



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

Isolation and Selection of Microorganism from Soil Producing Chitinase



วัฒนา อัจฉริยะโพธา

WATTANA ASCHARIYAPHOTHA

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

พ.ศ. 2550

หัวข้อวิจัย	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส
ประเภทงานวิจัย	งานวิจัยประยุกต์
ผู้ดำเนินงานวิจัย	นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสจากดินแหล่งธรรมชาติ ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 4 แหล่ง และบริเวณตลาดไท จังหวัดปทุมธานี จำนวน 1 แหล่ง แบคทีเรียที่คัดแยกสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อย่อยสลายไคติน จากตัวอย่างดินทั้งหมดสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสมี 2 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียรหัส A14 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณบริเวณโรงอาหาร 1 มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และแบคทีเรียรหัส D16 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งทำให้เกิดบริเวณใสในอาหาร Chitin agar เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 และ 1.1 เซนติเมตร ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่าแบคทีเรียรหัส A14 มีลักษณะแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยมีการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน มีการใช้น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลเล็กโทสในการหมัก ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส เจริญได้ในอาหารแข็ง MacConkey การทดสอบเมทิล เรดให้ผลเป็นลบ การทดสอบวีพีให้ผลเป็นบวก การทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบ ซึ่งแบคทีเรียรหัส A 14 มีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. เมื่อทำการเทียบเคียงกับชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์เกย์ (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology) แบคทีเรียรหัส D16 ลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียรหัส D16 ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์เมื่อทดสอบในอาหาร TSI สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส การทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบ การทดสอบเมทิล เรดให้ผลเป็นลบ การทดสอบวีพีให้ผลเป็นบวก ลักษณะดังกล่าวของแบคทีเรียรหัส D 16 มีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Serratia* sp. เมื่อทำการเทียบเคียงกับชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์เกย์

Research Title	Isolation and Selection of Microorganism from Soil Producing Chitinase
Research type	Apply science
Researcher	Wattana Ascharyaphotha
Year	2550

ABSTRACT

The objective of this research is to study for isolate and selection bacteria can produce chitinase, 4 samples of mangrove soils collected from Valaya Alongkorn Rajabhat University and 1 sample from free area in "Tarad Tai", Pathum Thani . A total of 5 areas were isolated with 67 isolates, 2 from 67 strains show chitinase activities , strains A14 of mangrove soils area cafeteria 1 Valaya Alongkorn Ratchabhat University, strains D16 at sort out get from area infront Valaya Alongkorn Rajabhat University, which show clear zone in chitin agar , 0.5 diameters and 1.1 centimeter , respectively .

Characteristic of morphological and biochemistry property of the bacteria that isolated, bacteria A14 show mostly to Gram-negative , rod shape, can not motility, can produce the catalase, carbon source by using citrate, ferment by sucrose or lactose, have no hydrogen sulfide production , can produce the urease, growth in MacConkey agar, negative (-) in MR test and Indole test, positive (+) in VP test, the characteristic of A14 is similar to with species *Klebsiella* sp., the comparison and a kind of the bacteria by the way of Bergey' Manual of Systematic Bacteriology, bacteria D16 show mostly to Gram-negative , rod shape, motility, catalase producing, carbon source by using citrate, have no hydrogen sulfide production in TSI test, the urease producing, negative (-) in MR test and Indole test, positive (+) in VP test, the characteristic of D16 is similar to with *Serratia* sp. .

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากสถาบันและบุคคลต่างๆ
ดังนี้

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งได้
ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณพ่อสมกิจ อัจฉริยะโพธา และคุณแม่ประหยัด อัจฉริยะโพธา ผู้ที่คอย
สนับสนุนและให้กำลังใจในระหว่างการทำกรวิจัย

ขอขอบคุณคณาจารย์หลักสูตรชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา และช่วยเหลือ
ด้านข้อมูลของการวิจัย

วัฒนา อัจฉริยะโพธา

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	26
4.1 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด.....	26
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	27
4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนส.....	38
4.4 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อที่คัดเลือกได้.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	52
บรรณานุกรม.....	53
ภาคผนวก.....	57

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณไคตินที่มีในสิ่งมีชีวิตต่างๆ	4
4.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดของดินทั้ง 5 แหล่ง.....	26
4.2 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 1.....	29
4.3 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 2.....	30
4.4 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 3.....	31
4.5 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 4.....	32
4.6 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 5.....	33
4.7 การข่มแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาจากดินแหล่งที่ 1.....	34
4.8 การข่มแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาจากดินแหล่งที่ 2.....	35
4.9 การข่มแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาจากดินแหล่งที่ 3.....	36
4.10 การข่มแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาจากดินแหล่งที่ 4.....	37
4.11 การข่มแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาจากดินแหล่งที่ 5.....	38
4.12 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 1 ...	39
4.13 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 2 ...	40
4.14 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 3 ...	41
4.15 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 4 ...	42
4.16 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 5 ...	43
4.17 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียรหัส A 14 และ แบคทีเรียรหัส D16.....	45

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างโคติน.....	3
2.2 รูปแบบโครงสร้างโคติน.....	5
2.3 กลไกของการย่อยสลายโคติน โดยจุลินทรีย์.....	15
4.1 ภาพแสดงการเกิด โคลีนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 1	27
4.2 ภาพแสดงการเกิด โคลีนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 2	27
4.3 ภาพแสดงการเกิด โคลีนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 3	28
4.4 ภาพแสดงการเกิด โคลีนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 4	28
4.5 ภาพแสดงการเกิด โคลีนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 5	28
4.6 ความสามารถในการย่อยสลายโคตินของแบคทีเรียรหัส A14 บนอาหารแข็งโคติน...	43
4.7 ความสามารถในการย่อยสลายโคตินของแบคทีเรียรหัส D16 บนอาหารแข็งโคติน...	44
4.8 ลักษณะ โคลีนีของแบคทีเรียรหัส A14 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์.....	46
4.9 รูปร่างของแบคทีเรียรหัส A14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า.....	46
4.10 ทดสอบการใช้ซีเตรทบนอาหารแข็งซิมมอนส์ซีเตรทของแบคทีเรียรหัส A14	47
4.11 ทดสอบการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหารแข็ง TSI ของแบคทีเรียรหัส A14	47
4.12 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบนอาหารแข็ง Urea ของแบคทีเรียรหัส A14	48
4.13 การทดสอบการหมักน้ำตาลเล็กโตสบนอาหารแข็ง MacConkey	48
4.14 ลักษณะ โคลีนีของแบคทีเรียรหัส D16 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์	49
4.15 รูปร่างของแบคทีเรียรหัส D16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	49
4.16 ทดสอบการใช้ซีเตรทบนอาหารแข็งซิมมอนส์ซีเตรทของแบคทีเรียรหัส D16	50
4.17 ทดสอบการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหารแข็งทีเอสไอของแบคทีเรียรหัส D16..	50
4.18 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบนอาหารแข็ง Urea ของแบคทีเรียรหัส D16	51

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งเป็นอุตสาหกรรมหลักของประมง นำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น ส่วนหัว เปลือก ส่วนใหญ่ถูกกำจัดโดยการนำไปทิ้งในทะเล เมา ผึ่งกลบ และใช้เป็นอาหารสัตว์ ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านมลพิษตามมา จึงได้มีการนำของเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า องค์ประกอบส่วนหนึ่งของหัวกุ้ง เปลือกกุ้ง มีไคติน (chitin) เป็นส่วนประกอบ

ไคตินเป็นโฮโมโพลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) เป็นสายยาวประกอบด้วยหน่วยย่อยของ *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(1,4) (Rheinheimer G. Mikrobiologia wod., 1987 ; Yu *et al.*, 1991 ; Huang I.H. *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 1997) ไคตินเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของรา ยีสต์ และจุลินทรีย์หลายชนิด หรือพบเป็นโครงสร้างแข็งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในกลุ่มของสัตว์ทะเลพวกครัสเตเชียน (crustacean) เช่น กุ้ง ปู ปลาหมึก และยังเป็นส่วนประกอบโครงสร้างภายนอกของแมลง และยังพบในไคอะตอม โปรโตซัว แมลง กลุ่ม arachnids และหนอนดักกลม (Transomo A., Harman G. E., 1993) ไคตินพบมากที่สุด ในทะเล ส่วนใหญ่จะพบในไฟโตแพลงคตอนก์ (phytoplankton) ไคตินในธรรมชาติจะอยู่ร่วมกับโปรตีนและเกลือแร่ การสกัดแยกไคตินต้องกำจัดเกลือแร่ออก (deminerlization) ด้วยกรด ลักษณะที่ได้เป็นแผ่นเหนียวหนืดคล้ายพลาสติก แล้วนำไปแยกโปรตีนออก (deproteinization) ด้วยด่างจะได้ไคติน หากเป็นไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งหรือปู จะมีสีส้มปนอยู่ นำไปแช่ในเอทานอลเพื่อละลายสีออก

ไคตินสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไคติเนส โดยจะพบเอนไซม์นี้ได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด แต่แหล่งเอนไซม์ที่สำคัญคือ จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ โดยเอนไซม์ไคติเนสจะย่อยสลายไคตินได้เป็น *N*-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการในระดับอุตสาหกรรม ทำให้เอนไซม์ไคติเนสเป็นที่สนใจ และมีประโยชน์อย่างมากในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ เช่น สารให้ความหวาน (sweeteners) โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Sakai, *et al.*, 1991 ; Felse, *et al.*, 2000)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ย่อยไคตินที่ได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Alginomonas*, *Aeromonas*, *Beneckea*, *Acromobacter* และ

Vibrio (Jeuniaux, 1966 ; Tsujibo *et al.*, 1991 ; Zhou *et al.*, 1999) เอนไซม์โคคิเนสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ใช้เป็นสารควบคุมโรคและแมลงที่เป็นศัตรูพืชและสัตว์น้ำ นำไปใช้ในการย่อยหัวกุ้งและเปลือกกุ้งโดยตรงเพื่อผลิต Single Cell Protein (SCP) โดย SCP จะถูกนำไปเป็นอาหารสัตว์ (Shaikh and Deshpande, 1993) นอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ และใช้ในการพัฒนาทางการแพทย์

ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ *N*-acetyl-D-glucosamine โดยอธิบายว่า ข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่ง glucosamine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) และเมทริกซ์ (matrix) ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคคิเนสจากดินแหล่งธรรมชาติ เพื่อที่จะนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นั้นนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากดินในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และดินบริเวณตลาดไท จังหวัดปทุมธานี ที่สามารถผลิตเอนไซม์โคคิเนส
- 1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
- 1.2.3 เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการศึกษารัชนีเป็นการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคคิเนสจากดินแหล่งธรรมชาติ โดยจะทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เช่น ทดสอบการเคลื่อนที่ การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทดสอบเอนไซม์อะเลส เป็นคั้น และการทดสอบการย่อยสลายโคคิเนส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

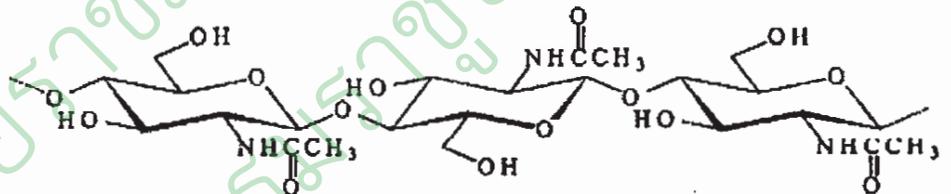
สามารถแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายโคคิเนส ที่ได้จากดินบริเวณที่ทิ้งของเสียจากโรงอาหาร 1 และ โรงอาหาร 2 ภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และดินบริเวณที่ทิ้งเศษอาหารของร้านอาหารใกล้ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี เพื่อจะนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อท้องถิ่นจังหวัดปทุมธานี และเพื่อประโยชน์ต่อ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคติน

ไคตินเป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่ได้จากธรรมชาติ จัดอยู่ในกลุ่มโฮโมพอลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของ β -N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamid-2-deoxy-D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมโนแซคคาไรด์ตัวถัดไป (ภาพที่ 2.1) มีชื่อทางเคมีว่า Poly (2-acetamino-2-deoxy-D-glucose) หรือ Poly (N-acetylglucosamine) ไคตินเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ (สุวดี จันทร์กระจ่าง, 2542; Cottrell *et al.*, 1999)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของไคติน

ที่มา : Gooday (1994)

ในธรรมชาติเราพบไคตินมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Shaikh and Deshpande, 1993) แต่ไม่พบเป็นโครงสร้างหลักเดี่ยวๆ ในสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่พบในรูปที่เป็นสารประกอบปะปนอยู่กับสารอื่นๆ เช่น อยู่ร่วมกับหินปูน หรือแคลเซียม และโปรตีน ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โดยเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใยขัดสารต่างๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะและสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์และสุวดี จันทร์กระจ่าง, 2542) ส่วนใหญ่สัตว์จำพวกที่มีเปลือกและเปลือกหุ้ม (Arthropods) ได้แก่ กุ้ง และปู เป็นต้น ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบสำคัญในการผลิตไคตินเชิงพาณิชย์ เนื่องจากกากของเสียที่ได้จากการแปรรูปเพื่อไปเป็นอาหารมีจำนวนมาก

โดยเฉพาะกุ้งซึ่งถือได้ว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของโลกมีมูลค่าการส่งออกและนำเข้าจำนวนมากในแต่ละประเทศทั่วโลก

องค์ประกอบของโครงสร้างค่อน้ำหนักตัวแห้งในกุ้ง และปู คิดเป็นประมาณ 15-20% ซึ่งปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างค่อน้ำหนักตัวแห้งของสัตว์ต่างๆ เหล่านี้ มีต่าง ๆ กันไป ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณไคตินที่มีในสิ่งมีชีวิตต่างๆ

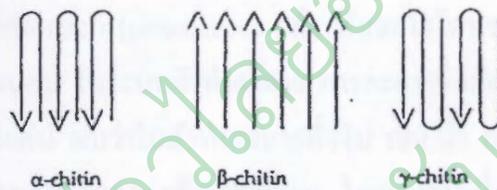
แหล่งวัตถุดิบ	ปริมาณที่พบ (%)
เข็ชรา	5-20
หนอน	20-38
ปลาหมึก	3-20
แมงป่อง	30
แมงมุม	38
แมลงสาบ	35
แมลงปีกแข็ง	37
กุ้ง	40
หนอนไหม	44
ปูเสฉวน	69
ปูหิน	70

ที่มา : สุพจน์ หารหนองบัว และคณะ (2546)

ไคตินพบในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในทะเลหลายชนิด โดยเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างภายนอกของแพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) และตัวอ่อนของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate larvae) เป็นผนังเซลล์ของคลอโรไฟต์ (chlorophytes) บางชนิด และเป็นโครงสร้างภายนอก (extracellular material) ของไดอะตอมบางชนิดและไพรม์นิซิโอไฟต์ *prymnesiophytes* (Cottrell *et al.*, 1999)

Muzzarelli (1977) รายงานว่าไคตินที่ได้จากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ก็จะมีรูปแบบแตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงได้เสนอรูปแบบผลึกของไคติน โดยใช้ความแตกต่างของการเกิดระบบของผลึก และปัจจัยการเกิดระบบผลึกของหน่วยเซลล์ภายในโครงสร้างผลึก ซึ่งความแตกต่างเป็นผลมาจาก

รูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลที่อยู่ตรงข้ามกันในระบบผลึก สายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินเกิดมาจากการรวมตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกันระบบผลึกของหน่วยเซลล์ ซึ่งเรียงตัวได้เป็น 2 แบบ คือแบบขนานที่มุ่งไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวสวนทางกัน (anti-parallel pattern) จากความแตกต่างดังกล่าวสามารถจำแนกไคตินได้เป็น 3 ชนิดคือ เบต้าไคติน (β -chitin) แอลฟาไคติน (α -chitin) และแกมมาไคติน (γ -chitin) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบโครงสร้างไคติน

ที่มา : Esaiassen (1996)

2.1.1 เบต้าไคติน เป็นไคตินที่มีโครงสร้างแบบขนานมุ่งไปในทิศทางเดียวกัน รูปแบบนี้มีโอกาสที่จะเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้างไปเป็นแอลฟาไคตินได้ในสารละลายกรดแก่ เช่น กรดเกลือ (HCl) เนื่องจากเบต้าไคตินมีความเสถียรน้อยกว่าแอลฟาไคติน สิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างเบต้าไคติน ได้แก่ ส่วนหนามของ polychaete สกฤด *Aphrodite* กระดองของหมีกสกฤด *Loligo* ส่วนที่เป็นท่อของหนอน สกฤด *Pogonophora* และส่วนหนามของโคอะดอมทะเล

2.1.2 แอลฟาไคติน เป็นไคตินที่มีโครงสร้างแบบเรียงตัวสวนทางกัน ซึ่งพบมากที่สุด ในธรรมชาติ ทั้งนี้เพราะแอลฟาไคตินมีคุณลักษณะที่มีลักษณะที่มีความเสถียรมากกว่าแบบอื่น เพราะมีพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) มากกว่าแบบอื่น สิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างแอลฟาไคติน ได้แก่ สิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน แมลง และรา

2.1.3 แกมมาไคติน เป็นไคตินที่มีโครงสร้างแบบผสมทั้ง 2 ชนิด คือ สองสายเป็นแบบที่ขนานไปในทิศทางเดียวกัน และสายสุดท้ายเป็นแบบสวนทาง พบที่ผนังกระเพาะอาหารชั้นในของหมีก สกฤด *Loligo*

2.2 สมบัติทางกายภาพของไคติน

2.2.1 การละลาย (solubility)

การละลายเป็นกระบวนการหนึ่งที่จะทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของสารกับตัวให้โมเลกุลของตัวทำละลายแทรกทำละลาย ดังนั้น ประเด็นที่สำคัญที่จะทำให้โพลิเมอร์หนึ่งๆ ละลายได้ดี จึงขึ้นอยู่กับการยอมผ่านเข้าไปในสารโซ่โพลิเมอร์

สำหรับไคตินและโคไคซาน ตัวทำละลายที่ดีต้องใช้หลักการของการเกิดพันธะอออนไปทดแทนที่ตำแหน่งไฮโดรเจน เช่น ที่ตำแหน่งอะมิโน หรือตำแหน่งอะเซตาไมด์ เมื่อตำแหน่งดังกล่าวกลายเป็นอออนบวก (protonation) แล้ว พันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย และอออนบวกจะสร้างพันธะกับอออนลบ ในระบบตัวทำละลาย การละลายจึงเกิดขึ้น

สำหรับไคติน พบว่าในตัวทำละลายทั่วไป เช่น น้ำ กรดเจือจาง ค่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ไม่สามารถที่จะทำให้ไคตินละลายได้ แต่ในขณะเดียวกัน กรดเข้มข้นจำพวกไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิก จะให้การละลายได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากกรดเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดการละลายได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากกรดเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดอออนบวกที่ตำแหน่งอะเซตาไมด์ และทำให้ตำแหน่ง C_2 ของไคตินกลายเป็นอออนบวก พันธะไฮโดรเจนจึงสลายลงในขณะที่พันธะอออนถูกสร้างขึ้นระหว่างอออนลบของกรดประเภทนั้นๆ ทำให้เกิดการละลายเกิดขึ้น (สุวบุญ จิรชาญชัย และคณะ, 2544)

2.2.2 ความหนืด (viscosity)

การไหลของโพลิเมอร์เป็นตัวชี้วัดขนาดของสายโซ่โพลิเมอร์ได้เป็นอย่างดี กล่าวคือ หากสายโซ่โพลิเมอร์ที่มีความยาวมาก จะแสดงสมบัติการไหลที่ช้า เนื่องจากเมื่อเตรียมสารละลายของโพลิเมอร์ประเภทนั้นๆ สารละลายจะมีความหนืดสูงค้นแปรไปตามมวลโมเลกุล

ความหนืดของสารละลายโคไคซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น degree of deacetylation น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น ความแรงของอออน (ionic strength) ความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายโพลิเมอร์จะลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายโพลิเมอร์ จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของโคไคซานในกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลง (ภาวดี เมระคานนท์ และคณะ, 2543)

2.3 การเสื่อมสลาย (degradation) ของไคติน

การศึกษาไคติน-ไคโตซาน ในรูปแบบการปรับโครงสร้างทางกายภาพ เช่น การเตรียมเป็น เจล เมมเบรน การบดเป็นผง การเตรียมบีคส์ และการปรับโครงสร้างทางเคมี โดยการสังเคราะห์ อนุพันธ์ต่างๆ ได้รับความสนใจมากแต่การประยุกต์ไคตินและไคโตซานในระดับผลิตภัณฑ์หรือ สินค้าที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมยังมีน้อย และเนื่องจากไคตินและไคโตซานมีมวลโมเลกุล จึงทำให้มีข้อจำกัดในการนำไคติน-ไคโตซานดังกล่าวมาพัฒนาเป็นสินค้ามูลค่าเพิ่ม (สุวรรณ จิรชาญ ชัย และคณะ, 2544) จึงทำให้มีการนำไคตินและไคโตซานมาสลายคุณภาพโดยกระบวนการต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.3.1 การเสื่อมสลายโดยวิธีปฏิกิริยาทางเคมี

เป็นการสลายสภาพที่เกิดขึ้น เช่น โดยกรด (acid hydrolysis) เป็นการสลายสภาพโซ่ โมเลกุลของไคโตซานแบบสุ่ม (random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และโมโน เมอร์ขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของโพลิเมอร์ โดยไคตินจะสามารถต้านทานต่อการเสื่อมสลายโดยกรดได้ดีกว่าไคโตซาน

2.3.2 การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ (enzymatic degradation)

การเสื่อมสลายโดยใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ มีความจำเพาะในตำแหน่ง การสลายสภาพ และจะได้โอลิโกเมอร์ที่เป็นระเบียบ ประกอบกับสถานะที่ใช้ก็ไม่รุนแรง เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคตินและไคโตซาน ได้แก่ เอนไซม์ไคตินเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสายโซ่ที่ตำแหน่งโมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม ตรงตำแหน่งพันธะ 1,4 linkage ได้ เป็น เอ็น อะซิติก ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (*N*- acetyl-chitooligosaccharide) (Aiba, 1993) เมื่อใน สายโซ่มีความเป็นไคตินมาก การย่อยสลายก็เด่นชัดและได้โอลิโกเมอร์ของไคโตซานที่เอนไซม์ไค ตินเนสว่างเว้นการย่อยไว้

2.3.3 การเสื่อมสลายโดยความร้อน (thermal degradation)

ไคตินและไคโตซานโดยทั่วไปจะดูดซับน้ำไว้ประมาณ 10% ของน้ำหนัก ดังนั้นเมื่อทำ การทดสอบสมบัติความร้อน จะพบพีค (peak) แสดงการสูญเสียโมเลกุลน้ำเกิดขึ้นเป็นช่วงกว้าง ตั้งแต่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส สำหรับการสลายทางความร้อนจะทำให้สูญเสีย โครงสร้างไคตินและไคโตซาน

2.4 ประโยชน์ของสารไคติน

เนื่องจากสารไคตินและไคโตซาน มีความหลากหลายและโดดเด่นในทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารที่มีประจุลบ และสามารถเกิดการดูดซับไอออนของ

โลหะหนักด้วยกรรมวิธีเคมีเชิงซ้อนและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมในด้านต่างๆ ดังนี้

2.4.1 ด้านการเกษตร

ปัจจุบันนี้โคตินและโคโคซาน มีบทบาทอย่างมากในด้านการนำไปใช้ทางการเกษตร เนื่องจากโคตินมีคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวเอง และยังมีผลในการต้านทานเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดรากโคนเน่าในพืชได้ จึงมีการนำมาฉีดพ่นพืชผัก พืชดอก พืชผลและนาข้าว ซึ่งได้ผลในบางบวททั้งสิ้น นอกจากนี้ใช้กับพืชแล้วเกษตรกรยังนำไปใช้ผสมในอาหารสัตว์ ช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตแข็งแรงมีสุขภาพดี มีภูมิต้านทานโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์หลายชนิดได้ และยังนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การเลี้ยงกุ้ง ช่วยให้กุ้งลอกคราบได้ดี และมีสุขภาพแข็งแรง (สุวดี จันทร์กระจ่าง, 2544)

2.4.2 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ปัจจุบันมีรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน ถึงสมบัติในการลดสารไขมัน เช่น คอเลสเตอรอล ซึ่งทำให้สารโคตินและโคโคซาน มีบทบาทในอาหารเสริมที่ใช้ลดไขมันและลดน้ำหนัก การใช้เป็นผิวหนังเทียม การรักษาแผลไฟฟ้มน้ำร้อนลวก การใช้รักษาเหงือกและฟัน การใช้รักษาและเสริมสร้างสุขภาพของกระดูกอ่อน การใช้เป็นสารหล่อลื่นในเขื่อเมือกตลอดจนเลนส์ตา การช่วยให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้โคโคซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ (สุวดี จันทร์กระจ่าง, 2544)

2.4.3 ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษเป็นอุตสาหกรรมที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจของประเทศสูงมากในยุคปัจจุบัน

การใช้โคตินและโคโคซานผสมในเส้นใยเพื่อพัฒนาเสื่อผ้าและสิ่งทอที่สามารถป้องกันและต้านทานเชื้อโรคได้ นอกจากนี้โคตินและโคโคซานยังมีสมบัติโคเคนในการเสริมสร้างความเหนียว และความแข็งแรงให้แก่เส้นใยและเยื่อกระดาษ ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพให้แก่กระดาษและพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดพิเศษเพื่อใช้ในการพิมพ์ด้วยเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่ทันสมัย

2.4.4 ด้านอาหารและเครื่องดื่ม

โคตินและโคโคซานเป็นอาหารเสริม ที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากในร่างกายคนไม่มีเอนไซม์ที่ย่อยโคตินและโคโคซาน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนัก อีกทั้งโคตินและโคโคซานยังมีสมบัติเป็นสารตัวพา (barrier) จึงมีการนำมาใช้ในเรื่องบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร (ภาวดี เมระคานนท์ และคณะ, 2543)

ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนโคตินและโคโคซานให้เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารได้ โดยนำไปใช้เป็นสารกัตุบูด สารช่วยรักษากลิ่น รส และสารให้ความข้น ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร



ผัก และผลไม้ เพื่อรักษาความสดหรือผลิตในรูปแบบฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) สำหรับบรรจุอาหาร

ในปัจจุบันมีการนำโคโคซานบริสุทธิ์มาเป็นอาหารเพื่อสุขภาพโดยมุ่งเน้นที่การลดความอ้วน ประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตขนมคุกกี้ควบคุมน้ำหนักและบะหมี่สำเร็จรูป ซึ่งมีส่วนผสมของโคโคซานออกจำหน่าย

สำหรับประเทศไทยได้วางตลาดผลิตภัณฑ์โคโคซานแคปซูลเพื่อลดคอเลสเตอรอลและควบคุมน้ำหนัก ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในรูปแบบอาหารเสริม

มีรายงานว่า โคโคซานช่วยลดคอเลสเตอรอล และไขมันในเส้นเลือด โดยโคโคซานไปจับกับคอเลสเตอรอล ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมไปใช้หรือดูดซึมได้น้อยลง จึงมีการโฆษณาเป็นผลิตภัณฑ์ลดน้ำหนัก ทั้งนี้ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากโคโคซานสามารถจับวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน (วิตามินเอ ดี อี เค) อาจทำให้ขาดวิตามินเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ทางการแพทย์ มีรายงานการนำ *N-acetyl-D-glucosamine* ไปใช้รักษาไขข้อเสื่อม โดยอธิบายว่า ไขข้อเสื่อมเกิดเนื่องจากการสึกกร่อนของเนื้อเยื่ออ่อนที่เคลือบอยู่ระหว่างข้อกระดูก ซึ่งกลูโคซามีน (glucosamine) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) และเมทริกซ์ (matrix) ของกระดูกอ่อน จึงช่วยทำให้เยื่อหุ้มกระดูกอ่อนหนาขึ้น

2.4.5 ด้านเครื่องสำอางค์และผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

โคโคตินและโคโคซานมีสมบัติโคโคเด่นในการอุ้มน้ำและเป็นตาข่ายคลุมผิวหนัง ตลอดจนต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ จึงใช้เป็นสารเติมแต่ง และสารพื้นฐานของเครื่องสำอางค์หลายประเภท เช่น ผสมเป็นแป้งทาหน้า ทั้งแบบแป้งแข็งและแป้งฝุ่น เพื่อความชุ่มชื้นและป้องกันเชื้อโรค เป็นส่วนประกอบของแชมพู ครีมนวดผม ครีมนวดผิว เนื่องจากสารละลายโคโคซานนั้นมีความหนืด และมีคุณสมบัติในการเคลือบ นอกจากนี้ยังเก็บความชุ่มชื้นไว้ได้จึงทำให้ผมนุ่ม

2.4.6 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

จากสมบัติการเป็นเส้นใยและพลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติของโคโคตินและโคโคซาน ทำให้โคโคตินและโคโคซานถูกนำมาใช้เพื่อทำเป็นสารห่อหุ้มเอนไซม์ และเซลล์ต่างๆ ได้ด้วยเทคนิคอิมมوبิลไลเซชัน (immobilization) การใช้เป็นตัวแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี การใช้ทำขั้วไฟฟ้าทางชีวภาพ เพื่อการวิเคราะห์และทดสอบสารต่างๆ นอกจากนี้ จากลักษณะที่โคโคเด่นเฉพาะตัวของโคโคตินและโคโคซานซึ่งสามารถขึ้นรูปได้หลากหลายรูปแบบ ทำให้โคโคตินและโคโคซานถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อบาง เพื่อใช้ในการกรองแยกด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น ไดอะไลซิส (dialysis) อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) นาโนฟิลเตรชัน (nanofiltration) และรีเวอร์สออสโมซิส (reverse osmosis) เป็นต้น

2.4.7 ด้านการบำบัดน้ำเสีย

โดยทั่วไป น้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารมีสารแขวนลอยสูง ไคโตซานมีประจุบวก สามารถจับกับโปรตีนและไขมันได้ดี ซึ่งโปรตีนที่ได้สามารถแยกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ต่อไป นอกจากนี้ ไคโตซานยังสามารถดูดซับอออนของโลหะหนัก และจับสี (dye) ช่วยในการบำบัดน้ำเสีย

2.4.8 ด้านการปศุสัตว์

ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และลดการติดเชื้อ ทำให้น้ำหนักตัวของสัตว์เพิ่มขึ้น

2.5 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) ที่มีประสิทธิภาพ สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงสูง โดยไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงขึ้น เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (globular protein) และมีบริเวณที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เรียกว่าบริเวณเร่ง (active site) โดยที่เอนไซม์แต่ละชนิด จะมีโครงรูป (conformation) และบริเวณเร่งที่จำเพาะ ซึ่งถูกกำหนดโดยการเรียงตัวของกรดอะมิโน การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดจากการจับกันระหว่างสับสเตรทกับบริเวณเร่งของเอนไซม์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (enzyme substrate complex) ซึ่งสับสเตรทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป เอนไซม์หลายชนิดต้องอาศัย ปัจจัยร่วม (cofactor) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนในการเร่งปฏิกิริยา โดยที่ปัจจัยร่วม อาจเป็นอออนของโลหะหรือเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นอนุพันธ์ของวิตามินที่เรียกว่า โคเอนไซม์ (coenzyme) เอนไซม์เกือบทุกชนิดมีโครงสร้างเป็นโปรตีนจึงเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ด้วยปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ เช่น ความร้อน ค่าพีเอช ตัวทำละลายอินทรีย์และสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ นอกจากนี้อุณหภูมิและค่าพีเอช ยังมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ กล่าวคือ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสม ในการเร่งปฏิกิริยา (optimum temperature and pH) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิและค่าพีเอชที่ทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเกิดได้สูงสุด ถ้าอุณหภูมิและค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงไปจากช่วง ที่เหมาะสมจะทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาลดลงอันเนื่องมาจากสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา ไม่เหมาะสมหรือเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ โดยปกติเอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ เรียกเอนไซม์เหล่านี้ว่า เอนไซม์ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ที่เซลล์สร้างขึ้นและขับออกมา

ภายนอกเซลล์เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมรอบเซลล์ เพื่อที่เซลล์จะได้นำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมาใช้ได้ (ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ, 2544)

2.5.1 ลักษณะการทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์สามารถจำแนกออกได้เป็นลักษณะใหญ่ๆ คือ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและยังมีความจำเพาะเจาะจงสูง กล่าวคือ มีความจำเพาะทั้งปฏิกิริยาที่ถูกเร่งและสารที่จะมาทำปฏิกิริยานั้นเรียกว่า สับสเตรท เอนไซม์ชนิดหนึ่งมักจะเร่งปฏิกิริยาเคมีเพียงปฏิกิริยาเดียวหรือปฏิกิริยาอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ที่เร่งการสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) โดยปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ และส่วนใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำด้วย นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์บางชนิดถูกควบคุมได้กล่าวคือเอนไซม์บางชนิดเมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ๆ จะอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (inactive precursor form) และสามารถที่จะทำงานได้ถ้าอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม โดยทั่วไป inactive precursor ของโปรติโอไลติกเอนไซม์เรียกว่า ไซโมเจน (zymogen) ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะไม่ทำให้สมดุลของปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนแปลงและเอนไซม์ยังทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีให้เกิดเร็วขึ้นโดยการลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) ของปฏิกิริยานั้นลง การเร่งปฏิกิริยาเคมีของเอนไซม์จะเริ่มจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์ (E) กับสับสเตรท (S) (enzyme substrate complex, ES) โดยที่สับสเตรทจะเกาะกับบริเวณเร่งบนโมเลกุลของเอนไซม์ เอนไซม์ส่วนมากจะมีการเลือกจับกับสับสเตรท และความจำเพาะเจาะจงในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความจำเพาะ ในการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเป็นส่วนใหญ่ โดยที่สับสเตรทที่เกาะที่บริเวณเร่งเอนไซม์จะเกาะกันด้วยแรงอื่นๆ มีทั้งแรงดึงดูดทางไฟฟ้า แรงดึงดูดประเภทโพลาร์ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) เช่นเดียวกับแรงที่ยึดโครงสร้างสามมิติของโปรตีนเอาไว้ นอกจากนี้ความจำเพาะของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรทขึ้นกับการจัดอะตอมในบริเวณเร่ง ซึ่งสับสเตรทจะต้องมีรูปร่างที่เหมาะสมกับบริเวณเร่งคล้ายๆ กับแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key) แต่บริเวณของเอนไซม์บางชนิดไม่คงรูปแบบแม่กุญแจ ในกรณีเช่นนี้บริเวณเร่งของเอนไซม์จะเปลี่ยนไปโดยการจับกับสับสเตรท บริเวณของเอนไซม์จะมีรูปร่างเหมือนกับสับสเตรทหลังจากเกาะกับสับสเตรทแล้วเท่านั้น การเกิดเช่นนี้เรียกว่า induced fit

2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง

เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ ในปฏิกิริยาเคมีทั่วไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรท ในช่วงที่สับสเตรทมี

ความเข้มข้นน้อยกว่าค่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่เร่ง โดยเอนไซม์ที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยามีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (K_m) และเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทมีค่ามากกว่าค่า K_m มากๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสับสเตรทนั่นกล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งจะหยุดคงที่ เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ที่มีอยู่ถูกใช้ในการเร่งปฏิกิริยาจนหมดเรียกว่า เอนไซม์อิ่มตัวด้วยสับสเตรท ดังนั้นเมื่อผ่านจุดนี้ไปแล้วจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอีก แต่กลับทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงได้ ในกรณีที่โมเลกุลของสับสเตรททำให้โอกาสของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทแตกตัวเป็นผลิตภัณฑ์และเอนไซม์ได้น้อยลงและจุดที่ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเริ่มคงที่จะเป็นอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น ของเอนไซม์ แต่เอนไซม์บางชนิดถ้าเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาอาจลดลง เนื่องจากการรวมตัวกันของเอนไซม์หรือเกิดจากจำนวนสับสเตรทมีจำกัด ค่าพีเอชก็มีผลต่อ การทำงานของเอนไซม์เช่นกัน ซึ่งเกิดขึ้นได้เนื่องจากอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกี่ยวกับ (acid - base catalysis) จะขึ้นกับความเข้มข้นของหมู่กรดและเบสทั้งใน โมเลกุลของเอนไซม์และสับสเตรท และการแตกตัวของหมู่เหล่านี้ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของเอนไซม์ และในบางครั้งโครงสร้างทั้งหมดของโมเลกุลเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือสับสเตรทที่ ค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปมักทำให้ประจุเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากันหรือมีส่วน ที่ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดย่อม จะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมเรียกว่า optimum pH ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าสูงสุดด้วย นอกจากนี้ การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป จะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติเป็นเหตุทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดเรียกว่า optimum temperature ซึ่งอุณหภูมิโดยทั่วไปที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดนั้นจะอยู่ในช่วงประมาณ 30-50 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์บางตัวก็ยังสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เอนไซม์และสับสเตรททำปฏิกิริยากัน ถ้าปฏิกิริยาเกิดในช่วงระยะเวลาสั้นๆ พบว่า ค่า optimum temperature จะมีค่าสูงกว่า การที่เอนไซม์และสับสเตรททำปฏิกิริยากันเป็นระยะเวลานาน ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเช่นกัน เพราะจะเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาไปข้างหน้าลดลง นอกจากนี้เอนไซม์หลายชนิดจะเร่งปฏิกิริยาได้ไม่สมบูรณ์หรือไม่เร่งปฏิกิริยาถ้าไม่

มีอิออนของโลหะ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ (activator) ปั้งจับสุดท้ายที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งจะมีผลต่อการจับตัวของสับสเตรทกับเอนไซม์ทำให้สับสเตรทมีโครงสร้างไม่เหมาะสมกับเอนไซม์ หรือมีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาลดต่ำลงหรือหยุดปฏิกิริยา สารที่มีผลต่อการจับของสับสเตรทกับเอนไซม์เป็นสารที่มี สูตรโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรทหรือโคเอนไซม์ เช่น สารประกอบไซยาไนด์และ ไธโอไซยาไนด์ (ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ, 2544)

2.6 เอนไซม์ไคตินเอส

ไคตินเอส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพันธะ β -(1,4) ไกลโคไซด์ของไคติน ให้เป็นหน่วยย่อยโอลิโกเมอร์ของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) ซึ่งส่วนมากเป็นชนิดโคเมอร์ การทำงานของระบบไคติโนไลติก (chitinolytic system) ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคตินเอส (chitinase ; EC 3.2.1.14) และไคโตไบเอส (chitobiase; EC 3.2.1.30) ระบบดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติ มากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสให้หน่วยย่อยเป็น *N*-acetylglucosamine (NAG)

ไคตินเอสเป็นเอนไซม์ที่แตกพันธะระหว่าง C_1 และ C_4 หรือพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ของ GlcNAc ที่ต่อกันไคติน สิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบของร่างกายจะสร้างเอนไซม์ไคตินเอสด้วย แต่บางชนิดที่ไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบก็สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้ ได้แก่ แบคทีเรีย และพืชชั้นสูง (Flach *et al.*, 1992)

วัตถุประสงค์การสร้างเอนไซม์ไคตินเอสของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น รา และแมลง ใช้เอนไซม์ไคตินเอสสำหรับการพัฒนาการและการเจริญของผนังเซลล์และเปลือกแบคทีเรีย ใช้เอนไซม์ไคตินเอสในระบบการโภชนาการ (nutrition) และในพืชใช้เอนไซม์ไคตินเอสในการป้องกันโรคจากราแบคทีเรีย และแมลง (Koga *et al.*, 1992; Roberts and Selitrennikoff, 1988)

Shaikh and Deshpande (1993) ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์ย่อยไคตินไว้ 3 ชนิดหลัก คือ

(1) endo-chitinase (EC3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแบบสุ่มในสายโซ่ของ *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) ซึ่งจะได้ diacetylchitobiose เป็นผลผลิตหลักและได้ triacetylchitotriose บ้างเล็กน้อย

(2) *N*-acetylglucosaminidase (EC3.2.1.52) เป็นเอนไซม์ที่ย่อย dimer (diacetylchitobiose) โดยบางครั้งเอนไซม์จะย่อยหน่วยของ GlcNAc จากปลายด้าน non-reducing ของสายโซ่ไคติน

(3) exo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นทำให้เกิดการแตกตัวของ diacetylchitobiose จากปลาย non-reducing ของสายไคติน

Flach *et al.* (1992) รายงานว่าเอนไซม์ย่อยไคตินที่พบในราจะต่างกันไป คือ *Aspergillus nidulan* ผลิต β -N-acetylglucosaminidase และ endochitinase และ *Mucor rouxii* ผลิต exochitinase

2.7 แหล่งไคตินสที่พบในธรรมชาติ

โดยทั่วไปจะพบเอนไซม์ไคตินเนสในสิ่งมีชีวิตที่มีไคติน เช่น อาร์โทพอด (Arthropods) เชื้อราต่างๆ ซึ่ง ได้แก่ Actinomycetes Basidiomycetes Phycomycetes และ Deuteromycetes บทบาทของไคตินเนสในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้คือ การสร้าง exoskeleton ของ Arthropods และผนังเซลล์ของเชื้อรา ยังพบไคตินเนสในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีไคตินอีกด้วย เช่น จุลินทรีย์ในดิน ระบบทางเดินอาหารของปลาและพืช มีรายงานการตรวจพบไคตินเนสในพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ ข้าว น้ำยางพารา ข้าวสาลี และมะเขือเทศ เป็นต้น แหล่งการพบไคตินจากสิ่งมีชีวิตสามารถหาได้ดังนี้

2.7.1 สัตว์

Matsumiya *et al.* (1998) ศึกษาไคตินเนสจากปลาหมึกกล้วย (squid) 4 สายพันธุ์ ตรวจพบไคตินเนสบริเวณกระเพาะอาหาร ลำไส้และตับ ซึ่งจะพบไคตินเนสสูงบริเวณตับ และยังพบในเปลือกหอยพัด เปลือกหอยแมลงภู่มะพร้าว (*Mytilus edulis*) และยังพบไคตินเนสใช้ในการลอกคราบของแมลงพวงไหม (*Bombyx mori*) *Manduca sexta* และแมลงสายพันธุ์อื่นๆ

2.7.2 พืช

สามารถตรวจพบไคตินเนสบริเวณที่พืชถูก infect จากเชื้อราก่อโรค พืชศุข ศรีโยธา (2539) สกัดไคตินเนสจากเมล็ดพืชพวกพดกฤษ์ กระถินพิมาน นนทรีทอง ก้ามปู ไม้แดง สีเสียด ออสเตรเลีย กระถินเทพา ข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ นนทรีป่า และแคฝรั่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรค

2.7.3 จุลินทรีย์

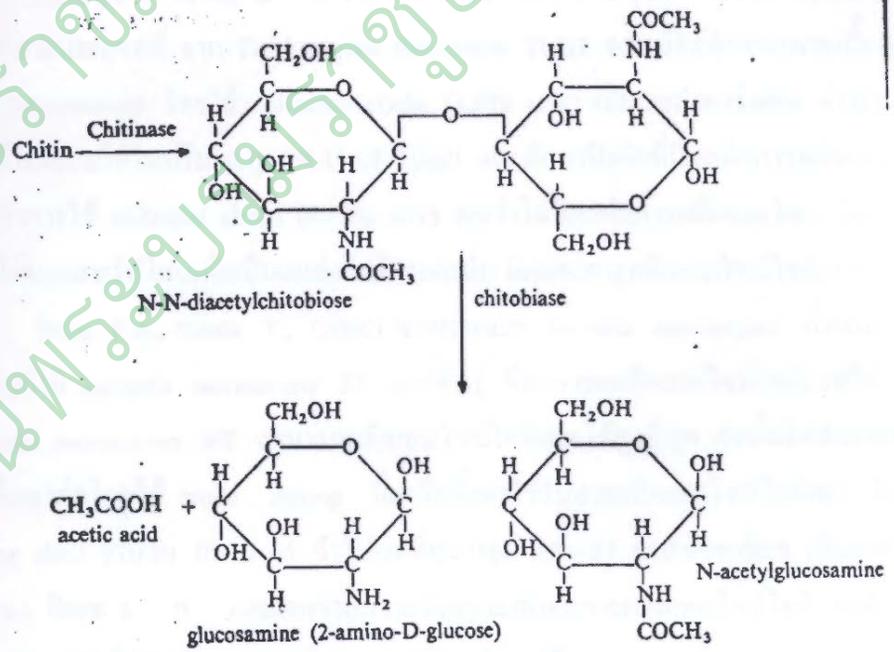
ไคตินเนสที่ได้จากแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านสารควบคุมชีวภาพหรือใช้ย่อยสลายของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมทางทะเล (chitinous waste) เช่น เปลือกกุ้ง หัวกุ้ง กระดองปู เพื่อให้ได้ไคตินนำไปใช้เป็นยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มีคุณค่าต่อไป แบคทีเรียที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ ได้แก่ *Serratia marcescent* (Khoury *et al.*, 1997) *Pseudomonas aeruginosa* (Wang *et al.*, 1999) *Xanthomonas* sp. (Yomaoka *et al.*, 1999) *Bacillus cereus* (Wang and Hwang, 2001)

ขณะที่เกิดการเกิดสลายตัว มีอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารเกิดขึ้นมากหลายชนิดด้วยกัน จากการศึกษาค้นคว้าโดย *Pseudomonas chitinovorans* และ *Cytophaga johnsonae* ปรากฏว่ามีสารที่

สะสมอยู่หลังการย่อยสลายของ chitin คือ N-acetylglucosamine, glucosamine, acetic acid และ แอมโมเนีย สารต่างๆ เหล่านี้ถูกเว้นแอมโมเนีย ถูกย่อยสลายต่อไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และคาร์บอนในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยสรุปแล้วการย่อยสลายของไคตินมี pathway (ภาพที่ 2.3)

ปัญหาหลักในการผลิตเอนไซม์ คือ ราคาการผลิตเอนไซม์นั้นมีความแพง จึงได้มีการศึกษาหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงและมีราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีราคาไม่แพง (S. Hirano, 1996, J.K. Yang *et al.*, 2000) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ คือ *Bacillus pabuli* (Frandsberg *et al.*, 1994) *Bacillus licheniformis* (Takayanga *et al.*, 1991) *Bacillus circulans* (อรรถวุฒิ, 2548)

Rheinheimer (1987) จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิดที่สามารถผลิต chitinolytic enzyme ได้ พบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ คือ *Vibrio* sp. *Pseudomonas* sp. และส่วนแอคติโนมัยซีท์ที่ผลิตเอนไซม์ได้ คือ *Micromonospora* sp.



ภาพที่ 2.3 กลไกของการย่อยสลายไคตินโดยจุลินทรีย์
ที่มา : สมศักดิ์ วังใน (2528)

Monreal J. and Reese E. T. (1969) ทำการแยก *Serratia marcescens* QMB 1466 จากจุลินทรีย์ 100 สายพันธุ์ และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส พบว่าใช้

swollen pure chitin 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 สายพันธุ์ส่วนใหญ่สามารถ
ใช้ chitin ในรูป colloidal เป็นตัวกระตุ้นในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และเป็นแหล่งคาร์บอน

เขาวนิพร บุญช่วย (2539) จากการศึกษาการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากตะกอน
ดินของบ่อเลี้ยงกุ้งระยะที่กุ้งมีการลอกคราบ พบแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. CS-34 เป็นสายพันธุ์ที่
สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ในปริมาณที่สูงและเป็นการผลิตเอนไซม์ส่งออกนอกร่างกายนอก
เซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว minimal medium ที่มีไคตินผงเป็นแหล่งคาร์บอน
ซึ่งจะสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสได้ดีกว่า colloidal chitin

Hanzlikova A., Jandera A. (1993) จากการศึกษาการเติมไคตินลงในดิน (0.6%) ว่า
มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม chitinolytic ได้ดี (เพิ่มขึ้น 1.7 – 26.5%) และการสร้าง
เอนไซม์ไคตินเนสในดิน การเติมไคตินและกลูโคสลงในดิน (0.6%) อัตราส่วนของจุลินทรีย์กลุ่ม
chitinolytic ยังคงมีคล้ายคลึงกับการที่ไม่มีการเติมไคตินและกลูโคสลงในดิน แสดงว่าการเติมไค
ตินและกลูโคสลงในดินนั้น ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

Sandhya C. et al. (2004) จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเป็นเอนไซม์
ที่ผลิตออกนอกร่างกายนอกเซลล์ จาก *Trichoderma harzianum* TUBF 966 โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ
submerged fermentation โดยใช้ colloidal chitin (1.5% w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถ
ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ในปริมาณสูงสุด (14.7 U/ml) และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์
ไคตินเนสพบว่าการใช้ colloidal chitin (0.75% w/v) พบว่าไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ในขณะที่
การเติมเปปโตเนและทริปโตเนเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

Felse P.A., Panda T., (2000) จากการศึกษาการแยก *Serratia marcescens* ทั้งหมด 102
สายพันธุ์ พบว่ามี *Serratia marcescens* 57 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ และ
พบว่า *Serratia marcescens* WF สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์
ดังกล่าวมาศึกษาต่อโดยใช้ crude shrimp ที่เหลือทิ้งมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยใช้
crude shrimp shell จำนวน 10-70 g/l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24
– 96 ชั่วโมง พีเอช 6 – 9 และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสคือ dry
shrimp powder 6% พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไคตินในดินส่วนใหญ่ (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) เป็นพวกแอ
คติโนมัยซีท นอกนั้นเป็นแบคทีเรียและเชื้อรา จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้จัดอยู่ใน genera ดังนี้คือ
Streptomyces Micromonospora Achromobacter Beneckea Chromobacterium Flavobacterium
Cytophaga Micrococcus Pseudomonas Trichoderma Mortierella Gliocladium Thamnidium
Bacillus Mucor Nocardia Aspergillus Fusarium Penicilliu และ Absidia

2.8 การนำไคตินไปใช้ประโยชน์

2.8.1 ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein, SCP)

SCP ส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการใช้ไคตินส่อยสลาย chitinous waste นำไปใช้เป็นซับสเตรทในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิต SCP ต่อไป

2.8.2 ใช้ในการย่อยสลาย shellfish waste

(Felse and Panda, 2000) *N*-acetyl-D-glucosamine และ monomer ของไคตินนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมการผลิตยาและการผลิตอาหาร เช่น สารให้ความหวานและใช้เป็น growth factor *N*-acetyl-D-glucosamine เตรียมจากการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ด้วยสารเคมี กระบวนการแบบนี้ต้องใช้ต้นทุนสูงและมีปัญหาในด้านราคา *N*-acetyl-D-glucosamine จึงได้มีการผลิตไคตินสมาผลิต *N*-acetyl-D-glucosamine ย่อยสลายไคตินจากเปลือกของสัตว์ทะเลที่เหลือทิ้งอุตสาหกรรมต่างๆ

2.8.3 ใช้เป็นสารควบคุมยุง

การแพร่ระบาดของยุงที่เป็นพาหะนำโรคก่อให้เกิดอันตรายได้ทุกประเทศ จำเป็นที่จะต้องมีการควบคุม มีการศึกษาใน *Myrothecium verrucaria* เป็นเชื้อราประเภท saprophyteic สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลาย cuticle ของแมลง จากการทดลองพบว่า crude enzyme ที่เตรียมได้จากไคตินของ *Myrothecium verrucaria* สามารถฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 1 และตัวอ่อนระยะที่ 4 ของยุง *Aedes aegypti* ที่เป็นพาหะของไข้เลือดออกและไข้ส่าภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาคุณสมบัติของ crude enzyme พบว่าเป็น endochitinase

2.8.4 เป็นสารควบคุมชีวภาพ

พืชหลายชนิดเมื่อถูก pathogen infect บริเวณที่ถูก infect จะมีการผลิต PR-protein like chitinase β -1,3-glucanase และ protein inhibitor เพื่อป้องกันตนเองโดยจะทำหน้าที่ในการย่อยไคตินที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราก่อเชื้อโรคและเปลือกของแมลง

Roberts and Selitrennikoff (1998) ศึกษาไคตินของพืชและไคตินของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และไคตินของพืชจากเมล็ดข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด เป็นไคตินชนิด exochitinase สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

พูนสุข (2539) ได้ศึกษาไคตินของเมล็ดพืช ได้แก่ กระถินเทพาและเมล็ดแคฝรั่ง นำเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดมาทดสอบ antifungal activity พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Collectotrihum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Diplodia Phytophthora* และ

Pestolotiopsis sp. เชื้อราที่สามารถยับยั้งการแพร่ของเชื้อ ได้แก่ *Beauveria bassiana* *Beauveria brongniartii* และ *Verticillium lecanii*

2.8.5 ใช้ในการผลิต fungal protoplast

การทำ protoplast ของเชื้อราเพื่อนำมาศึกษา การสังเคราะห์ผนังเซลล์ การหลั่งของ เอนไซม์ออกจากผนังเซลล์ การ transformant ของสเตอรอยด์ (steroid) การเกิด mutagenesis

2.8.6 ใช้เป็นตัวติดตาม ใช้เป็นตัวติดตามในวิธี chitin binding protein

เพื่อตรวจเชื้อราที่ infect ในมนุษย์

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการวิจัย

- เครื่องชั่งละเอียด (balance) OHAUS NOB110
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) DENVER INSTRUMENT 215
- ตู้อบความร้อน (hot air oven) MEMMERT 100-800
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) TOMY ES-315
- กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) OLYMPUS CH30RF200
- เครื่องกวนสาร (stirrer) TURBORA THP160
- ขวดเก็บตัวอย่างดิน (sterile bottle)
- หลอดทดลองขนาดกลาง (tube)
- จุกปิดหลอดทดลอง (cork tube)
- ที่ตั้งหลอดทดลอง (rack)
- จานเพาะเชื้อ (plate)
- ปีกเกอร์ (breaker)
- กระบอกควง (cylinder)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ปิเปต (pipette)
- ลูกยาง (rubber)
- แผ่นสไลด์ (slide)
- กระจกปิดสไลด์ (cover glass)
- แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (lamp)
- กระบอกปิเปต (pipette sterile can)

- กระบอกเปตริดิส (petri dish sterile can)
- สแตนเลส (stainless)
- กรวยกรอง (funnel)
- กระดาษกรอง (filter Paper)
- แท่งแก้วคนสาร (sterring rod)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- เตาไฟฟ้า (hot plate)
- แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)
- หลอดหยด (dropper)
- สำลี (cotton)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้

- | | |
|---|----------------|
| - ไคติน พาวเดอร์ (chitin powder) | Himedia |
| - เปปโตน (peptone) | Himedia |
| - บีฟเอ็กแทร็ก (beef extract) | Himedia |
| - ยีสต์เอ็กแทร็ก (yeast extract) | Himedia |
| - กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid, H_3PO_4) | Univar |
| - โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) | Univar |
| - แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต
(magnesiumsulfate - heptahydrate; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | Univar |
| - โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
(potassium dihydrogen phosphate; KH_2PO_4) | Univar |
| - ฐันผง (agar) | Chemikit |
| - คริสตอลไวโอเลต (crystal violet) | Chemikit |
| - ซาฟรานิน (safranin) | D C Panreac |
| - ทรีปโตน (tryptone) | Himedia |
| - ไอโอดีนคริสตอล (iodine crystal) | Chemikit |
| - กลูโคส (glucose) | Riede - dehaen |
| - ฟีนอลเรด (phenol red) | Univar |
| - บรอมไทมอลบลู (bromthymol blue) | Fluka |
| - ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) | Chemikit |

- แอลกอฮอล์ (alcohol)
- น้ำกลั่น (dissilled water)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (nutrient agar)

อาหารแข็งไคติน (chitin agar)

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 แหล่งที่ทำการเก็บดินตัวอย่าง

3.3.1.1 ดินบริเวณโรงอาหาร 1 มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

3.3.1.2 ดินบริเวณแปลงเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

3.3.1.3 ดินบริเวณสระน้ำหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

3.3.1.4 ดินบริเวณหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

3.3.1.5 ดินบริเวณที่ห้องเศษอาหารของร้านอาหารใกล้ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี

3.3.2 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินทั้ง 5 แหล่ง โดยแต่ละแหล่งจะเก็บตัวอย่างดินแหล่งละ 3 ตัวอย่าง โดยเก็บใส่ในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำตัวอย่างดินไปตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.3 การตรวจนับเชื้อแบคทีเรีย

ชั่งตัวอย่างดินมา 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่มีปริมาตร 225 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายตัวอย่างดินมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางที่ $10^{-1} - 10^{-6}$ ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายแต่ละความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (nutrient agar) โดยทำการ spread plate ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

3.3.4 การแยกเชื้อและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียจากงานเพาะเลี้ยงเชื้อที่นับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดแล้ว โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่างและลักษณะของโคโลนี หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่มีลักษณะที่

แตกต่างกันมาทำ cross streak เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารแข็งนิวเตรียนท์ และเก็บลงในอาหารวุ้นเอียง (nutrient agar slant)

3.3.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ มาเพาะเลี้ยงแบบ point inoculation บนอาหารแข็ง chitin agar (CHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและโคโลนี หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการแบคทีเรียทั้งหมดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.4.1 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะของรูปร่างแบคทีเรีย และลักษณะ โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง นิวเตรียนท์

3.4.2 การติดสีแกรม

แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ อายุ 24 ชั่วโมง นำไปย้อมแกรมดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

สามารถแบ่งแบคทีเรียตามลักษณะของการติดสีได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เรียกว่า แบคทีเรียแกรมบวก (Gram – positive bacteria) และพวกที่ติดสีแดงของซาฟรานิน (safranin) เรียกว่า แบคทีเรียแกรมลบ (Gram – negative bacteria)

3.5 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี

3.5.1 การทดสอบคะตะเลส (catalase test)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์อายุ 24 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (3% H₂O₂) ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างคะตะเลสได้ให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซแสดงว่า เชื้อไม่สามารถสร้างคะตะเลสได้ให้ผลเป็นลบ (ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย, 2547)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้หรือไม่ เอนไซม์คะตะเลสเป็นฮีโมโปรตีน (haemprotein) ที่มีอยู่ในระบบไซโทโครม (cytochrome system) ของแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน และกลุ่มที่ใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

เอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme)



ข้อควรระวัง

(1) ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุ 18 ถึง 24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์อะคะเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้น ผลลบปลอม (false negative reaction) อาจเกิดขึ้นได้ หากใช้เชื้ออายุเกิน 24 ชั่วโมง

(2) ห้ามใช้เชื้อที่เลี้ยงจากอาหารที่มีเลือดผสม เพราะในเม็ดเลือดแดงมีเอนไซม์อะคะเลสจึงอาจให้ผลบวกปลอม (false positive reaction) (ศุภยงค์ วรวิฑูริคุณชัย, 2547)

3.5.2 ทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียเคลื่อนที่ได้หรือไม่ โดยดูจากการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีวุ้นผสมอยู่เพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (semisolid agar) มีประโยชน์มากในการแยกจีส หรือสปิซิส ของแบคทีเรียแกรมลบ วิธีทดสอบทำโดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium) โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่เคลื่อนที่จะขึ้นกระจายรอบๆ รอยที่แทง semisolid agar จะขุ่น ให้ผลเป็นบวก (+) แบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่จะเจริญเฉพาะตามแนวที่แทงเชื้อ ให้ผลเป็นลบ(-) ดังนั้น semisolid agar จะใช้สำหรับเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ไม่ดี ให้เลี้ยงเชื้อต่อที่ 21 ถึง 24 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วทดสอบการเคลื่อนที่อีกครั้ง

3.5.3 ทดสอบซิเตรท (citrate agar)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถใช้ซิเตรทเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้หรือไม่ แบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรทเพียงอย่างเดียว จะเจริญบนอาหารแข็งซิมมอนส์ซิเตรทและให้ผลิตภัณฑ์เป็นด่าง ทำให้บรอมไทมอโนบลูเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน วิธีการทดสอบทำโดยถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารซิมมอนส์ซิเตรท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน เชื้อที่เจริญและทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวก (+) เชื้อไม่เจริญ (อาหารไม่เปลี่ยนสี) ให้ผลเป็นลบ (-)

3.5.4 การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารแ่งทีเอสไอ (TSI agar) ครั้งแรกจะแทงลงไป ในอาหารที่เอียงจนสุดหลอด ครั้งที่สองจะลากไปบนผิวหน้าอาหารที่เอียง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร เชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะให้สีด่างของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่ถ่ายเชื้อ อ่านผลเป็นบวก นอกจากนี้ อาหารแ่งทีเอสไอ ยังสามารถทดสอบได้ 2 ชนิด คือ การทดสอบการใช้น้ำตาล และ การทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะในอาหารมีน้ำตาล 3 ชนิดคือกลูโคส 1 ส่วน แล็กโทส 10 ส่วน และ ซูโครส 10 ส่วน มีฟีนอลเรดเป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาล ในกระบวนการหมัก

(oxidation) จะมีการเจริญที่ผิวหน้าของอาหาร แบคทีเรียที่ใช้กลูโคสได้อย่างเดียวในกระบวนการหมักจะทำให้มีกรดน้อยจึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิวจะมีสีแดง ถ้าใช้ซูโครสหรือแล็กโทสด้วยจะมีสีเหลืองที่ผิวหน้าอาหารเพราะมีกรดเกิดจำนวนมาก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีแสดงว่าไม่มีการหมัก และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองก๊าซจะอยู่ในวุ้นอาหาร

3.5.5 ทดสอบการย่อยแป้ง

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนผสม (starch agar) คูผลการทดลองโดยเทสารละลายไอโอดีนลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีเชื้อที่เจริญแสดงว่าเชื้อย่อยแป้งวัดหาผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อและบริเวณใสที่เกิดขึ้น

3.5.6 ทดสอบเมทิลเรด (MR test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตกรดจากกลูโคสได้หรือไม่ แบคทีเรียที่สร้างกรดได้มากจะทำให้ pH มีค่าต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ methyl red เป็นสีแดง ทดสอบโดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร MR - VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นหยด methyl red ประมาณ 5 หยด ถ้าสีของอาหารในหลอดเป็นสีแดงให้ผลเป็นบวก (+) ถ้าสีของอาหารไม่เปลี่ยนสี ให้ผลเป็นลบ (-)

3.5.7 การทดสอบวีพี (VP test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต acetoin จากกลูโคสได้หรือไม่ เมื่อเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) 40 % จะทำให้ acetoin ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกลางสูงถูก oxidize เป็น diacetyl ซึ่งทำปฏิกิริยากับอัลฟาเนฟทอลให้สีแดง ทดสอบโดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงในอาหาร MR - VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดแอลฟาเนฟทอล 5 % ประมาณ 6 หยด แล้วเขย่าเบาๆ หยด KOH 40 % ประมาณ 2 หยด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 ถึง 15 นาที ผลที่ได้ถ้าสีของอาหารในหลอดเป็นสีแดงให้ผลเป็นบวก (+) แต่ถ้าสีของอาหารไม่เปลี่ยนสี ให้ผลเป็นลบ (-)

3.5.8 การทดสอบอินโดล (Indole test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole ได้หรือไม่ โดยเลี้ยงในอาหารที่มีทริปโตเฟน ทดสอบโดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงใน tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent ประมาณ 5 หยด เขย่าเบาๆ การอ่านผลโดยที่เชื้อเกิดวงสีแดงที่ผิวของ broth ให้ผลเป็นบวก (+) แต่ถ้าเกิดสีเหลืองของ Kovac's reagent ที่ผิวของ broth ให้ผลเป็นลบ (-)

3.5.9 การทดสอบยูรีเอส (Urease test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียมี urease enzyme หรือไม่ แบคทีเรียที่มี urease enzyme สามารถย่อยสลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ phenol red ให้เป็นสีชมพูบานเย็น ทดสอบโดยการ streak เชื้อแบคทีเรียบน urea agar แบบถ้ำๆ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูบานเย็น ให้ผลเป็นบวก (+) ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี ให้ผลเป็นลบ (-)

3.6 การทดลองเลี้ยงในอาหารแข็ง MacConkey

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกมาได้เป็นแบคทีเรียในสกุลเดียวกับ *Serratia* sp. ซึ่งแบคทีเรียสกุล *Serratia* sp. สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง MacConkey

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 การตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งทั้ง 5 แหล่ง ได้แก่

แหล่งที่ 1 ดินบริเวณโรงอาหาร 1 มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ฯ

แหล่งที่ 2 ดินบริเวณแปลงเกษตรมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ฯ

แหล่งที่ 3 ดินบริเวณสระน้ำหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ฯ

แหล่งที่ 4 ดินบริเวณหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ฯ

แหล่งที่ 5 ดินบริเวณที่ทิ้งเศษอาหารของร้านอาหารใกล้ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี

โดยจะเก็บตัวอย่างดินแต่ละแหล่งๆ ละ 3 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างดินมาทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดของดินทั้ง 5 แหล่ง

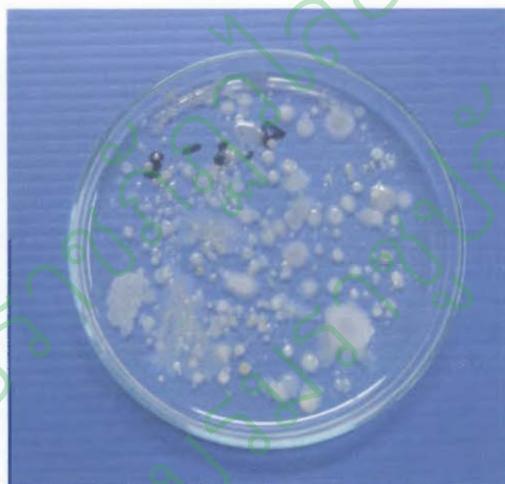
ดินแหล่งที่	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/ml)
แหล่งที่ 1	1.01×10^5
แหล่งที่ 2	1.36×10^5
แหล่งที่ 3	1.41×10^5
แหล่งที่ 4	2.25×10^5
แหล่งที่ 5	2.10×10^5

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดของดินแหล่งที่ 1 มีเท่ากับ 1.01×10^5 CFU/ml ดินแหล่งที่ 2 มีปริมาณเท่ากับ 1.66×10^4 CFU/ml ดินแหล่งที่ 3 มีปริมาณเท่ากับ 1.41×10^5 CFU/ml ดินแหล่งที่ 4 มีปริมาณเท่ากับ 2.25×10^5 CFU/ml ดินแหล่งที่ 5 มีปริมาณเท่ากับ 2.10×10^5 CFU/ml

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.2.1 ลักษณะการเจริญและสัณฐานวิทยา

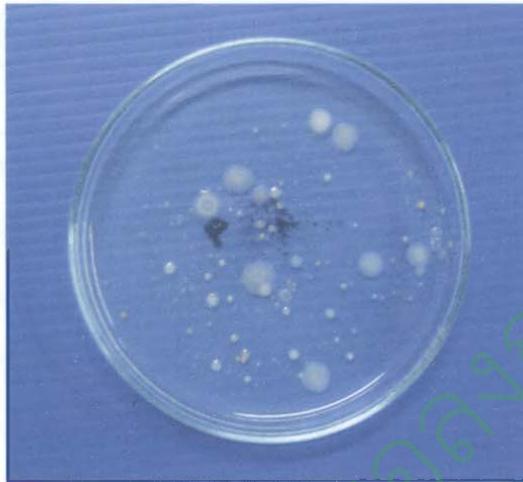
โดยเลือกเก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจากงานเพาะเชื้อที่นับปริมาณเชื้อแบคทีเรียแล้ว โดยอาศัยความแตกต่างของสี รูปร่างและลักษณะโคโลนีมาแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาตากบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ ผลของการแยกแบคทีเรียจากดินจากดินทั้ง 5 แหล่ง พบว่าดินแหล่งที่ 1 สามารถแยกได้ 14 ไอโซเลต ดินแหล่งที่ 2 สามารถแยกได้ 12 ไอโซเลต ดินแหล่งที่ 3 สามารถแยกได้ 12 ไอโซเลต ดินแหล่งที่ 4 สามารถแยกได้ 17 ไอโซเลต และดินแหล่งที่ 5 สามารถแยกได้ 12 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2 - 4.6)



ภาพที่ 4.1 ภาพแสดงการเกิด โคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 1



ภาพที่ 4.2 ภาพแสดงการเกิด โคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 2



ภาพที่ 4.3 ภาพแสดงการเกิดโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 3



ภาพที่ 4.4 ภาพแสดงการเกิดโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 4



ภาพที่ 4.5 ภาพแสดงการเกิดโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 5

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของโคลนที่เรียที่ที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 1

รหัส	ลักษณะของโคลน
A1	โคลนีสีครีม ผิวหน้านูนมัน เจริญบนผิวหน้าอาหาร
A2	โคลนีสีขาวครีม โปร่งแสง ผิวหน้านูน เจริญบนผิวหน้าอาหาร
A3	โคลนีสีครีม มีขนาดเล็ก ผิวหน้ำมันวาว ขอบเรียบ
A4	โคลนีสีเหลืองเข้ม มีขนาดเล็ก ผิวหน้านูน ขอบเรียบ
A5	โคลนีสีเหลือง มีขนาดเล็ก ผิวหน้านูน
A6	โคลนีสีครีม-เหลือง ขอบเรียบ โคลนเรียบแบนติดอาหารไม่นูน
A7	โคลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้าแห้ง ไม่นูน ขอบหยาบ
A8	โคลนีสีขาว ผิวหน้าแห้ง ขอบหยาบ โคลนแบนติดอาหาร
A9	โคลนีสีขาวขุ่น เป็นฝ้า มีขนาดเล็ก ลักษณะกลม ทึบแสง
A10	โคลนีสีขาวขุ่น ลักษณะนูน เจริญในอาหาร ทึบแสง
A11	โคลนีสีครีมขุ่น ขอบหยาบ ผิวหน้านูน
A12	โคลนีสีขาวขุ่น ขอบหยาบ โคลนแบนติดอาหาร นูนตรงกลางโคลน ทึบแสง
A13	โคลนีสีครีม มีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ นูนตรงกลางโคลน
A14	โคลนีสีครีมอ่อน ผิวหน้านูนมันวาว ลักษณะกลม ขอบเรียบ

ตารางที่ 4.3 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 2

รหัส	ลักษณะของโคโลนี
B1	โคโลนีสีเหลือง-ส้ม ผิวหน้ามันวาว ขอบเรียบ มีลักษณะกลม
B2	โคโลนีสีขาว-ครีม มีขนาดเล็ก ผิวหนานูนมันวาว ขอบเรียบ
B3	โคโลนีสีเหลืองอ่อน มีขนาดเล็ก มีลักษณะกลม
B4	โคโลนีสีเหลืองปนเขียว มีลักษณะเหนียว
B5	โคโลนีสีเหลือง ผิวหนานูน
B6	โคโลนีสีเหลืองนวล มีขนาดเล็ก มีลักษณะกลม ขอบเรียบ
B7	โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวหนานูน โคโลนีมีลักษณะเข้ม ขอบเรียบ
B8	โคโลนีสีเหลืองอ่อน มีขนาดเล็ก โคโลนีแบนติดอาหาร ตรงกลางนูน
B9	โคโลนีสีขาว มีลักษณะกลม ผิวหนานูน ขอบเรียบ
B10	โคโลนีสีเหลือง ผิวหนานูน
B11	โคโลนีสีเหลืองปนส้ม มีลักษณะแบน
B12	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหนานูน ขอบหยาบ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 3

รหัส	ลักษณะของโคโลนี
C1	โคโลนีสีขาวขุ่น โคโลนีแบนติดอาหาร ทึบแสง
C2	โคโลนีสีครีมนวล ผิวหน้านูน โคโลนีแข็ง
C3	โคโลนีใส มีขนาดเล็ก โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหยัก
C4	โคโลนีสีครีม มีขนาดเล็ก มีฝ้าขาวปกคลุม
C5	โคโลนีสีครีมออกใส ผิวหน้านูนมันวาว มีลักษณะกลม
C6	โคโลนีสีส้ม โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหยัก โปร่งแสง
C7	โคโลนีสีครีมขาว มีขนาดใหญ่ ผิวหน้านูนกว้าง ขอบหยัก ทึบแสง
C8	โคโลนีสีขาวขุ่น มีขนาดเล็ก ผิวหน้านูน
C9	โคโลนีสีใส โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหยัก
C10	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหยัก ไม่ทึบแสง
C11	โคโลนีสีครีมเข้ม ผิวหน้านูน ขอบเรียบ ทึบแสง
C12	โคโลนีสีแสด มีขนาดเล็ก ลักษณะกลม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ตารางที่ 4.5 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 4

รหัส	ลักษณะของโคโลนี
D1	โคโลนีสีครีม โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหัก ทึบแสง
D2	โคโลนีมีสีครีมออกใส โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหัก
D3	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ผิวหน้านูนมันวาว มีลักษณะกลม ขอบเรียบ
D4	โคโลนีสีชมพูเข้ม โคโลนีแบนติดอาหาร ทึบแสง
D5	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้านูนมันวาว ลักษณะกลม ขอบเรียบ
D6	โคโลนีใส โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหัก
D7	โคโลนีสีเขียวอ่อน ผิวหน้านูน ขอบเรียบ
D8	โคโลนีใส ผิวหน้านูน ลักษณะกลม
D9	โคโลนีสีขาว ผิวหน้านูนมันวาว มีลักษณะกลม
D10	โคโลนีสีชมพูอ่อน โคโลนีแบนติดอาหาร ตรงกลางโคโลนีนุ่ม
D11	โคโลนีสีชมพู ผิวหน้านูนมันวาว ลักษณะกลม ขอบเรียบ
D12	โคโลนีบางสีขาว ผิวหน้านูน ลักษณะกลม ขอบเรียบ โปร่งแสง
D13	โคโลนีสีชมพูอ่อน ผิวหน้านูนมันวาว ลักษณะกลม
D14	โคโลนีสีขาวขุ่น มีขนาดเล็ก ผิวหน้านูนมันวาว ขอบเรียบ
D15	โคโลนีสีครีม มีขนาดเล็กมาก ผิวหน้านูนไม่มันวาว ลักษณะกลม
D16	โคโลนีสีแดง ผิวหน้านูนมันวาว ลักษณะกลม
D17	โคโลนีสีเหลืองนวล โคโลนีแบนติดอาหาร ขอบหัก

ตารางที่ 4.6 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากดินแหล่งที่ 5

รหัส	ลักษณะของโคโลนี
E1	โคโลนีสีส้ม ผิวหนานูน ลักษณะกลม ขอบเรียบ
E2	โคโลนีสีขาวหม่น ผิวหน้าแบนติดอาหาร ทึบแสง
E3	โคโลนีสีขาวขุ่น ลักษณะเล็ก สะเอียด
E4	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ลักษณะนูนเล็กน้อย ขอบเรียบ
E5	โคโลนีสีขาว ลักษณะนูนเล็กน้อย ขอบหยัก
E6	โคโลนีสีครีม ผิวหน้าไม่เรียบ ขอบหยัก
E7	โคโลนีสีเหลือง ผิวหนานูนมันวาว ขอบเรียบ
E8	โคโลนีสีครีม ผิวหนานูนมันวาว ขอบเรียบ
E9	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหนานูนเล็กน้อย โปร่งแสง ขอบเรียบ
E10	โคโลนีสีชมพูอ่อน ลักษณะเข็ม
E11	โคโลนีสีครีม ผิวหนามันวาว โคโลนีใหญ่
E12	โคโลนีเหลืองอ่อน ผิวหน้าไม่เรียบ ขอบหยัก

4.2.2 การติดสีแกรม

นำแบคทีเรียที่สามารถแยกมาได้จากดินทั้ง 5 แหล่ง ที่อาศัยดูจากความแตกต่างของโคโลนีของแบคทีเรีน้นมาทำการย้อมแกรม พบว่ามีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบแบคทีเรียรูปร่างกลม รูปร่างท่อน (ตารางที่ 4.7 - 4.11)

ตารางที่ 4.7 การย้อมแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาได้จากดินแหล่งที่ 1

รหัส	ลักษณะแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย
A1	แกรมลบ รูปร่างกลม
A2	แกรมลบ รูปร่างท่อน
A3	แกรมลบ รูปร่างกลม
A4	แกรมลบ รูปร่างกลม
A5	แกรมลบ รูปร่างกลม
A6	แกรมลบ รูปร่างท่อน
A7	แกรมบวก รูปร่างท่อน
A8	แกรมบวก รูปร่างท่อน
A9	แกรมลบ รูปร่างกลม
A10	แกรมลบ รูปร่างกลม
A11	แกรมบวก รูปร่างท่อน
A12	แกรมบวก รูปร่างกลม
A13	แกรมลบ รูปร่างท่อน
A14	แกรมลบ รูปร่างท่อน

ตารางที่ 4.8 การข้อมแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาได้จากดินแหล่งที่ 2

รหัส	ลักษณะแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย
B1	แกรมลบ รูปร่างกลม
B2	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
B3	แกรมลบ รูปร่างกลม
B4	แกรมบวก รูปร่างท่อน
B5	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
B6	แกรมลบ รูปร่างกลม
B7	แกรมลบ รูปร่างกลม
B8	แกรมลบ รูปร่างกลม
B9	แกรมบวก รูปร่างกลม
B10	แกรมลบ รูปร่างท่อน
B11	แกรมลบ รูปร่างท่อน
B12	แกรมลบ รูปร่างกลม

ตารางที่ 4.9 การข้อมแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาได้จากดินแหล่งที่ 3

รหัส	ลักษณะแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย
C1	แกรมลบ รูปร่างท่อน
C2	แกรมบวก รูปร่างท่อน
C3	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
C4	แกรมบวก รูปร่างท่อน
C5	แกรมลบ รูปร่างท่อน
C6	แกรมลบ รูปร่างท่อน
C7	แกรมบวก รูปร่างท่อน
C8	แกรมบวก รูปร่างกลม
C9	แกรมลบ รูปร่างท่อน
C10	แกรมบวก รูปร่างท่อนยาว
C11	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
C12	แกรมลบ รูปร่างกลม

ตารางที่ 4.10 การซ่อมแซมแบบที่เรียกที่สามารรถแยกมาได้จากดินแหล่งที่ 4

รหัส	ลักษณะแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย
D1	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D2	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D3	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D4	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D5	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D6	แกรมบวก รูปร่างท่อน
D7	แกรมลบ รูปร่างกลม
D8	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
D9	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
D10	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D11	แกรมลบ รูปร่างกลม
D12	แกรมลบ รูปร่างกลม
D13	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D14	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D15	แกรมลบ รูปร่างท่อน
D16	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
D17	แกรมลบ รูปร่างกลม

ตารางที่ 4.11 การข้อมแกรมแบคทีเรียที่สามารถแยกมาได้จากดินแหล่งที่ 5

รหัส	ลักษณะแกรมและรูปร่างของแบคทีเรีย
E1	แกรมบวก รูปร่างกลม
E2	แกรมลบ รูปร่างกลม
E3	แกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น
E4	แกรมบวก รูปร่างกลม
E5	แกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น
E6	แกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น
E7	แกรมบวก รูปร่างกลม
E8	แกรมลบ รูปร่างท่อน
E9	แกรมลบ รูปร่างท่อน
E10	แกรมลบ รูปร่างท่อน
E11	แกรมบวก รูปร่างท่อน
E12	แกรมบวก รูปร่างกลม

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินทั้ง 5 แหล่ง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยทำการเพาะเลี้ยงแบบ point inoculation บนอาหาร Chitin agar (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสจะย่อยสลายไคตินเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 67 ไอโซเลต สามารถย่อยสลาย ไคตินเกิดเป็นบริเวณใสมี 2 ไอโซเลต คือแบคทีเรียรหัส A14 ซึ่งเกิดบริเวณใส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.6) และแบคทีเรียรหัส D16 ซึ่งเกิดบริเวณใส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.7) ส่วนแบคทีเรีย 65 ไอโซเลตไม่สามารถย่อยสลายไคตินได้

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 1

รหัส	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
A1	-
A2	-
A3	-
A4	-
A5	-
A6	-
A7	-
A8	-
A9	-
A10	-
A11	-
A12	-
A13	-
A14	0.5

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 2

รหัส	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
B1	-
B2	-
B3	-
B4	-
B5	-
B6	-
B7	-
B8	-
B9	-
B10	-
B11	-
B12	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
 ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตารางที่ 4.14 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 3

รหัส	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
C1	-
C2	-
C3	-
C4	-
C5	-
C6	-
C7	-
C8	-
C9	-
C10	-
C11	-
C12	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตารางที่ 4.15 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 4

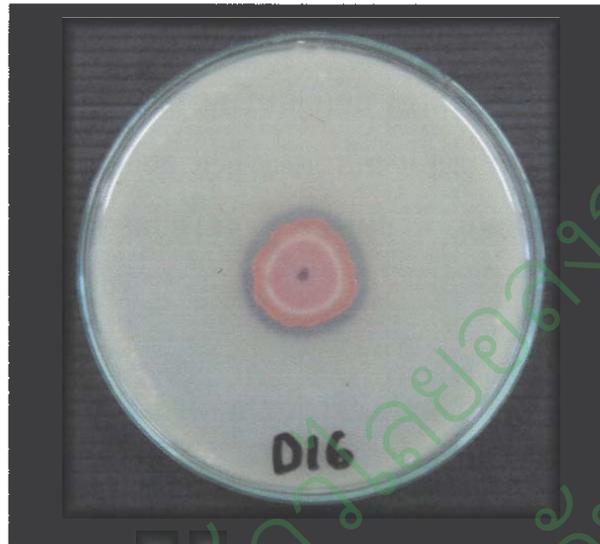
รหัส	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
D1	-
D2	-
D3	-
D4	-
D5	-
D6	-
D7	-
D8	-
D9	-
D10	-
D11	-
D12	-
D13	-
D14	-
D15	-
D16	1.1
D17	-

ตารางที่ 4.16 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดินแหล่งที่ 5

รหัส	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)
E1	-
E2	-
E3	-
E4	-
E5	-
E6	-
E7	-
E8	-
E9	-
E10	-
E11	-
E12	-



ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของแบคทีเรียรหัส A14 บนอาหารแข็งไคติน



ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการย่อยสลายโคตินของแบคทีเรียห้ำ D16 บนอาหารแข็งโคติน

4.4 การจำแนกลักษณะและศึกษาสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียห้ำ A14 และแบคทีเรียห้ำ D16 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โคตินเอสได้มาทำการจำแนกลักษณะทางสรีระวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่า

แบคทีเรียห้ำ A14 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (ภาพที่ 4.9) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะตาลเลส เนื่องจากสามารถเจริญบนอาหารแข็งซิมมอนส์ซิเตรทและให้ผลิตภัณฑ์เป็นด่าง โดยดูได้จากการเปลี่ยนสีของบรอมไทมอลบลูจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินแสดงว่ามีการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.10) เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารแข็ง Triple sugar iron (TSI agar) ผลการทดสอบไม่เกิดสีด่างของเฟอร์รัสซัลไฟด์ตามรอยที่ถ่ายเชื้อ แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลพบว่าเกิดสีเหลืองที่ผิวหน้าอาหารแสดงว่ามีการใช้น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลแล็กโทสในการหมัก (ภาพที่ 4.11) จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน urea agar ได้ผลว่าสามารถเปลี่ยนสีของ phenol red ให้เป็นสีชมพูบานเย็นแสดงว่าสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (ภาพที่ 4.12) การทดสอบเมทิล เรด ให้ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคส การทดสอบวีพีให้ผลเป็นบวก แสดงว่าสามารถผลิต acetoin จากกลูโคส การทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole (ตารางที่ 4.17)

ส่วนแบคทีเรียห้ำ D16 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (ภาพที่ 4.15) สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะตาลเลสได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียห้ำ A14 โดยสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่ง

คาร์บอน (ภาพที่ 4.16) พบว่าแบคทีเรียรหัส D16 ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์เนื่องจากไม่เกิดสีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ตามรอยที่ถ่ายเชื่องลงในอาหาร TSI (ภาพที่ 4.17) จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบน urea agar ได้ผลว่าสามารถเปลี่ยนสีของ phenol red ให้เป็นสีชมพูบานเย็นแสดงว่าสามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส (ภาพที่ 4.18) ทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole การทดสอบเมทิลเรด ให้ผลเป็นลบแสดงว่าไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคส การทดสอบวีพี ให้ผลเป็นบวกแสดงว่าสามารถผลิต acetoin จากกลูโคส (ตารางที่ 4.17)

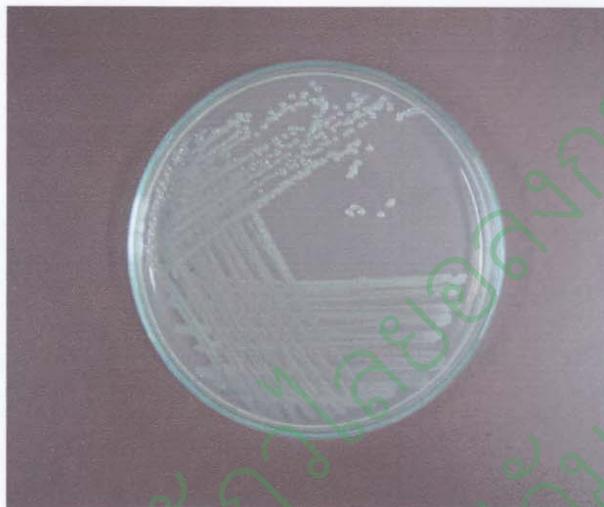
ตารางที่ 4.17 ลักษณะการเจริญและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียรหัส A14 และแบคทีเรียรหัส D16

ลักษณะ	แบคทีเรียรหัส A14	แบคทีเรียรหัส D16
โคโลนี	โคโลนีสีครีมอ่อนอ่อน ผิวหน้านุ่มมันวาว ลักษณะกลม ขอบเรียบ	โคโลนีสีแดง ผิวหน้าหยาบมันวาว ลักษณะกลม
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน
แกรม	ลบ	ลบ
การเคลื่อนที่	ไม่เคลื่อนที่	เคลื่อนที่
กะตะเลส	+	+
การใช้ซิเตรท	+	+
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	-	-
ทดสอบเมทิลเรด	-	-
ทดสอบวีพี	+	+
ทดสอบอินโดล	-	-
ทดสอบยูเรีย	+	+
การหมักน้ำตาลเล็กโตส	+	-

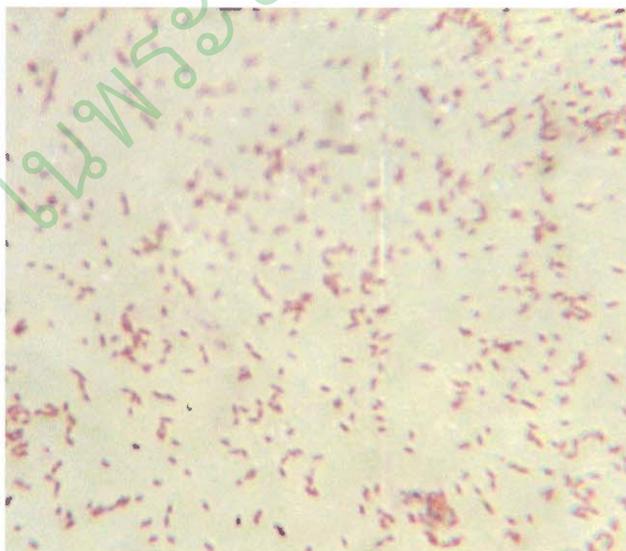
หมายเหตุ

+ หมายถึง เชื้อเจริญหรือเกิดปฏิกิริยา

- หมายถึง เชื้อไม่เจริญหรือไม่เกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียรหัส A14 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์



ภาพที่ 4.9 รูปร่างของแบคทีเรียรหัส A14 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 4.10 ทดสอบการใช้ซีเตรทบนอาหารแข็งซิมมอนส์ซีเตรทของแบคทีเรียหัด A14



ภาพที่ 4.11 ทดสอบการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหารแข็ง TSI ของแบคทีเรียหัด A14



ภาพที่ 4.12 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูรีเอสบนอาหารแข็ง Urea ของแบคทีเรียรหัส A14



ภาพที่ 4.13 การทดสอบการหมักน้ำตาลแล็กโตสบนอาหารแข็ง MacConkey



ภาพที่ 4.14 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียหัด D16 บนอาหารแข็งนิวเตรียนท์



ภาพที่ 4.15 รูปร่างของแบคทีเรียหัด D16 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 4.16 ทดสอบการใช้ชีตรทบนอาหารแข็งซิมมอนส์ชีเตรทของแบคทีเรียห้ำส D16



ภาพที่ 4.17 ทดสอบการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์บนอาหารแข็งทีเอสไอของแบคทีเรียห้ำส D16



ภาพที่ 4.18 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ยูเรียเอสบนอาหารแข็ง Urea ของแบคทีเรียรหัส D16

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือก พบว่าแบคทีเรียรหัส A14 มีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. และแบคทีเรียรหัส D16 มีลักษณะดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Serratia* sp. เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยวิธีของเบอร์เกย์ (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology) (Sneath *et al.* 1986)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียจากดินในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และดินบริเวณตลาดไท จังหวัดปทุมธานี ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ ผลการวิจัยครั้งนี้ การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินทั้งหมด พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีค่าระหว่าง $10^5 - 10^7$ CFU/ml สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างดินได้ทั้งหมด 67 ไอโซเลต ดินบริเวณหน้ามหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ พบมากที่สุด คือ 17 ไอโซเลต

การแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส 2 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียรหัส A14 ซึ่งทำให้เกิดบริเวณใสในอาหาร Chitin agar เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และแบคทีเรียรหัส D16 ทำให้เกิดบริเวณใสในอาหาร Chitin agar เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียรหัส A14 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะคะเลสโดยมีการใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน มีการใช้น้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลเล็กโทสในการหมัก ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส เจริญได้ในอาหารแข็ง MacConkey มีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Klebsiella* sp. เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์เกีย (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology)

แบคทีเรียรหัส D16 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์อะคะเลสได้เช่นเดียวกับแบคทีเรียรหัส A14 โดยสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียรหัส D16 ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์เมื่อทดสอบในอาหาร TSI ทดสอบอินโดลให้ผลเป็นลบ สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส ลักษณะดังกล่าวมีลักษณะใกล้เคียงกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Serratia* sp. เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีของเบอร์เกีย (Bergey' Manual of Systematic Bacteriology)

บรรณานุกรม

- เชาวนิพร บุญช่วย. (2539). ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสใน *Aeromonas* sp. CS-34 และการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ. (2544). การเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์จาก*เทอโมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ ทีแอลเอส 33*. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และ สุวดี จันทร์กระจ่าง. (2524). การพัฒนาแผ่นบางไคโตซานเพื่อการกรองแยกชีวสาร, น. 28 – 59. สัมมนาวิชาการ “ความร่วมมือของภาครัฐและเอกชนในการพัฒนาการผลิตและการใช้สารไคติน ไคโตซานครบวงจร”, 2 – 3 เมษายน 2542. โรงแรมไอเฟล, ระนอง.
- พูนสุข ศรีโยธา. (2539). เอนไซม์ไคตินเนสและคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา, รายงานการวิจัย คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติโครงการร่วมมือไทย – อังกฤษ ประจำปี 2537 – 2539, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- ภาวดี เมระคานนท์ อศิรา เฟื่องฟูชาติ และ ก้องเกียรติ คงสุวรรณ. (2543). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- ศุภยงค์ วรวิมลคุณชัย. (2547). การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สมศักดิ์ วังไฉ. (2528). จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุพจน์ หารหนองบัว สุวดี จันทร์กระจ่าง ปราณี เลิศสุทธีวงศ์ กฤษณา ศิริเลิศมุกด ปราณี รัตนวดีโรจน์ สุทธิรัตน์ ลิศนันท์. (2546). การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพของโรงงานผู้ผลิตและตลาดการใช้ไคตินและไคโตซาน. รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวบุญ จิระชาญชัย รังรอง ยกส้าน และ โกสุม สัมครรัตน์. (2544). สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคตินและไคโตซาน. เอกสารประกอบการบรรยาย “การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้” (หน้า 11 – 51) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุวดี จันทร์กระจ่าง. (2544). การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน, เอกสารประกอบการบรรยาย “การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้” (หน้า 52 – 58), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

- อรรณวุฒิ กัณฑ์วงศ์. (2548). การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียทางทะเลที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Aiba, L. S. (1993). Preparation of *N*-Acetylchitooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.* 3: 241 – 245.
- Cottrell, M. T., J. A. Moore and D. L. Kirchman. (1999). Chitinase from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 2553 – 2557.
- Esaiassen, M. (1996). Chitinolytic Enzymes from Northern Shrimp *Pandalus borealis*. Dr. Scient Dissertation, Tromso Univ., Norway.
- Felse P.A., Panda T. (2000). Production of microbial chitinases. A revisit. *Bioprocess Eng.* 23; 127–134.
- Flach, J., P.E. Pilet and P. Jolles. (1992). What's new in chitinase research?. *Experientia.* 48: 701 – 716.
- Frandsberg, E. and J. Schnurer. (1994). Evaluation of a chromogenic chito – oligosaccharide analogue, *p* – nitrophenyl – *B* – *D* – *N,N'* – diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 259 – 263.
- Gooday, G. W. (1994). Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, pp. 279-312. In C. Ratledge, ed. *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Acad., Netherlands.
- Hanzlikova, A : Jandera, A. (1993). Chitinase and changes of microbial community in soil. *Folia-Microbiol-(Praha)*; 38(2): 159-60.
- Hirano S. (1996). Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2 ; 237–258.
- Huang I.H., Chen C. J., Su Y. C. (1996). Production of chitinolytic enzymes from a novel species of *Aeromonas*. *J. Ind. Microbiol.* 17, 89
- Jeuniaux, C. (1996). Chitinase. *Method Enzymol.* 8 : 644 – 650.
- Khoury, C., Minier, M., Van Huynh N., and Le Goffic, F. (1997). Optimal dissolved oxygen concentration for the production of chitinase by *Serratia marcescens*. *Biotechnology. Lett.*, 11, 1143 – 1146.
- Koga, D., T. Hirata, N. Sueshige, S. Tanaka and A. Ide. (1992). Induction patterns of chitinases in yam callus by inoculation with autoclaved *Fusarium oxysporum*, ethylene, and chitin and chitosan oligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 280 – 285.

- Matsumiya, M., Miyauchi, K., and Mochizuki, A. (1988). **Chitinolytic enzyme in squid**. In **Chen R.H. and Chen H.C. (ED).**, Advance in chitin Science, Vol. 3, China, pp. 227 – 232.
- Monreal J., Reese E.T. (1969). **The chitinase of *Serratia marcescens***. Can. J. Microbiol. 15; 689–696.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977). **Chitin**. Pergamon Press, New York.
- Park, J. K., K. Morita, I. Fukumoto, Y. Yamasaki, T. Nakagawa, M. Kawamukai and H. matsuda. (1997). **Purification and characterization of chitinase (ChiA) from *Enterobacter* sp. G – 1**. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61 : 684 – 689
- Rheinheimer G. (1987). **Mikrobiologia wod**. PWR i L Warszawa.
- Roberts, W. K. and C. P. Selitrennikoff. (1988). **Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity**. J. Gen. Microbiol. 134: 169 – 176.
- Sakai K.T., Y. Uchiyama, Y. Matahira, F. Nanjo. (1991). **Immobilisation of chitinolytic enzymes and continuous production of N-acetylglucosamine with immobilised enzymes**, J. Ferment. Bioeng. 7. 168–172.
- Sandhya C. *et al.*, (2004). **Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation**. Biotechnology Division, Regional Research Laboratory, CSIR, Trivandrum-695 019, India.
- Shaikh, S.A. and M. V. Deshpande. (1993). **Chitinolytic Enzymes : Their Contribution to basic and applied research**. World J. Microbial. Biotechnol. 9 : 468 -475
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2**. Baltimore. : Williams & Wilkins.
- Takayanga, T., K. Ajisaka, Y. Takiguchi, K. Shimahara. (1991). **Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* X-7U**, Biochem. Biophys. Acta, 1078 ; 404–410.
- Transomo A., Harman G. E. (1993). **Detection and Quantification of N - Acetyl - p - D - glucosaminidase, Chitobiosidase and Endochitinasas in Solutions and Gels**. Analyt. Biochem. 208, 74.
- Tsujibo, H., Y. Yishida, C. Imada. Y. Okami, K. Miyamoto and Y. Inamori. (1991). **Isolation and characterization of a chitin degrading marine bacterium belonging to the genus *Alteromonas***. Nippon Suisan Gakkaishi. 57 : 2127 – 2131.

- Yang J.K. , Shih I.L. , Tzeng Y.M. , Wang S.L. (2000). **Production and purification of protease From a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes.** Enzyme Microb. Technol. 26; 406–413.
- Yamaoka, H., Hayashi, H., Karita, T., Sakka, K., and Ohmiya, K. (1999). **Purification and some property of a chitinase from *Xanthomonas* sp.** Strain Ak. J. Biosci. Biocng., 88, 323 – 330.
- Yu, C., A. M. Lee, B. L. Bassler and S. Roseman. (1991). **Chitin utilization by marine bacteria : A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates.** J. Biol. Chem. 266 : 24260 – 24267.
- Wang, S.L., Yieh, T.C. and Shih, I.L. (1999). **Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source.** Enzyme microbial. Technology., 25, 142 – 148.
- Wang, S.L., and Hwang, J.R. (2001). **Microbial reclamemntation of shellfish waste for the production of chitinase.** Enzyme. Microbial. Technology., 28, 376 - 382.
- Zhou, S.N., C.Y. Yang, Y. J. Lu, L. Huang, C. H. Cai and Y. C. Lin. (1999). **Isolation and characterization of chitinase from a marine bacterium *Vibrio* sp.** World J. Microbiol. Biotechnol. 15 : 745 – 746.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งนิเวทรีย์นัท

เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
บีฟเอ็กแทร็ก (beef extract)	3.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (disstill water)	1000	มิลลิลิตร

2. อาหารแข็งไคติน

Swollen chitin	30	กรัม
เปปโตน (peptone)	10	กรัม
ยีสต์เอ็กแทร็ก (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)	1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate; KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะระไฮเดรต (magnesium sulfate – heptahydrate; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (disstill water)	1000	มิลลิลิตร

การเตรียม Swollen chitin

ชั่งไคติน พาวเดอร์ (chitin powder) 10 กรัม เติมน้ำกลั่นในปริมาณมากๆ จนมี pH ประมาณ 5 ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้ pH 7 นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ตะกอนที่ได้ก็คือ Swollen chitin เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารแป้ง (starch agar)

แป้ง (soluble starch)	2.0	กรัม
บีฟเอ็กแทร็ก (beef extract)	3.0	กรัม

เปปโตเน (peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร

4. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่

ทริปโตเน (tryptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.0		

5. อาหารซิมมอนส์ซิเตรท (simmon' citrate agar)

แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulphate; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate; $(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท (sodium citrate), $(HOC(COONa)(CH_2COONa)_2)$	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)	5.0	กรัม
บรอมไทมอลบลู (bromthymol blue)	0.08	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 6.8		

6. อาหาร Triple Sugar Iron Agar (TSI agar)

บีฟเอ็กแทร็ก (beef extract)	3	กรัม
ยีสต์เอ็กแทร็ก (yeast extract)	3	กรัม
เปปโตเน (peptone)	20	กรัม
เด็กซ์โตรส (dextrose)	1	กรัม
แล็กโตส (lactose)	10	กรัม

ซูโครส (sucrose)	10	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate;)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)	5	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate;)	0.3	กรัม
วุ้นผง (agar)	12	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.4		

7. อาหาร MR - VP

เปปโตน (peptone)	7	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4)	5	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	5	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 6.9		

8. Tryptone broth

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร

9. Christensen urea agar

เปปโตน (peptone)	1	กรัม
กลูโคส (glucose)	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate; KH_2PO_4)	2	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.012	กรัม
วุ้นผง (agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 6.9		

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล (iodine crystal)	1	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide; KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	300	กรัม

ละลายไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตคริสตอลไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violet solution)

Solution A :

คริสตอลไวโอเลต (crystal violet)	3	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol 95%)	20	มิลลิลิตร

Solution B :

แอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น (distill water)	50	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

3. สารละลายซาฟรานิน (safranin solution)

ซาฟรานิน (safranin)	0.25	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol 95 %)	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (distill water)	100	มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานินด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

4. สารเคมี (reagents) ที่ใช้ในการทดสอบ

Methyl red solution

เมทิลเรด (methyl red)	0.8	กรัม
-----------------------	-----	------

เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol 95%)	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (disstill water)	200	มิลลิลิตร
ละลาย methyl red ใน ethyl alcohol 95% แล้วจึงเติมน้ำกลั่น		

Voges – Proskauer test solution

Solution A :

อัลฟาแนพทอล (alpha naphthol)	10	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol 95 %)	100	มิลลิลิตร
ละลาย alpha naphthol ใน ethanol 95% เก็บใส่ขวดสีชา		

Solution B :

โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide; KOH)	20	กรัม
น้ำกลั่น (disstill water)	100	มิลลิลิตร
ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชา		

3% Hydrogen peroxide solution

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H ₂ O ₂)	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (disstill water)	100	มิลลิลิตร

Kovac's solution

Para – dimethyl – amino benzaldchye	5	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (ethyl alcohol 95%)	75	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl)	25	มิลลิลิตร

ผสม Para – dimethyl – amino benzaldchye กับ ethyl alcohol 95% ใน water bath อุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) วัฒนา อัจฉริยะโพธา
(ภาษาอังกฤษ) Wattana Aschariyaphotha
- ตำแหน่ง อาจารย์ประจำหลักสูตรชีววิทยาประยุกต์
- สถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
1 หมู่ 20 ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180
E-mail: w55_tui@hotmail.com
- วุฒิการศึกษา วท.บ. เทคโนโลยีชีวภาพ
วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ
- ผลงานวิจัย
- วัฒนา อัจฉริยะโพธา และสุธี เทียนนาวา. (2549). การแยกแบคทีเรียในดินที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*. วารสารการเวก ฉบับฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี. วารสารวิทยาศาสตร์เพื่อชีวิตและสังคม (หน้า 165-171). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.
- สุขใจ ชูจันทร์ และวัฒนา อัจฉริยะโพธา. (2549). การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์โดยใช้เห็ดในการหมักทดแทนเนื้อยีสต์สำหรับเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. (ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 เดือน หน้า 44 – 59) คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.