

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้งมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจ ประเทศไทยเราส่งกุ้งเป็นสินค้าออกติดอันดับ 1 ใน 5 อันดับแรกของโลก (เขาวงกต, 2536) ซึ่งอุตสาหกรรมดังกล่าว ก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมหลายด้าน เช่น ผลจากการทำฟาร์มกุ้งทำให้เกิดมลภาวะน้ำเสียตามบริเวณแนวชายฝั่งของเสียจากการแปรรูปกุ้งแช่แข็ง ประกอบด้วยเปลือกกุ้งจำนวนมากในแต่ละวัน (อุดมชัย, 2535) จากแนวโน้มการขยายตัวของอุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งส่งผลให้ปริมาณวัสดุเหลือทิ้ง ได้แก่ หัวกุ้ง เปลือกกุ้ง และเศษเนื้อเพิ่มขึ้น (สุทรวัดน์ และไพรัตน์, 2533)

เปลือกกุ้งมีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่าไคตินเป็นส่วนประกอบ ซึ่งไคตินนี้จะทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันอันตรายให้กับกุ้ง พบว่าในหัวกุ้งมีไคตินเป็นส่วนประกอบอยู่สูงถึง 34.9% (สุมาลัยและคณะ, 2540)

ตาราง 1 ปริมาณและน้ำหนักของเนื้อกุ้งและส่วนประกอบต่างๆเมื่อแยกส่วน (อุดมชัย, 2540)

กุ้งทั้งตัว	กุ้งเด็ดหัว	กุ้งเนื้อไว้หาง	กุ้งค็อกเทล	กุ้งเนื้อ
100%	62%	55%	40%	50%

100%	กุ้งทั้งตัว	55%	กุ้งเนื้อไว้หาง
38%	62%	40%	กุ้งค็อกเทล
38%	50%	7%	5%

ซึ่งผ่านความร้อนแล้ว

น้ำหนักส่วนต่างๆ ของกุ้ง

จากตาราง 1 พบว่ากุ้ง 1 ตัวจะให้ของเสียที่เป็นหัว เปลือกหลัง และเศษหางถึงร้อยละ 50 สำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ.2533 มีปริมาณการผลิตกุ้งจากฟาร์มประมาณ 1 แสนเมตริกตัน ซึ่งจะได้ของเสียในรูปเปลือกกุ้งประมาณ 3-4 หมื่นเมตริกตัน วิธีการกำจัดของเสียเหล่านี้ทำได้โดย

การทิ้งลงทะเล การเผา และการฝังกลบ ซึ่งพบว่าก่อให้เกิดปัญหาด้านค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม จึงทำให้มีการค้นหาวิธีการกำจัดที่เหมาะสม เช่น นำไปผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยใช้ *Serratia marcescens* บ่อยให้ได้ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นอาหารในการเลี้ยงยีสต์ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียว สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ (Tom and Carroad, 1981)

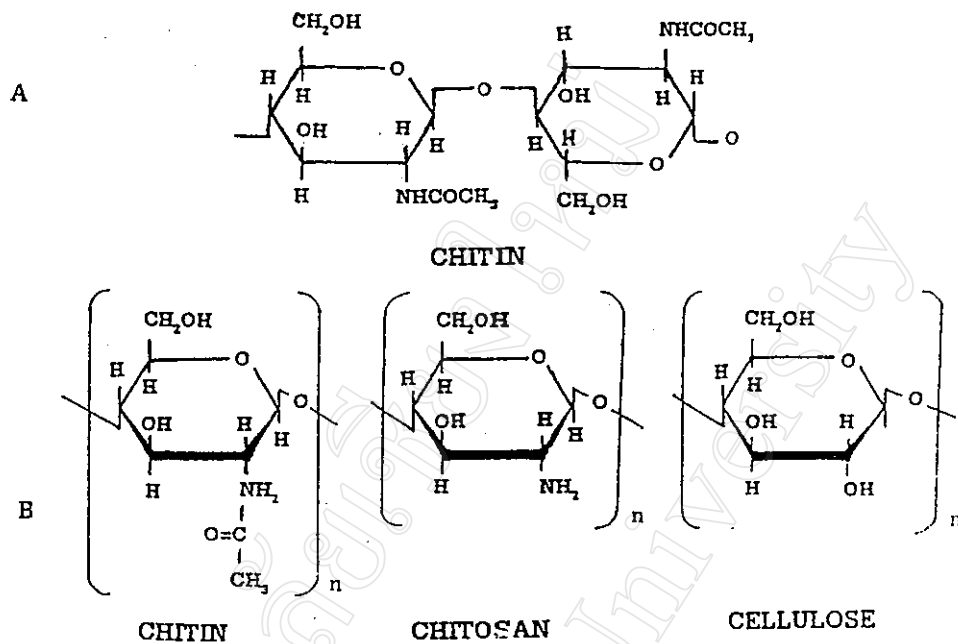
ในประเทศญี่ปุ่น อิตาลี นอร์เวย์ และอเมริกา ได้ใช้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลไปผลิตไคตินและไคโตซาน ซึ่งเป็นสารที่มีราคาสูงขึ้น โดยวิธีการทางเคมี สำหรับประเทศไทยมีการนำไปผสมในอาหารสัตว์ซึ่งมีราคาต่ำ ในอนาคตของเสียเหล่านี้อาจนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ หรือสารอื่นๆ โดยกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ (อ้างโดย พลัฒ์พลึง, 2540)

โดยเฉพาะการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่า เปลือกกุ้งสามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการ solid state fermentation ได้ โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในกระบวนการนี้ได้แก่ พวก Marine microorganism เนื่องจากมันสามารถดูดซับ solid particle ได้ (Suresh and Chandrasekaran, 1998)

ไคติน (chitin)

เป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1, 4 ประกอบด้วยไฮโดรเจน 6.5% คาร์บอน 47.3% ไนโตรเจน 6.9% และออกซิเจน 39.4% สูตรโมเลกุลคือ $C_8H_{13}NO_5$ (ภาพ 1) จะเห็นได้ว่าไคตินมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซลลูโลส โดย hydroxy group ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ถูกแทนที่ด้วย acetamide group

ไคตินมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป (อ้างโดย อุดมชัย, 2535) ไคตินทำหน้าที่เป็นโครงสร้างที่สำคัญของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะพวกอาร์โธรพอด และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อรา (สุทรวัดน์ และไพรัตน์, 2533)



ภาพ 1 A. โครงสร้างของไคติน B. เปรียบเทียบโครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส (อ้างโดย มยุรา, 2539)

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการลดหมู่อะเซทิลของไคตินโดยกระบวนการ deacetylation ไคโตซานละลายได้ง่ายในตัวทำละลายที่เป็นกรด มีคุณสมบัติสามารถรับโปรตอนได้ จึงจัดอยู่ในกลุ่มแก๊ทไอออนิกโพลิเมอร์

ประโยชน์ของไคตินและไคโตซาน (อ้างโดย สุวดี, 2539 ; อุดมชัย, 2535)

1. ใช้เป็นตัวตกตะกอนกำจัดโปรตีนของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและน้ำผลไม้หรือเครื่องดื่มต่างๆ
2. ใช้เป็นสารแยกสิ่งเจือปนในกระบวนการผลิตเอนไซม์และโปรตีนเฉพาะทางสำหรับงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมชีวเคมี
3. ใช้ในการจับโลหะหนักในงานผลิตน้ำบริสุทธิ์ (ultra pure water)
4. ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์และเภสัชกรรม
5. ใช้เป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย และช่วยป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัดหรือเมื่อมีบาดแผล
6. ใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ยับยั้งและกำจัดเชื้อรา ตลอดจนยากำจัดศัตรูพืช
7. ใช้เป็นสารหุ้มเซลล์ (Encapsulation) ในเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

8. พัฒนาเป็นสารกรองสำหรับใช้ในการทำบริสุทธิ์
9. การพัฒนาการ PDC (Partially Deacetylated Chitin) ใช้ในการห้ามเลือดและสมานแผล
10. การใช้ไคโตซานเป็นสารเหนียวในการทำกระดาษรีไซเคิลและการปรับปรุงคุณภาพของเยื่อกระดาษต่างๆ

การย่อยสลายไคตินโดย Chitinolytic enzyme

การย่อยสลายไคตินให้ได้ N-acetylglucosamine ต้องอาศัยการทำงานของ chitinolytic enzyme ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ hydrolase 2 class ทำงานร่วมกันคือ

1. Endochitinase (EC 3.2.1.14)
2. Chitinase (EC 3.2.1.30) หรือ N-acetylglucosaminidase

Endochitinase จะ hydrolyse GlcNAc polymer แบบสุ่มทำให้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น dimer และได้ trimer บ้างเล็กน้อย chitinase จะทำหน้าที่ hydrolyse dimer ที่ได้ (Vyas and Deshpande, 1989 ; Shaikh and Deshpande, 1993 ; Vasseur *et al.*, 1990)

การจัดจำแนก chitinolytic enzyme จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท เช่น *Streptomyces chitinase complex* จะย่อยสลาย pure crystalline β -chitin ใน diatom spines ตรงปลาย non-reducing end ได้ dimer ขณะที่เมื่อย่อยสลาย colloidal chitin แล้วจะได้ oligomer และ dimer ปนกัน

ไคตินเนสจะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง β -1, 4 glycosidic bonds ซึ่งในธรรมชาติพันธะนี้มีความหลากหลายมาก ทำให้สิ่งมีชีวิตสร้างเอนไซม์ไคตินเนสที่มีคุณสมบัติ ความจำเพาะต่อสับสเตรท และให้ผลผลิตต่างกันไป (Shaikh and Deshpande, 1993)

แหล่งของไคตินเนสที่พบในธรรมชาติ

เอนไซม์ไคตินเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น

1. พืช

ในเซลล์พืชแม้ว่าจะไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบแต่พืชก็ยังมีการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อใช้ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อต่างๆรวมทั้งแมลง (Robert and Splitrennikoff, 1988) ดังนั้นบริเวณที่พบไคตินเนสจึงอยู่บริเวณที่เชื้อหรือแมลงเข้าทำลายได้ง่าย เช่น ราก ใบ และเมล็ด

2. สัตว์

มักพบในสัตว์ที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ เช่น แมลง ปู กุ้ง สัตว์ทะเลที่มีเปลือก แต่ก็พบว่าสัตว์อีกหลายชนิดที่ไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบก็สามารถสร้างไคตินเอสได้ เช่น ปลา สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งไคตินเป็นแหล่งอาหารจะมีการหลั่งไคตินเอสจากตับอ่อน และเยื่อหุ้มกระเพาะอาหาร (อ้างโดย สุดาพร, 2540)

3. จุลินทรีย์

แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ผลิตไคตินเอสได้ส่วนใหญ่จะใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนโดยสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายไคตินให้ได้ N-acetylglucosamine ซึ่งถูกนำไปใช้ต่อไป แบคทีเรียที่พบว่าสามารถผลิตไคตินเอสได้ ตัวอย่างเช่น *Serratia marcescens* (Brurberg et al., 1996), *S. liquefaciens* (Joshi et al., 1989), *Clostridium* sp. (Cruz et al., 1990), *Bacillus circulans* (Watanabe et al., 1992) และ *Vibrio* sp. (Takahashi et al., 1993) เป็นต้น

แอคติโนมัยซีต

มีรายงานจำนวนมากพบว่าแอคติโนมัยซีต แม้ว่าจะไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แต่ก็สามารถผลิตไคตินเอสได้โดยเฉพาะ *Streptomyces* (Gupta et al., 1995)

เชื้อรา

ไคตินเอสในเชื้อราเกี่ยวข้องกับการ autolysis เพื่อปลดปล่อยสปอร์ เพื่อให้เกิดการยืดยาวออกไปของ stipe (stipe elongation) ใน basidiomycetes บางตัว เพื่อการย่อยสลายเส้นใยในอาหาร และเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารเพื่อให้ได้อาหารเพื่อการเจริญของเส้นใย และการ differentiation (Cirano and Peberdy, 1991) เชื้อราที่สามารถผลิตไคตินเอสได้ เช่น *Mucor rouxii* (Pei-jian Zou et al., 1991), *Pseudomonas* spp. (Loon, 1995), *Fusarium chlamydosporum* (Mathiranan et al., 1994), *Aspergillus fumigatus* (Escott et al., 1998) *Beauveria bassiana* (Suresh and Chandrasekaran, 1998) และ *Trichoderma harzianum* (Kapat and Panda, 1996) โดยเฉพาะ *Trichoderma* ซึ่งถูกนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราโรคพืช

การนำเอนไซม์ไคตินเอสไปใช้ประโยชน์ (Vyas and Deshpande, 1989 ; Shaikh and Deshpande, 1993 ; พลัปปลิ่ง, 2540 ; เขาวภา, 2536)

1. ใช้ในการย่อยสลายของเสียที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ
2. ใช้เป็น biocontrol ของเชื้อราและแมลงก่อโรคพืช เนื่องจากในผนังเซลล์ของเชื้อราและแมลงมีไคตินเป็นส่วนประกอบ
3. ใช้ในการศึกษา fungal technology
4. ใช้ในการสังเคราะห์ chito-oligosaccharide ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น anti-tumour
5. ใช้ในการผลิต single cell protein ซึ่งนำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
6. ใช้ในการตรวจหาค่าแห่งของไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์โดยใช้สารประกอบของไคตินเนสและ chitinase-gold
7. ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์จากพืช การใช้ mycolytic enzyme ร่วมกับไคตินเนสจะทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันเป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว
8. ใช้ในการเตรียม Chito-oligosaccharide ซึ่งถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้หลายทาง เช่น ช่วยเร่งบาดแผลให้หายเร็ว ช่วยลดความเข้มข้นของพลาสมาเมื่อมีกลูโคสหรือคอเลสเตอรอลสูงและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (chitohexaose, chitoheptaose)
9. ยับยั้งอาการ lactose intolerance ซึ่งเกิดจากการขาดเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส โดยการเติมไคตินเนสและไคตินลงในอาหาร
10. ผลิตสารให้ความหวาน
11. เป็น wide antibacterial spectrum

การตรวจวัดไคตินเนส

แบ่งได้ 5 กลุ่มคือ

1. Agar plate diffusion

เป็นการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์บนอาหารแข็งที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบทำได้หลายวิธีดังนี้

Frandberg and Schnurer (1994) ใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนจานอาหาร chitin agar (0.075% colloidal chitin, 2% agar และ 0.02% sodium azide ใน 50 mmol⁻¹ potassium phosphate buffer pH 6.1) หยดเอนไซม์ปริมาณ 20 µl ลงบนกระดาษกรอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 41 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบวงใสที่เกิดขึ้น

Osawa and Koya (1995) ทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรีย โดยดูวงใสบนอาหาร chitin overlay plate (COP)

2. Viscometric assay

การทดสอบการทำงานของไคตินเนสโดยดูจากความหนืดของสารละลายสับสเตรทที่ลดลง ซึ่งวิธีนี้เป็นประโยชน์สำหรับการหาค่าโดยประมาณในระหว่างการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์หรือในด้านการศึกษา kinetic เช่น Okazaki and Tagawa (1991) ใช้สารละลายเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร (มล.) ผสมกับ ethylene glycol chitin 10 มล. บันทึกเวลาที่ใช้ในการทำให้ specific viscosity ของสารละลายผสมลดลงครึ่งหนึ่ง

3. ตรวจวัดปริมาณ end product ที่เกิดขึ้น

3.1. Imoto and Yagishita method

เป็นการวัด reducing group ที่เกิดจากการทำงานของ lysozyme โดยมี glycol chitin เป็นสับสเตรท โดยเตรียม reaction mixture ที่ประกอบด้วย glycol chitin (0.05% w/v) 1 มล. และสารละลาย lysozyme 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม DNS reagent 2 มล. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm (Imoto and Yagishita, 1971)

3.2. Miller method

เป็นการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ dinitrosalicylic (DNS) reagent

3.3. Reissig method

วิธีนี้ใช้ในการตรวจวัดปริมาณ N-acetylamino sugar โดยใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde reagent (DMAB) Russell *et al.* (1994) ใช้วิธีนี้ในการวัดการทำงานของไคตินเนสซึ่งได้จาก *Stachybotrys elegans* โดยใช้ reaction mixture ที่ประกอบด้วย crude enzyme 2 มล. และ chitin 10 มิลลิกรัม(มก.)หยุดปฏิกิริยด้วยการต้ม จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกส่วนใสไปวัดปริมาณ N-acetylglucosamine

วิธีการตรวจวัด reducing sugar โดยใช้ DMAB reagent นี้จำเพาะกับ N-acetylglucosamine ซึ่งไคตินเนสมักจะไม่ใช่ทำให้เกิด N-acetylglucosamine ที่เป็นอิสระทั้งหมด ดังนั้นเมื่อเทียบกับ Miller method พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ที่คำนวณได้จะสูงกว่าค่าที่คำนวณได้จากวิธี DMAB 30% (Reid and Ogrydziak, 1981)

4. Chromogenic assay

ข้อดีของวิธีนี้คือรวดเร็วและมีความเร็วสูง แต่มีข้อเสียคือไม่ค่อยมีความจำเพาะกับไคตินเนส สับสเตรทที่ใช้คือ chromogenic substrate เช่น 3, 4-dinitrophenyl-tetra- N-

acetylchitotetraose เมื่อสับสเตรทถูกย่อยจะเกิดขึ้น ซึ่งปริมาณสีที่เพิ่มขึ้นวัดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer

5. Radiochemical assay

วิธีการนี้ใช้สับสเตรทเป็น ^{14}C -labelled colloidal chitin หรือ ^3H -labelled chitin ซึ่งเตรียมโดยใช้ $3[\text{H}]$ acetic anhydride ทำปฏิกิริยากับไคโตซานได้ไคตินที่มี acetyl group เป็น $^3\text{CH}_3\text{CO}$ - วิธีการนี้จะเป็นการวัดสารกัมมันตรังสีที่ละลายน้ำซึ่งถูกปล่อยออกมาจาก ^{14}C -labelled colloid chitin

สถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอส

มีผู้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ดังตาราง 2 และสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของไคตินเอสของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังตาราง 3

ตาราง 2 สถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไคตินเอสของจุลินทรีย์บางชนิด

แหล่งของไคตินเอส	สถานะที่เหมาะสม	Reference
<i>Stachybotrys elegans</i>	C-source : chitin N-source : NaNO_3 pH 5 incubation time : 5 วัน	Russell <i>et al.</i> , 1994
<i>Myrothcium verrucaria</i>	C-source : chitin 0.5-1.0% N-source : urea 0.03% pH 5 incubation time : 5 วัน	Vyas and Despande, 1989
<i>Trichoderma harzianum</i>	C-source : chitin 1.0% pH 6 temperature : 28°C	Cirano <i>et al.</i> , 1991
<i>Trichoderma harzianum</i>	pH 5.6 temperature : 28°C	Kapat <i>et al.</i> , 1997
<i>Beaureria bassiana</i>	pH 9.5 temperature : 27°C incubation time : 5 วัน	Suresh and Chandrasekaran, 1998.

ตาราง 3 สภาพที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนสของจุลินทรีย์บางชนิด

แหล่งของไคตินเนส	สภาพที่เหมาะสม	Reference
<i>Penicillium oxalicum</i>	pH 5.0 temperature : 35°C	Rodriguez <i>et al.</i> , 1993
<i>Serratia marcescens</i>	pH 5.0-6.0 temperature : 50-60°C	Brurberg <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptomyces cinereoruber</i>	pH 4.5 temperature : 50°C	Okazaki and Tagawa, 1991
<i>Acremonium obclavatum</i>	pH 3-4 temperature : 50°C	Gunaratana and Balasubramanian, 1994
<i>Trichoderma harzianum</i>	pH 5.4 temperature : 24°C	Kapat and Panda, 1997

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่จะนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เช่น ถ้าต้องการนำเอนไซม์ไปใช้ในงานวิจัยทางการแพทย์ จะต้องทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์มากๆ แต่ถ้าเป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือความรวดเร็ว เพื่อลดการสูญเสีย activity ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงเนื่องจากวิธีการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงๆ มักใช้วิธีการหลายขั้นตอน (พลับพลึง, 2541)

การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการทำเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยพบว่า การเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่จะเปลี่ยน conformation ของโปรตีนเล็กน้อย โดยจะทำให้มันหันส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกมา ทำให้โปรตีนไม่ละลายน้ำ โปรตีนจึงเกิดการตกตะกอน (Harris and Angal, 1989)

Okazaki and Tagawa (1991) ตกตะกอนไคตินเนสที่ได้จาก *Streptomyces cinereoruber* ด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.8 saturation จากนั้นละลายใน deionized water แล้ว dialyzed ด้วยน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อีกครั้ง ที่ 0.4-0.6 saturation จากนั้น dialyzed ด้วยน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงอีกครั้ง จากนั้นผ่าน column chromatography พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 900 เท่าของ culture filtrate

การผลิตโคตินีนโดยเชื้อรา

วิธีการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราแบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติมลงไปได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว (Submerged culture method)
2. วิธีการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF)

วิธีการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง (SSF) เป็นการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งที่มีการเติมน้ำเพื่อปรับให้อาหารมีความชื้นพอเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์เท่านั้น (ดวงพร, 2537) ซึ่งความชื้นจะถูกดูดซับไว้ใน solid material ซึ่งไม่ละลายน้ำ เพราะฉะนั้นอาหารจึงไม่มี free water หรืออาจมีแต่น้อย (Mitchell *et al.*, 1990)

SSF มีข้อได้เปรียบมากกว่า submerged culture ตรงต้นทุนที่ใช้ต่ำกว่ามาก ใช้ของเสียจากอุตสาหกรรม ใช้เครื่องมือที่ทันสมัยน้อยกว่า และใช้เทคโนโลยีที่สะอาดกว่า เหมาะแก่ประเทศที่กำลังพัฒนา (Pal *et al.*, 1995) แต่มีข้อเสียคือใช้แรงงานมาก ยากต่อการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น pH อุณหภูมิ เป็นต้น

ปัญหาของ SSF (Mitchell *et al.*, 1990)

1. เกิดจากรูปแบบของการเจริญของเชื้อรา
2. การวัดปัจจัยต่างๆทำได้ยากเนื่องจากระบบ SSF มีความแตกต่างกันและซับซ้อน ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกิดจากสัณฐานที่มีความต่างกันทั้งโครงสร้างและสารอาหาร
3. การวัด Biomass ทำได้ยาก Penaloza *et al.* (1992) ทำการวัด Biomass ของเชื้อราใน SSF โดยใช้ Bugmeter Biomass Monitor
4. ความชื้นระหว่างการหมักมักไม่คงที่ เนื่องจากการระเหยของน้ำซึ่งมีสาเหตุมาจากความร้อนที่เกิดจากการ metabolism การใช้น้ำในการ hydrolysis polysaccharide และการ metabolism carbohydrate จะทำให้มีน้ำเกิดขึ้น (Dorta *et al.*, 1994)
5. ขนาดของ particle ของสัณฐานมีความแตกต่างกัน Smail *et al.* (1995) พบว่าขนาดของ particle ของสัณฐานมีความสำคัญต่อการผลิตโปรตีนจาก *Aspergillus niger* โดย SSF โดย particle ขนาดใหญ่จะมีการเจริญของเชืหรือน้อย เนื่องจากเส้นใยแทงเข้าไปได้น้อย หรืออาจมีการแพร่ของ O_2 ที่จำกัด particle ขนาดเล็กมากจะมีการเจริญของเชืหรือน้อยเช่นกันเนื่องจาก particle จะเบียดกันมากทำให้ O_2 จำกัด อย่างไรก็ตามเขาพบว่า particle ขนาด 7.5 mm จะทำให้ปริมาณโปรตีนใน final product สูงสุด

Pandey (1992) ศึกษาผลของ particle size ของสัณฐานต่อการผลิต glucoamylase ใน SSF พบว่า particle ขนาด 425-500 μm และ 500-600 μm ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด

Mitchell *et al.* (1990) ออกแบบสับสเตรทให้มีโครงสร้างและสารอาหารคล้ายคลึงกัน โดยใช้ cassava starch และสารอาหารอื่นๆ ผังไว้ใน X-carageenan gel matrix โดยให้ชื่อว่า MZ 25

จุลินทรีย์ที่ใช้ใน SSF (Pandey, 1992)

SSF แบ่งตามจุลินทรีย์ที่ใช้ได้ 2 แบบคือ

1. Natural (indigenous SSF)
2. Pure culture SSF (individual or mixed)

Duenas *et al.* (1995) ศึกษาการผลิต cellulase โดยใช้เชื้อผสมฟังไจใน SSF จากกากขานอ้อย พบว่าเชื้อผสมให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าการใช้เชื้อตัวเดียว

เชื้อราทุกชนิดสามารถเจริญใน solid culture ได้ แต่พบว่า Filamentous fungi สามารถเจริญในสภาพที่ไม่มี free water ได้ดีที่สุด

Water activity (a_w) ใน SSF (Pandey, 1992)

เป็นความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศกับความชื้นในสับสเตรท โดย a_w ของ SSF ถูกควบคุมโดยความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ a_w ของอาหารมีอิทธิพลต่อการ metabolism ของจุลินทรีย์ เนื่องจาก a_w ของอาหารเป็น parameter สำหรับการส่งผ่านน้ำหรือ solute ผ่าน cell membrane การควบคุม a_w จึงถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงการผลิต metabolic หรือใช้ในการควบคุมการหลังสารของจุลินทรีย์ ใน SSF อาหารที่มี a_w สูงจะเหมาะแก่การสร้างสปอร์ ในขณะที่ a_w ต่ำจะเหมาะสมกับการงอกของสปอร์หรือการเจริญของเส้นใย

สับสเตรทสำหรับ SSF (Pandey, 1992)

ไม่ว่าจะเป็นสารจากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ขึ้นมา ก็สามารถนำมาใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการ SSF ได้หมด ในธรรมชาติสารส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของโพลิเมอร์ เช่น polysaccharide, protein และ lignin เป็นต้น สับสเตรทที่ใช้ใน SSF มักจะไม่ละลายน้ำและมักจะดูดซับน้ำไว้ใน particle ของมัน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำน้ำส่วนนี้ไปใช้ในการเจริญและ metabolism ได้

การที่จุลินทรีย์นำสับสเตรทไปใช้นั้นถูกควบคุมโดยปัจจัยทางกายภาพและเคมีหลายตัว ปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณสับสเตรท, film effect และ mass effect, คุณสมบัติทางกายภาพและสัณฐานวิทยาโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความพรุน (porosity) และขนาดของอนุภาค (particle size) ของสับสเตรททำให้เกิดพื้นที่ผิวสำหรับจุลินทรีย์ สำหรับปัจจัยทางเคมี เช่น ระดับของ

polymerization และ crystallinity ต่างก็มีความสำคัญเช่นกัน ความแตกต่างกันของสัณฐานที่เป็นสารธรรมชาติทำให้เกิดปัญหาในการศึกษา kinetic ของการหมัก ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้โดยการใช้สัณฐานที่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น agar และเจลาตินแทน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ใน SSF

ปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุมได้แก่ อุณหภูมิ pH อากาศ ความชื้น และการกวน เป็นต้น อาหารที่มีความชื้นสูงจะทำให้สัณฐานที่มี porosity ลดลง ซึ่งทำให้ออกซิเจนไม่สามารถผ่านเข้าออกได้และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียขึ้นได้ ในขณะที่อาหารที่มีความชื้นต่ำจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ไม่ดี และใช้อาหารได้น้อยลง อุณหภูมิก็มีผลต่อ SSF เช่นกัน โดยมีผลต่อการผลิต metabolic heat นอกจากนี้อุณหภูมียังมีผลต่อความชื้นและ a_w ของอาหารคือ ทำให้เกิดการระเหยของน้ำ

การผลิตโคตินีนจากเชื้อราโดยกระบวนการ SSF (Suresh and Chandrasekaran, 1998)

Suresh and Chandrasekaran (1998) ใช้เปลือกถั่วเป็นสัณฐานในการผลิตเอนไซม์โคตินีนเอสโดยกระบวนการ SSF โดย marine fungus (*Beauveria bassiana*) พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยเปลือกถั่ว : น้ำทะเล เท่ากับ 5:1 (w/v), NaCl 1% (w/v), KH_2PO_4 2.5% (w/v), pH 9.5 ขนาดของสัณฐานเท่ากับ 425-600 μm ทำการเพาะเลี้ยงที่ 27°C เป็นเวลา 5 วัน ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 248.0 units/g initial dry substrate (U/g IDS) และพบว่า yeast extract จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์โคตินีนลดลง