoheptose) และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่เดิม chito-oligosaccharides เตรียมได้จากการย่อยไคตินด้วยกรดหรือด่างซึ่งให้ผลผลิตต่ำ ต่อมาพบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ให้ผลดีกว่าเพราะสามารถกำหนดขนาดของโมเลกุลได้ และเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง ความต้องการเอนไซม์ไคตินเนสจึงมีมากขึ้น

4. สารควบคุมทางชีวภาพ

ไคติน เป็นโครงสร้างที่สำคัญในผนังเซลล์ของเชื้อรา และพบในเปลือกหุ้มตัวของแมลงก่อโรคของพืช แต่ไม่พบว่ามียูนิแคนต์ในพืช จึงอาจใช้ไคตินเป็นโมเลกุลเป้าหมายสำหรับสารฆ่าเชื้อรา และแมลงที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ไคติเนสให้กว้างขวางยิ่งขึ้น เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียหลายชนิดถูกใช้เป็นสารต้านทานเชื้อรา เช่น เอนไซม์ไคติเนสจาก *Serratia marcescens* ใช้ร่วมกับ β -glucanase, propane-2-ol และ polyoxyethylene lauryl ether โดยฉีดพ่นในไร่ข้าวเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* และมีรายงานว่า *S. marcescens* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าของต้นฝ้ายที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยทดลองในเรือนเพาะชำ

5. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว

มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เอนไซม์ไคติเนสเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งที่มีไคตินจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ ซึ่งโปรตีนเซลล์เดี่ยวนี้อาจนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีรายงานว่าสามารถใช้เชื้อ *Myrothecium verrucaria* ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้และเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไคตินได้โปรตีนเซลล์เดี่ยวที่ผลิตได้จะมีโปรตีนทั้งหมด 61% และมีกรดนิวคลีอิก 3.1%(Shaikh and Deshpande, 1993)

การตรวจวัดเอนไซม์ไคติเนส

การตรวจสอบการย่อยสลายไคตินทำได้ยากเนื่องจากไคตินไม่ละลายน้ำและยังคงมีหมู่ acetyl เกาะอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ในขณะที่ถูกย่อยหมู่ acetyl จะถูกกำจัดออกไปและบริเวณที่เอนไซม์ไปจับเพื่อทำปฏิกิริยาก็มีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงมีการใช้สับสเตรทหลายชนิด ทั้งสับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีทางเคมีและสับสเตรทตามธรรมชาติ เช่น อนุพันธ์ของ p-nitrophenol เพื่อตรวจวัดการทำงานของ endo-chitinase และ N-acetylglucosaminidase วิธีตรวจวัดเอนไซม์ไคติเนสแบ่งได้เป็น 5 กลุ่มคือ

1. Viscometric assay

เป็นการตรวจวัด chitinase activity จากความหนืดของสารละลายสับสเตรทถึงแม้ว่าไคตินตามธรรมชาติและ colloidal chitin จะไม่ละลายน้ำ แต่มีอนุพันธ์ของไคตินหลายตัวที่ไม่ละลายน้ำและทำให้สารละลายสับสเตรทที่เตรียมได้มีความหนืด การย่อยโดยเอนไซม์ไคติเนสแบบสุ่มทำให้สลายไคตินสั้นลงและความหนืดลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งตรวจวัดได้โดยใช้ viscometer อัตราความหนืดที่ลดลงของสับสเตรทคือการทำงานตามความเข้มข้นของเอนไซม์ (Jeuniaux, 1996)

วิธีนี้เป็นประโยชน์สำหรับการหาค่าโดยประมาณในระหว่างการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์หรือในการศึกษาด้านไคเนติก แต่ความหนืดที่ลดลงอาจเกิดจากวิธีการเตรียมสับสเตรทหรือปัจจัยอื่นๆ

ด้วย ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้วัด chitinase activity ที่แท้จริง (Stirling et al., 1979) Okazaki and Tagawa (1991) ใช้วิธีนี้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Streptomyces cinereoruber* และการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีวิธีโดยย่อคือ นำสารละลายเอนไซม์ 0.2 ml ไปผสมกับ ethylene glycol chitin (มีความเข้มข้น 0.2% ใน McIlvaine buffer pH 4.5) 10 ml บันทึกเวลาที่ใช้ในการทำให้ specific viscosity ของสารละลายผสมลดลงครึ่งหนึ่ง ค่า specific viscosity วัดโดยใช้ Ostwald viscosimeter และกำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ไคตินเนสคือ ปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ความหนืดของสารละลายผสมลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 30 นาที ที่ pH 4.5 และอุณหภูมิ 30 °C

2. การตรวจวัดจากปริมาณ end-product ที่เกิดขึ้น

เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายใต้สภาวะที่กำหนด ไคตินจะถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้เป็น reducing sugar การวัดอัตราการปลดปล่อย N-acetylglucosamine จากไคตินเป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจวัด chitinase activity โดยทั่วไปนิยมใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท ส่วน reducing sugar หรือ N-acetylglucosamine ที่เป็นอิสระมีวิธีวัดหลายวิธีเช่น

2.1 Imoto and Yagishita method

เป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีของ Schales ใช้ตรวจวัด reducing group ที่เกิดจากการทำงานของ lysozyme และใช้ glycol chitin เป็นสับสเตรท โดยเตรียม reaction mixture ประกอบด้วย glycol chitin (0.05% w/v) 1 ml และสารละลาย lysozyme 0.5 ml (ทำให้สารละลายทั้งสองมี pH 4.5 ด้วย 0.1 M acetate buffer pH 4.5) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม color reagent 2 ml (เตรียมโดยละลาย potassium ferricyanide 0.5 g ใน 0.5 M sodium carbonate 1 litre และเก็บในขวดสีชา) นำไปต้มทันทีเป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำให้เย็นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 420 nm และใช้ N-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน ปริมาณ N-acetylglucosamine ที่ตรวจพบจะอยู่ในช่วง 0-0.15 mg วิธีนี้จึงมีความไวพอสำหรับการตรวจวัด reducing sugar ที่เกิดจากการทำงานของ lysozyme (Imoto and Yagishita, 1971)

Mitsutomi et al. (1995) ใช้วิธีนี้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อ *Streptomyces griseus* HUT 6037 โดยตรวจวัด chitinase activity ใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย glycol chitin (0.2% w/v ใน McIlvaine buffer pH 6.0) 1.4 ml และสารละลายเอนไซม์ 0.1 ml บ่มพร้อมกับเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที การตรวจสอบความจำเพาะกับสับสเตรทของเอนไซม์ไคตินเนสที่ทำให้บริสุทธิ์ (มี 2 ชนิดคือ chitinase C-1 และ chitinase C-2) ทำโดยใช้สับสเตรท 5 ชนิดคือ powdered chitin, colloidal chitin, glycol chitin, CM-chitin, 53% deacetylated chitosan และ 96% deacetylated chitosan ทำใน reaction mixture ที่ประกอบด้วยสารละลายสับสเตรท (0.2% w/v ใน 0.1M acetate buffer pH 5.0) 1.4 ml และสารละลายเอนไซม์ 0.1 ml บ่มพร้อมกับเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.2 Miller method

เป็นการวัด reducing sugar โดยใช้ dinitrosalicylic (DNS) reagent ซึ่ง Joshi *et al.* (1989) ใช้ในการศึกษาเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Serratia liquefaciens* โดยตรวจวัด chitinase activity ใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย crude enzyme 0.3 ml และ swollen chitin (1% ใน 0.05 M phosphate buffer pH 6.6) 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS reagent 0.75 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไปเหวี่ยงแยกเพื่อนำส่วนใสไปวัดค่า absorbance ที่ 530 nm ใช้ N-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐานกำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ไคตินเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด N-acetylglucosamine 0.5 mol ในเวลา 1 ชั่วโมง

Ulhoa and Peberdy (1991) ศึกษา chitinase activity จาก *Trichoderma harzianum* โดยใช้สภาวะในการตรวจสอบคือ reaction mixture ประกอบด้วย 0.5% swollen chitin (ละลายใน 50 mM sodium acetate buffer pH 5.2 และ 0.02% sodium azide) 1 ml และสารละลายเอนไซม์ 1 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 ถึง 24 ชั่วโมงใน shaking water bath แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสไปวัดปริมาณ N-acetylglucosamine ในสารละลายที่กรองได้โดยวิธี DNS ที่ความยาวคลื่น 575 nm กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1 μ mol ในเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 °C

2.3 Reissing method

เป็นการวัด N-acetylamino sugar โดยใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde reagent (DMAB) Ulhoa and Peberdy (1992) ใช้วิธีนี้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อ *Trichoderma harzianum* โดยตรวจวัด chitinase activity ใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย swollen chitin (0.5% ใน 50 mM acetate buffer pH 5.2) 0.2 ml และสารละลายเอนไซม์ 0.2 ml บ่มพร้อมกับเขย่าที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสไปวัดปริมาณ N-acetylglucosamine และใช้ N-acetylglucosamine ทำกราฟมาตรฐานและในสภาวะเดียวกันนี้ก็ตรวจวัด reducing sugar โดยใช้ Miller method ด้วยเพราะเอนไซม์ไคตินเนสมักไม่ทำให้เกิด N-acetylglucosamine อิสระ

วิธีตรวจวัด reducing sugar โดยใช้ DMAB reagent ทำได้โดยเติม 0.8 M sodium tetraborate 0.1 ml ลงใน reaction mixture แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในถาดน้ำแข็ง จากนั้นเติม DMAB reagent 3.0 ml แล้วอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที นำมาวัดค่า absorbance ที่ 585 nm วิธีตรวจวัด reducing sugar ด้วย DMAB reagent นี้จะจำเพาะกับ N-acetylglucosamine เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ DNS reagent หรือวิธี

Nelson-Somogyi copper reduction พบว่าค่าของ chitinase activity ที่คำนวณได้จากวิธี Nelson-Somogyi จะสูงกว่าค่าที่คำนวณได้จากวิธี DMAB 30% (Reid and Ogrydziak, 1981)

3. Chromogenic assay

เป็นการตรวจวัด chitinase activity โดยใช้ chromogenic substrate เช่น 3,4-dinitrophenyl-tetra-N-acetylchitotetraose เมื่อสับสเตรทถูกย่อยจะเกิดสีขึ้นซึ่งปริมาณสีที่เพิ่มขึ้นสามารถวัดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ข้อดีของวิธีนี้คือรวดเร็วและมีความไวสูง แต่มีข้อเสียคือไม่ค่อยมีความจำเพาะกับเอนไซม์ไคติเนส (Stirling et al., 1979) Pedraza-Reyes and Lopez-Romero (1991) ใช้วิธี chromogenic assay ในการศึกษา chitinase activity ใน germinating cells ของเชื้อ *Mucor rouxii* โดยใช้ chitin azure เป็นสับสเตรทใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย เอนไซม์ 0.5 ml และสารละลายสับสเตรท (1mg ใน phosphate-magnesium buffer pH 6.5) 0.5 ml บ่มพร้อมกับเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสนำไปวัดค่า absorbance ที่ 575 nm กำหนดให้ 1 unit ของเอนไซม์ไคติเนส คือ ปริมาณของเอนไซม์ไคติเนสที่ทำให้เกิดการปลดปล่อย RBV (Remazol brilliant blue) ในปริมาณที่เทียบเท่ากับ RBV ที่ให้ค่า absorbance ที่ 575 nm เท่ากับ 0.001

วิธีการวัดปริมาณเอนไซม์ไคติเนส โดยทั่วไปมักไม่สามารถบอกชนิดของเอนไซม์ได้ว่าเป็น N-acetylglucosaminidase หรือ endo-chitinase และมักจะยุ่งยากและใช้เวลานาน Tronsmo and Harman (1993) จึงได้เสนอวิธีตรวจหาและวัดปริมาณ N-acetylglucosaminidase, chitobiase และ endo-chitinase โดยทำบนเจลและในสารละลาย การตรวจหาเอนไซม์บนเจลทำได้โดยนำ crude enzyme มาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด pore size 0.45 μ m แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำ dialysis ที่อุณหภูมิ 23 °C ในสารละลาย potassium phosphate เข้มข้น 50 mM ที่ pH 6.7 และเติม polyethylene glycol นำสารละลายที่ทำให้เข้มข้นแล้วไปผ่าน gel filtration columns (ใช้ Bio-Gel-P-100 ของ Biorad Laboratories) จากนั้นนำตัวอย่างไปแยก N-acetylglucosaminidase, chitobiase และ endo-chitinase บน starch หรือ polyacrylamide electrophoresis gels แล้วเททับเจลด้วย agarose ที่มี 4-methylumbelliferyl ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ N-acetyl- β -D-glucosaminide เพื่อตรวจหา N-acetylglucosaminidase และใช้ β -D-N'-N'-diacetylchitobiose หรือ β -D-N'-N''-triacychitotriose สำหรับตรวจหา chitobiosidase และ endo-chitinase จากนั้นนำไปตรวจดูแถบของเอนไซม์ซึ่งจะเห็นเป็นแถบที่เรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ส่วนการตรวจวัด N-acetylglucosaminidase activity และ chitobiase activity ในสารละลายจะทำใน microtiter test plate ซึ่งมี reaction mixture ที่ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ 10 หรือ 30 μ l และสารละลายสับสเตรท (ใช้ p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide หรือ p-nitrophenyl- β -D-N'-N'-diacetylchitobiose 300 μ g ใน 50 mM potassium phosphate pH

6.7) 50 μ l บ่มที่ 50 °C หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.4 M Na_2CO_3 50 μ l วัดปริมาณ p-nitrophenol ที่ถูกย่อยออกมาจาก p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide และ P-nitrophenyl- β -D-N'-diacetylchitobiose โดยวัดค่า absorbance ที่ 405 nm กำหนดให้ 1 unit ของ N-acetylglucosaminidase activity และ chitinase activity คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ปล่อย p-nitrophenol 1 μ mol ในเวลา 1 นาที

Endo-chitinase activity ตรวจวัดจากเปอร์เซ็นต์ความขุ่นที่ลดลงของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท โดยผสมสารละลายเอนไซม์ 0.5 ml กับ colloidal chitin (1% w/v ใน 50 mM potassium phosphate ที่ pH 6.7 และ NaN_3 0.02%) 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เจือจางด้วยน้ำ 5 ml แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ 510 nm

Frandberg and Schnurer (1994) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีตรวจวัดเอนไซม์โคติเนสในแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ 10 ชนิด โดยใช้ 3 วิธีคือ (1) การปลดปล่อย p-nitrophenol จาก chromogenic chito-oligosaccharide analogue (2) การปลดปล่อย reducing sugar จากโคติน (3) การสร้างวงใสบนอาหารแข็งที่มีโคติน พบว่าวิธีที่วัดจากการปลดปล่อย p-nitrophenol จาก chromogenic chito-oligosaccharide analogue ไม่เหมาะสำหรับการศึกษาเปรียบเทียบ chitinase activity ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน

4. Radiochemical assay

วิธีนี้จะเป็นการวัดสารกัมมันตรังสีของ oligosaccharides ที่ละลายน้ำซึ่งถูกปล่อยออกมาจาก ^{14}C -labelled colloidal chitin หรือ ^3H -labelled chitin ซึ่งเตรียมโดยใช้ [^3H] acetic anhydride ไปทำปฏิกิริยากับโคโตซานทำให้ได้โคตินที่มีหมู่ acetyl เป็น $\text{C}^3\text{H}_7\text{CO}$ -ซึ่งสับสเตรทในรูปนี้จะตรวจวัดเอนไซม์โคติเนสได้รวดเร็วและมีความไว (sensitive) ในการตรวจสอบ (Stirling *et al.*, 1979; Jackson *et al.*, 1996)

5. Agar plate diffusion

เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์บนอาหารแข็ง ซึ่งทำได้หลายวิธี

5.1 ใช้ chitinase assay agar (15 ml/plate) ที่ประกอบด้วย swollen chitin 10 mg/ml, agar 15 mg/ml และ sodium azide 625 μ g/ml ใน 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 6.6) โดยหยดสารละลายเอนไซม์ (จาก *Serratia marcescens*) 40 μ l ลงในหลุมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ใน chitinase assay agar plate หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 7 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใสรอบๆ หลุม (แสดงถึง chitinase activity) ประเมินค่า chitinase activity ในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสของตัวอย่างกับขนาดของวงใสจากสารละลายเอนไซม์ที่รู้ค่า chitinase activity แล้ว (Reid and Ogrydziak, 1981)

5.2 หยด crude enzyme (จาก *Serratia liquefaciens*) 5 μ l ลงบน minimal chitin agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C แล้ววัดวงใสที่เกิดขึ้น ตามเวลาที่กำหนด (Joshi *et al.*, 1989)

5.3 ใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm วางบน agar plate ที่มีไคติน 1.6%(w/v) โดยใช้ agar จานละ 15 ml จากนั้นหยดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 30 μ l ลงบนกระดาษกรองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น รอบแผ่นกระดาษกรอง (Roberts and Selitrennikoff, 1988)

การหมักในสภาพของแข็ง (Solid State Fermentation, SSF)

การหมักในสภาพของแข็งเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้สับสเตรทที่เป็นของแข็ง ส่วนมากสับสเตรทที่ใช้ มักจะเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือธัญพืชที่เป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อน ไม่ละลายน้ำ เช่น ชังข้าวโพด (Yang and Swei, 1996) ถั่วเหลือง (Davey *et al.*, 1991) ข้าวเจ้า (Bajracharya and Mudgett, 1980) รำข้าวสาลี (Pandey, 1991) และกากขานอ้อย (Solis-Pereyra *et al.*, 1996) ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยการหมักในสภาพของแข็งในปัจจุบันจะนิยมใช้กับสับสเตรทที่เป็นเซลลูโลสดังตัวอย่างข้างต้น แต่ความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีระหว่างไคตินและเซลลูโลสทำให้มีความเป็นไปได้ว่า จะสามารถนำไคตินมาใช้เป็นสับสเตรทในการหมักในสภาพของแข็งได้เช่นกัน

ข้อดีของการหมักในสภาพของแข็ง

1. มีต้นทุนต่ำเนื่องจากสับสเตรทที่ใช้ได้จากธรรมชาติ
2. ใช้อุปกรณ์น้อยและใช้เทคโนโลยีอย่างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน
3. มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เช่น เชื้อราชนิดต่าง ๆ เนื่องจากมีสภาพใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติที่จุลินทรีย์ดังกล่าวอาศัยอยู่
4. ไม่ต้องเพิ่มความชื้นและสารอาหารให้กับระบบเนื่องจากความชื้นและสารอาหารมีอยู่เพียงพอในสับสเตรท
5. ไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อตั้งต้นในรูปกล้าเชื้อในปริมาณมาก สามารถใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ได้
6. มีความชื้นในระบบต่ำ เป็นการลดโอกาสการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น
7. ไม่จำเป็นต้องมีการเพิ่มอากาศให้กับระบบเนื่องจากมีการไหลเวียนของอากาศระหว่างอนุภาคของสับสเตรท
8. ผลผลิตที่ได้จากการหมักอาจมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาจมีการผลิตสาร metabolite บางอย่างที่แตกต่างกันไปจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

9. สามารถสกัดของแข็งจากการหมักได้โดยตรงด้วยตัวทำละลายหรือทำให้อยู่ในสภาพเยือกแข็งก่อนทำการสกัด

10. สามารถสกัดของแข็งจากการหมักได้โดยตรงด้วยตัวทำละลายหรือทำให้อยู่ในสภาพเยือกแข็งก่อนทำการสกัด

11. ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีสภาพการเจริญต่ำเนื่องจากเส้นใยฉีกขาดได้

ข้อจำกัดของการหมักในสภาพของแข็ง

1. ไม่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียหลายชนิด
2. ไม่สามารถบ่งบอกองค์ประกอบที่แน่นอนของสารอาหารภายในสับسترได้
3. อาจต้องใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ในปริมาณมากซึ่งต้องเตรียมในลักษณะปลอดเชื้อ

4. กรณีต้องมีการเติมน้ำในช่วงแรกก่อนทำการหมักเป็นการเพิ่มโอกาสการปนเปื้อน
5. สับسترหลายชนิดต้องผ่านการบดหรือทำให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำมาใช้ในการหมัก
6. การตรวจวัดปัจจัยภายในระบบเป็นไปได้ยาก เช่น ปริมาณความชื้น pH และปริมาณมวลชีวภาพ

7. การตรวจหาปริมาณ metabolite ที่เกิดขึ้นทำได้ยาก
8. จำเป็นต้องขยายระบบหมักเพื่อให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น
9. เมื่อมีการกวนเพื่อเพิ่มอากาศให้กับระบบ แรงจากการกวนอาจทำให้เส้นใยเสียหาย

ที่มา : Mudgett 1986, Pandey 1991, Hesseltine, 1977

การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อรา

Haran et al. (1995) ได้รายงานการศึกษา chitinolytic system ของเชื้อ *Trichoderma harzianum* โดยใช้สับسترที่ย้อมสีเรืองแสง เพื่อตรวจวัด chitinolytic activity และติดตามผลโดยวิธี electrophoresis พบว่า chitinolytic system ของ *T. harzianum* มีความซับซ้อนมากกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน คือประกอบด้วยเอนไซม์ที่ต่างกัน 6 ชนิด โดยเป็น β -1,4-N-acetylglucosaminidase 2 ชนิด (CHIT 102 และ CHIT 73) และ endo-chitinase 4 ชนิด (CHIT 52, CHIT 42, CHIT 33 และ CHIT 31) เอนไซม์ชนิดใหม่คือ CHIT 73 และ CHIT 52 เอนไซม์ทั้งหมดถูกชักนำให้สร้างและปล่อยออกมาในระหว่างที่ *Trichoderma* มีการเจริญในอาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน CHIT 102 เป็น intracellular เพียงชนิดเดียว ซึ่งพบในระดับต่ำเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคส เอนไซม์ CHIT 73 จัดเป็น β -1,4-N-acetylglucosaminidase จะถูกสร้างเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารที่มีไคตินเท่านั้น และเป็นเอนไซม์ชนิดทนความร้อนแต่ไวต่อ protease ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเอนไซม์ CHIT 52 เป็น endo-chitinase

สลายพันธะแบบสุ่มภายในสายโพลีเมอร์ของไคติน เอนไซม์นี้ไวต่อความร้อนมาก ความร้อนขนาดปานกลาง (อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 3 นาที) ก็ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

Inglis and Peberdy (1997) รายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทาง chitinolytic ของ *Ewingella americana* ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อก่อโรคในเห็ด *Agaricus bisporus* โดยพบ chitinolytic activity ใน *E. americana* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไคตินแต่มีกลูโคสและ N-acetylglucosamine เป็นสับสเตรท นำน้ำเลี้ยงที่กรองได้ที่มีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 33 kDa ที่พบว่ามีการทำงานของ chitinolytic enzyme มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hydrophobic interaction chromatography พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวเป็น endo-chitinase (33 kDa) ซึ่งพบเฉพาะใน *E. americana* สายพันธุ์ที่ไม่ใช่ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งจะได้ทำการศึกษาในแง่ของการเป็นเชื้อก่อโรคในเห็ดต่อไป

Felse and Panda (1999) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของ *Trichoderma harzianum* ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture พบว่าวิธี self-directing optimization หรือ rotating simplex method เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดต่อการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้แก่ pH อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่า chitinase activity มีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิม 0.109 U เป็น 0.384 U ที่ pH 4.9 อัตราการให้อากาศ 1.5 lb/min และอัตราการกวน 224 rpm

Suresh and Chandrasekaran (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อราหนาดต่าง *Beauveria bassiana* ที่แยกได้จากตะกอนของน้ำทะเล โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Bennet's agar ที่มีน้ำทะเล 50% เป็นองค์ประกอบ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นเวลา 12 วัน เติม 0.1% tween 80 20 ml แล้วขูดด้วยเข็มเย็บเชื้อเพื่อให้ได้เป็น colloidal suspension ทำการเพาะเลี้ยง *B. bassiana* โดยวิธีการหมักในสภาพของแข็งที่มี wheat bran และ colloidal chitin เป็นสับสเตรท ปริมาณ conidial suspension 2 ml เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ความชื้นในระบบ 90% นำไปวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธี DNS method และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่า *B. bassiana* มีค่าการทำงานของเอนไซม์ก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสมเท่ากับ 9.5 U/g initial dry substrate และหลังจากทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสพบว่าค่าการทำงานเพิ่มขึ้นเป็น 246.6 U/g initial dry substrate

Felse and Panda (2000) ศึกษากระบวนการหมักเพื่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจาก *Trichoderma harzianum* โดยใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักที่มีการกวนด้วยความเร็ว 224 rpm ซึ่งพบว่าเป็นความเร็วที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์

โคติเนสจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพิ่มความเร็วให้ระบบการกวน จะพบปริมาณเซลล์มีจำนวนลดลงในการหมักที่มีระบบการกวนความเร็วต่ำมากกว่าในการหมักที่มีระบบการกวนด้วยความเร็วสูง และจะพบปริมาณเอนไซม์โคติเนสลดลงในการหมักที่มีระบบการกวนด้วยความเร็วสูง

Sengelv *et al.* (2000) ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่อการเกิด conjugation ในแบคทีเรียบริเวณ residuesphere ซึ่งเป็นพื้นที่ระหว่างดินกับส่วนของใบข้าวบาเลย์ที่ถูกย่อยสลาย ทำการเปรียบเทียบการถ่ายทอดยีนโดยกระบวนการ conjugation ใน 3 บริเวณคือ บริเวณ residuesphere ซึ่งพบการเกิด conjugation มาก ในดินทรายและก้อนดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ศึกษาอิทธิพลของ ปัจจัยต่อการเกิด conjugation ในแบคทีเรีย พบว่าปัจจัยมีบทบาทเป็นตัวยับยั้ง กล่าวคือ พบการเกิด conjugation ของแบคทีเรียในบริเวณ residuesphere ของข้าวบาเลย์ที่ไม่มีการเจริญของฟงไจมากกว่า ในบริเวณ residuesphere ของใบข้าวบาเลย์ที่มีการเจริญของฟงไจอย่างมีนัยสำคัญ พร้อมทั้งศึกษาปริมาณมวลชีวภาพของฟงไจจากการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์โคติเนส ซึ่งจะแปร ผกผันกับโอกาสการเกิด conjugation

การศึกษาเอนไซม์โคติเนสในแง่ของการเป็นสารยับยั้ง

Chemin *et al.* (1995) ได้รายงานการศึกษา chitinolytic activity ใน *Enterobacter agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคพืช เอนไซม์ที่ย่อยสลายโคตินจะถูกชักนำให้สร้างขึ้นเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่มี colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน (0.2%w/v) ตรวจพบเอนไซม์ทั้งหมด 4 ชนิด จัดเป็น N-acetyl- β -D-glucosaminidase 2 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุล 89,000 และ 67,000 ดาลตันและเป็น endo-chitinase และ chitobiosidase มีน้ำหนักโมเลกุล 59,000 และ 50,000 ดาลตัน ได้ทดลองใช้เชื้อ *Enterobacter agglomerans* ต่อด้านเชื้อราก่อโรคในฝ้ายโดยทดลองในเรือนเพาะชำ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* ลงได้ 64-86% และเชื้อ *E. agglomerans* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วไม่สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสได้จะไม่สามารถป้องกันการเกิดโรคในพืช

Hodge *et al.* (1998) ศึกษาผลของสารยับยั้ง 2 ชนิด คือ allosamidin และ (2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino phenylcarbamate (PUGNAC) ต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนสในพืช 2 ชนิด คือ สน (*Pinus sylvestris* L.) และ ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus pilularis* Sm.) และฟงไจ 7 ชนิด ที่พบในบริเวณที่มีการปลูกพืชดังกล่าว พบว่า endo-chitinase จากรากของต้นสนและยูคาลิปตัส ถูกยับยั้งด้วย allosamidin chitinase activity ในต้นสนจะมีความไวต่อสารยับยั้งมากกว่าในยูคาลิปตัส สำหรับกลไกการยับยั้งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชและความสัมพันธ์ระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์นั้น PUGNAC ยับยั้งการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase และ exo-chitinase ที่สกัดได้จากรากของพืชทั้งสองชนิด นอกจากนี้

สารยับยั้งทั้งสองชนิดยังมีผลต่อการทำงานของฟังไจที่ใช้ศึกษาด้วย allosamidin ยับยั้งการทำงานของ endo-chitinase ในเชื้อราก่อโรคและ mycorrhiza นอกจากนี้พบว่า allosamidin ยังสามารถยับยั้งการทำงานของ exo-chitinase ใน mycorrhiza *Paxillus involutus* (Batch) Fr. ได้อีกด้วย PUGNAC ยับยั้งการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ในฟังไจทุกชนิดและยังสามารถยับยั้งการทำงานของ exo- และ endo-chitinase ในฟังไจทุกชนิดยกเว้น *P. involutus* จากผลการทดลองพบว่า allosamidin สามารถยับยั้งการทำงานของ endo-chitinase ในพืชได้ ขณะที่ PUGNAC สามารถยับยั้งได้ทั้งการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase และ endo-chitinase ในฟังไจ จึงสามารถนำสารยับยั้งดังกล่าวมาใช้แยกความแตกต่างของ endo-chitinase ได้

Nielsen et al. (1998) ทำการแยกเชื้อ 47 ไอโซเลตซึ่งทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ของ *Pseudomonas fluorescens* biovars I-VI จากดินบริเวณ rhizosphere ของหัวบีทแล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพต่อการเกิดโรค damping-off ในหัวบีท นำไอโซเลตที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช *Pythium ultimum* และ *Rhizoctonia solani* ในอาหารแข็งที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ตรวจสอบกลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากปริมาณ secondary metabolite ที่เกิดขึ้นและการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของฟังไจในอาหารแต่ละชนิด จากการทดลองพบว่า ทุกสายพันธุ์มีกลไกการยับยั้งซึ่งกลไกดังกล่าวคล้ายกับการทำงานของสารปฏิชีวนะหรือมีการผลิตเอนไซม์ขึ้นในอาหาร พบว่า *P. fluorescens* by. I สามารถสร้าง viscosinamide ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะจำพวก lipopeptide ได้ในอาหาร ขณะที่ *P. fluorescens* by. II และ IV สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ 2,4-diacetylphloroglucinol ได้ในอาหารที่มีกลูโคสในปริมาณมาก ซึ่งสารปฏิชีวนะดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิดได้ พบ endochitinase activity ของ *P. fluorescens* by I, III, VI สามารถสลายผนังเซลล์ของ *R. solani* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสปริมาณต่ำ ไอโซเลต DR54 (by. I) ผลิต viscosinamide ซึ่งเป็นสารควบคุมชีวภาพได้เมื่อทำการทดลองในกระถางโดยเพาะเมล็ดหัวบีทและถ่ายเชื้อ *P. ultimum* เข้าสู่ต้นพืช

Wang et al. (1999) ศึกษาองค์ประกอบใน *Pseudomonas aeruginosa* K-187 ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา โดยเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* K-187 ในอาหารที่มีเปลือกกุ้งและเปลือกปูเป็นสับสเตรท เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของฟังไจได้นำเอนไซม์ไคตินเนสมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งในเชื้อรา 36 สายพันธุ์ จากการทดลองพบว่า *P. aeruginosa* K-187 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย เปลือกกุ้งและเปลือกปูบด 4.75%, carboxymethyl cellulose 0.75%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.3% และ yeast extract 0.35% pH 6.0 โดย crude fungicide ที่ได้จากเชื้อดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* ได้มาก

กว่า 90% เมื่อทำการทดลองที่ pH 3.0 หรือที่ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งมีผลทำให้เส้นใยของ *Fusarium* ถูกย่อยสลายและเกิดอาการบวม มีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำเอา crude fungicide จาก *P. aeruginosa* K-187 ไปยับยั้งการเกิดโรค damping-off จาก *Fusarium* ในหญ้า alfalfa ได้

Takatsu et al. (1999) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์กรรมของพืชจำพวกเบญจมาศ (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) โดยถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคติเนสเข้าสู่ต้นเบญจมาศโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ C58 และ MP90 cDNA ดังกล่าวคือ RCC2 พบว่าต้นเบญจมาศ 11 สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานการเข้าทำลายของราสีเทา (*Botrytis cinerea*) เพิ่มขึ้น เบญจมาศ 3 สายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อ *B. cinerea* มากที่สุดคือสายพันธุ์ Y₁₂, Y₆₁ และ Y₉₇ ซึ่งจะไม่พบการแพร่ขยายของเชื้อราเมื่อเพิ่มระยะเวลาศึกษาให้นานขึ้น ศึกษาปริมาณของ R22 ในเบญจมาศ 3 สายพันธุ์โดยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำให้สรุปได้ว่าสามารถใช้ยีน RCC2 ในการป้องกันการเข้าทำลายของราสีเทาในต้นเบญจมาศได้

Nielsen and Srensen (1999) ศึกษา chitinolytic activity โดยแยก *Pseudomonas fluorescens* จากดินบริเวณรากของข้าวบาเลย์ และหัวบีท พบ *P. fluorescens* 12 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคคือ *Rhizoctonia solani* และ *Pythium ultimum* ได้ โดยพบ chitinolytic activity ใน *P. fluorescens* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ในอาหารที่ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์จากภายนอก จากการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า เป็น endo-chitinase และ chitobiosidase พบว่าเมื่อนำ supernatant มาผ่านกระบวนการ isoelectric focusing gel electrophoresis พบว่าทุกไอโซเลทมีการผลิตเฉพาะ endo-chitinase เท่านั้น ในระยะ logarithmic phase ซึ่ง endo-chitinase นี้จะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น isozyme ได้หลายชนิดโดยกระบวนการภายนอกเซลล์ระยะ stationary phase เมื่อจัดกลุ่มตามลักษณะและโครงสร้างที่คล้ายกันของ isozyme สามารถแบ่ง *P. fluorescens* ทั้ง 12 ไอโซเลทได้เป็น 7 กลุ่ม และเมื่อเลือกศึกษาถึงรายละเอียด พบว่าการปลดปล่อย endo-chitinase ก็เกิดขึ้นในช่วง stationary phase เช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่ากลไกการผลิต endo-chitinase ในระยะ stationary phase และกลไกการสร้าง isozyme ใน *P. fluorescens* แต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน

การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในแอคติโนมัยซิส

Gupta et al. (1995) ได้ศึกษาเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Streptomyces viridificans* ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ดีที่สุดคือ 0.23 unit/ml จากการคัดเลือกขั้นตอนจากเชื้อทั้งหมด 9 สายพันธุ์ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ไคติเนส คือ มี colloidal chitin

15 g/l ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย yeast extract 0.5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/l, KH_2PO_4 1.36 g/l บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมกับเขย่า 200 rpm เอนไซม์มีระดับสูงสุดหลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 6 วัน การเติมน้ำตาล hexose และ pentose เพิ่มเข้าไปในอาหารมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง ยกเว้นน้ำตาล arabinose ที่ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ สำหรับกลูโคสมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์โคติเนสอย่างสมบูรณ์ เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30–35 °C และ pH 3–7.5 มีการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 °C และ pH 6 เอนไซม์ที่บริสุทธิ์จะถูกยับยั้งการทำงานด้วย Mn^{2+} และ Mg^{2+} แต่ mercaptoethanol มีผลกระตุ้นการทำงานทั้ง crude enzyme และเอนไซม์บริสุทธิ์

Mitsutomi et al. (1995) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โคติเนส จาก *Streptomyces griseus* HUT 6037 การผลิตเอนไซม์ทำในอาหารที่ประกอบด้วย colloidal chitin 0.2%, KCl 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% และ FeSO_4 0.001% ที่อุณหภูมิ 30 °C บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 4 วัน ได้เอนไซม์ 0.83 unit/ml จากน้ำเลี้ยงทั้งหมด 3.9 ลิตร เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วย ammonium sulphate, Butyl-Toyopearl 650 M chromatography และ chromatofocusing พบว่ามีเอนไซม์โคติเนส 2 ชนิด คือ C-1 และ C-2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 Da (โดยวิธี SDS polyacrylamide gel electrophoresis) มี isoelectric point 7.7 และ 7.3 ตามลำดับ สามารถทำงานได้ที่ pH 4.5–6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55 °C มีความคงตัวที่ pH 6.5 และ 10.0 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 °C เอนไซม์โคติเนส C-1 และ C-2 ย่อย chitin, colloidal chitin, glycol chitin, carboxymethyl chitin, 53% deacetylated chitosan และ $(\text{Glc Nac})_{3-6}$ แต่ไม่ย่อย 96% deacetylated chitosan และ $(\text{GlcN})_n$

Ilyina et al. (1999) เตรียมโคโตซานจากการนำเปลือกปูมาผ่านกระบวนการ deacetylation 85.2% ของเปลือกกุ้งและเปลือกปูจะถูกย่อยสลายโดย crude enzyme จาก *Streptomyces kurssanovii* ที่ 37 °C โดยใช้ 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.8 ในเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ของสารผสมให้เป็น 8.2 ด้วย 0.1 M NaHCO_3 วัดปริมาณ glucosamine โดยใช้ fluorescamine โดยนำตัวอย่างที่มี chitosan 10, 20 หรือ 30 μg มาผสมกับ fluorescamine (0.2 mg/ml) 0.5 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 nm วัดปริมาณ glucosamine ในโคโตซาน โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน glucosamine และคำนวณหา degree of acetylation จากผลต่างของ glucosamine ในโคโตซานและกราฟมาตรฐาน โคโตซานโมเลกุลต่ำจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ประมาณ 4–8 kDa ซึ่งเตรียมได้จากการทำ hydrolysis โดยผสม 1% w/v โคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกปูใน 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5) กับ crude enzyme 0.02 u/ml ที่ 45 °C เวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้ว

นำไปปั่น นำ supernatant ที่ได้ไปทำ dialysis ในน้ำแล้วทำให้เยือกแข็งจะได้ปริมาณโคโดซาน โมเลกุลต่ำ 70-80%

การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในแบคทีเรีย

Brurberg *et al.* (1996) ได้รายงานการศึกษาการผลิต chitinolytic enzyme ใน *Serratia marcescens* พบว่า เชื้อดังกล่าวผลิต chitinolytic enzyme หลายชนิด รวมทั้ง chitinase A (*Chi a*) และ chitinase B (*Chi b*) ทำ *Chi b* ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคที่อาศัยความรู้พื้นฐานทาง hydrophobic interaction chromatography และทำการศึกษเปรียบเทียบคุณสมบัติของ *Chi a* และ *Chi b* พบว่า *Chi a* และ *Chi b* หลังจากทำให้บริสุทธิ์จะมีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการ เช่น มีช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-60 °C เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเสถียรโดยมีค่า half-life มากกว่า 10 วัน ที่ 37 °C pH 6.1 จากการศึกษาการย่อยสลายในสับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ N-acetylglucosamine oligomers, fluorogenic substrate และ colloidal chitin พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถย่อย chitobiose (GlcNAc)₂ จาก (GlcNAc)_(n) ได้ และมี exo-N-N'-diacetylchitobiohydrolase activity และสามารถย่อย (GlcNAc)_(n) ให้เป็น monomer ได้อีกด้วย นั่นคือพบเอนไซม์ที่มี endochitinase activity (*Chi a*) และเอนไซม์ที่มี exo-N,N',N''-triacetylchitotriohydrolase activity (*Chi b*) อย่างไรก็ตามพบว่า *Chi a* มีค่า specific activity สูงกว่า *Chi b*

Chernin *et al.* (1998) ศึกษาการใช้ Quorum sensing โดยติดตามสัญญาณจาก N-acylhomoserine lactone (AHL) เพื่อศึกษาการผลิต exoenzyme ในแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด และสามารถตรวจสอบการผลิตรงควัตถุสีม่วง violacein รวมทั้ง hydrogen cyanide สารปฏิชีวนะ และ exo-protease จาก *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 ได้โดยใช้ AHL N-hexanoyl-L-homoserine lactone (HHL) ในการตรวจสอบโดยวิธี Quorum sensing ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า *C. violaceum* มีการผลิต chitinolytic enzyme ซึ่งตรวจวัดได้โดยใช้ HHL ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยโดยใช้ p-nitrophenol analog พบ oligomer หลายชนิดจาก N-acetylglucosamine ได้แก่ disaccharide trisaccharide และ tetrasaccharide oligomer และเมื่อนำ oligomer ดังกล่าวมาใช้เป็นสับสเตรทแล้วตรวจวัดโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยโดยใช้ 4-methylumbelliferyl analog จากการหำน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า มีเอนไซม์อย่างน้อย 6 ชนิด ได้แก่ chitobiase (87 kDa) N-acetylglucosaminidase 2 ชนิด (162 และ 133 kDa) endo-chitinase 2 ชนิด (108 และ 67 kDa) และ chitobiosidase (56 kDa) นอกจากนี้ยังพบแถบของโปรตีนที่ไม่สามารถระบุชนิดของเอนไซม์ได้อีก 2 แถบ ที่น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 205 kDa เมื่อใช้ tetrasaccharide oligomer เป็นสับสเตรท