เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.) และ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

Chitinase from Bacteria Isolated from Black Tiger Prawn Larvae (*Penaeus monodon* Fabricus.) and Prawn Pond Sediment

ทัศนัย วาหะ

TASSANAI WAHAH

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2537

เลขหมู่ QP601.X6.C64 ทัศ 2537 ฉ.2

Bib Key 64674

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.) และ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง

ผู้เขียน นายทัศนัย วาหะ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

---------------------ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

---------------------กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

---------------------ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

---------------------กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

---------------------กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

---------------------กรรมการ
(ดร.อุตสาห์ จันทร์อำไพ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.) และ ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง
ผู้เขียน	นายทัศนัย วาหะ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2537

บทคัดย่อ

ได้แยกแบคทีเรีย 68 สายพันธุ์ จากลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.) และตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่ามี 13 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ CS30, CS34 และ CS41 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่สูง แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ และเจริญได้ดีที่มีอากาศ เมื่อจำแนกสายพันธุ์ปรากฏว่าจัดอยู่ในกลุ่มของ *Aeromonas* sp.มีไคตินเป็นสารชักนำที่จำเป็นต่อการผลิตไคติเนส ได้ทดลองเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซ์เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอชช่วง 6-7 และที่อุณหภูมิ 50°ซ เมื่อแยกเอนไซม์โดยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสภายหลังย้อมด้วย fluorescent brightener 28 พบว่า *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34 ผลิตเอนไซม์ไคติเนส 2 ไอโซไซม์ โดยมีแบบแผนของของไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่ *Aeromonas* sp.CS41 ก็ผลิตเอนไซม์ไคติเนส 2 ไอโซไซม์เช่นกัน แต่มีน้ำหนักโมเลกุลของไอโซไซม์แตกต่างไปจากไอโซไซม์ของ *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34

Thesis Title Chitinase from Bacteria Isolated from Black Tiger Prawn Larvae (*Penaeus monodon* Fabricus.) and Prawn Pond Sediment

Author Mr. Tassanai Wahah

Major Program Biotechnology

Academic Year 1994

ABSTRACT

Sixty eight strains of bacteria were isolated from black tiger prawn larvae (*Penaeus monodon* Fabricus.) and prawn pond sediment. Thirteen isolates were found to produce chitinases. The isolates CS30, CS34 and CS41 showed a very high chitinase activity. They were rod-shaped, Gram-negative and aerobic bacteria. From the taxonomical characteristics, they were identified as *Aeromonas* sp. Chitin was essential for them as an inducer to produce chitinase. Chitinase from these three isolates were partially purified by ammonium sulfate precipitation and dialysis. The optimum pH and temperature were in the range of pH 6-7 and at 50°C. On native polyacrylamide gel eletrophoresis and after activity staining with fluorescent brightener 28, *Aeromonas* sp.CS30 and *Aeromonas* sp.CS34 showed similar pattern of two isozymes. Whereas *Aeromonas* sp.CS41 also demonstrated two isozymes but with different molecular size from those of *Aeromonas* sp.CS30 and *Aeromonas* sp.CS34.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการผู้แทนจากโครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร และ ดร.อุตส่าห์ จันทร์อำไพ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ คุณสายใจ ปานวิเชียร นักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ เพื่อน ๆ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบรูณ์ด้วยดี

ทัศนัย วาหะ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
1 การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ	3
2 ไคติน	6
3 การย่อยสลายไคตินโดยเอนไซม์	12
4 แหล่งของไคติเนส	14
5 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไคติเนสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	18
6 คุณสมบัติของไคติเนสในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ	20
7 การหาค่ากิจกรรมของไคติเนส	27
8 การนำไคติเนสไปใช้ประโยชน์	28
วัตถุประสงค์	30
2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	31
วัสดุ	31

อุปกรณ์.. 34
วิธีการ.. 35
1. การแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกกุ้งและตะกอนดิน
ที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง.......................... 35
2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิต
ไคติเนส.. 36
3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคติเนสจาก
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้.......................... 39
4. คุณสมบัติของไคติเนส........................... 39
3 ผลและวิจารณ์.................................... 42
1. การแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกกุ้งและตะกอนดิน
ที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง.......................... 42
2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิต
ไคติเนส.. 49
3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคติเนสจาก
แบคทีเรียที่คัดเลือกได้.......................... 66
4. คุณสมบัติของไคติเนส........................... 76
4 สรุป.. 84
เอกสารอ้างอิง...................................... 86
ภาคผนวก.. 97
ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส............. 97
ข. วิธีการทดสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย............ 103
ค. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน............... 112
ประวัติผู้เขียน...................................... 116

รายการตาราง

ตาราง หน้า

1. ปริมาณไคตินในสัตว์และราบางชนิด 8

2. ชนิดของสัตว์และพืชที่สามารถสังเคราะห์ไคติเนส 15

3. ชนิดของจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์ไคติเนส 17

4. คุณสมบัติบางประการของไคติเนสบริสุทธิ์ที่ได้จาก จุลินทรีย์ พืช และสัตว์บางชนิด 21

5. คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้ง 43

6. จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC ภายใต้สภาวะแตกต่างกัน 44

7. คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง 46

8. คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย CS30, CS34และCS41เพื่อจัดจำแนกสกุล 48

9. ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+C เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ 65

10. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส กับการสร้างสารเรืองแสง และการสร้างบริเวณใส จากแบคทีเรียที่คัดเลือกในขั้นต้นจากความสามารถสร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์ 67

11. ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB, NB+CC และ NB+C เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ 69

12. ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรีย CS34 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+C เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ โดยใช้เปอร์เซ็นต์ของ chitin ที่แตกต่างกัน 70

รายการรูป

รูป	หน้า
1. โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส,ไคติน และไคโตแซน	7
2. ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส และเอนไซม์ไคติเนส	13
3. สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP1-CP7 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	51
4. สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP1,CP7 และ CP4-CP9 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	52
5. สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP10, CS2-CS5 และ CS7-CS9 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF. GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้า-ไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	53
6. สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS10-CS17 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโน-เมตร	54
7. สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS18-CS23 ,CS25 และ CS26 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF. GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้า-ไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	55

รายการรูป (ต่อ)

รูป		หน้า
8.	สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS27, CS28 และ CS30-CS35 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF. GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้า-ไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	56
9.	สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS36-CS39 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโน-เมตร	57
10.	สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS44-CS48 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโน-เมตร	58
11.	สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS52, CS53 และ CS56,CS57 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง 4 MUF. GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้า-ไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร	59
12.	บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS30 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสับสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน	61
13.	บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS34 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสับสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน	62

รายการรูป (ต่อ)

รูป		หน้า
14.	บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS41 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสีบสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน	63
15.	การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS30 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin	72
16.	การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS34 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin	74
17.	การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS41 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin	75
18.	ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของไคติเนสที่อุณหภูมิ 50°ซ	78
19.	ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของไคติเนสที่พีเอช 6.0	79
20.	ความคงตัวของไคติเนสที่อุณหภูมิต่างๆ	80
21.	แบบแผนของไคติเนสเมื่อตรวจสอบโดยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส	82

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยนับเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งทะเล เนื่องจากมีพื้นที่ชายฝั่งเหมาะสมเป็นจำนวนมาก มีอากาศอบอุ่นตลอดปีที่อำนวยต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง มีวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารกุ้งมากเพียงพอและราคาถูก แรงงานหาง่ายและเมื่อได้นำเทคโนโลยีสมัยใหม่เข้ามาช่วยพัฒนาทางด้านการเพาะเลี้ยงกุ้งแล้ว ไทยจึงเป็นประเทศที่ผลิตกุ้งได้มากที่สุดประเทศหนึ่งด้วยต้นทุนที่ต่ำกว่าประเทศอื่น ๆ ทำให้สามารถเป็นสินค้าสำคัญในตลาดโลกได้ จากวารสารข่าวกุ้ง ประจำเดือนธันวาคม 2536 ได้ประมาณการตัวเลขพื้นที่เลี้ยงกุ้งในปี 2536 ว่ามีอยู่ประมาณ 490,000ไร่ ซึ่งถ้าแยกพื้นที่รายเขต พบว่า 60% ของนากุ้งอยู่ทางภาคใต้ 35% อยู่ทางภาคตะวันออก และอีก 5% อยู่ในภาคกลาง ซึ่งในจำนวนพื้นที่เกือบ 500,000 ไร่นั้น ประมาณกันว่าเป็นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาถึง 150,000 ไร่ (คะเน กิตติโกวิท, 2537)

จากการที่การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีอยู่มากทางภาคใต้ ส่งผลให้งานวิจัยนี้มุ่งที่จะทำการแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายไคตินจากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากรายงานส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการสุ่มหาจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไคติน มักแยกได้จากตะกอนดินจากท้องทะเล (Reynolds, 1954; Clarke and Tracy, 1956; Tsujibo *et al.*, 1991) แต่จากปรากฏการณ์น่าสนใจที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้งในช่วงที่กุ้งมีการลอกคราบ พบว่าปริมาณคราบไคตินที่ลอกจากตัวกุ้งจำนวนมากในบ่อ ถูกย่อยสลายหายไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสที่สูงมากของจุลินทรีย์ที่อยู่ในบ่อ นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่มีลักษณะเฉพาะภายในบ่อกุ้งเองที่แตกต่างจากสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ที่เคยมีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต

ไคติเนส คือนอกจากมีความเค็มสูงแล้ว ภายในบ่อยังประกอบด้วยอาหารและของเสียที่เกิดจากการเลี้ยงกุ้ง ย่อมมีผลให้แบคทีเรียที่อยู่ในสภาพภายในบ่อเช่นนี้ น่าสนใจไม่น้อยไปกว่าแบคทีเรียที่เคยแยกได้จากแหล่งอื่น ๆ และทำการแยกแบคทีเรียจากลูกกุ้งเนื่องจากพบว่าไคติเนสมีส่วนเกี่ยวข้องในการลอกคราบของลูกกุ้ง และการย่อยอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Kono, *et al.*,1990)

ไคติเนสถูกประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมายหลายด้านในปัจจุบัน ทั้งทางด้านการเกษตรในแง่ป้องกันโรคพืชจากเชื้อรา เช่น การนำ *Serratia marcescens* มาควบคุมการติดเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. ในพืชได้ถึงร้อยละ 75 (Ordentlich, *et al.*, 1987 อ้างอิงโดย Shapira *et al.*, 1989) นอกจากนี้สามารถใช้ไคติเนสทางด้านอุตสาหกรรมเพื่อเตรียมโปรโตพลาส์ของเซลล์พืช เชื้อรา และ ยีสต์ (Broglie, *et al.*, 1986; Bartinicki-Garcia and Lippman, 1972; Yabuki *et al.*, 1986) เช่น ใช้ไคติเนสกึ่งบริสุทธิ์เตรียมโปรโตพลาสของ *Aspergillus oryzae* อย่างไรก็ตามไคติเนสยังมีประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ด้วย โดยมีไคติเนสเป็นส่วนสำคัญในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไคตินให้ได้ตามความต้องการ เช่น ในทางการแพทย์และเภสัชได้ใช้ไคตินและอนุพันธ์ของไคตินในการรักษาบาดแผล (Balassa and Prudolen, 1978 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) ใช้เป็นเลนส์สายตา ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา ใช้เป็นสารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นตัวจับและตกตะกอนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ใช้ผลิตผนังไตเทียม ใช้เป็นสารลดคลอเรสเตอรอล และใช้เป็นสารเชื่อมหรืออุดฟัน (Brzeski, 1987; Anonymous, 1989 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534)

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือก และศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนสที่แยกได้จากลูกกุ้งและตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อีกทั้งศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของไคติเนสที่ได้ เพื่อจะเป็นแนวทางในการค้นคว้าต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.) มีชื่อสามัญว่า Black Tiger Prawn หรือ Giant Tiger Prawn หรือ Live Grass Prawn เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ในวงศ์ Panaeide ถิ่นอาศัยอยู่ในน่านน้ำแถบ ไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และอินเดีย ในขณะที่มีชีวิตอยู่ลำตัวเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำ ลำตัวเป็นปล้อง ๆ เปลือกหัวเกลี้ยง ไม่มีขนหรือไม่มีลาย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่าง 3 ซี่ร่องข้างกรีทั้งสองด้านมีลักษณะแคบจนถึงฟันกรีอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก กุ้งกุลาดำที่โตเต็มวัยมีการลอกคราบทุก ๆ 15-21 วัน (Grey *et al.*, 1983)

ลักษณะการเลี้ยงกุ้ง สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระบบ (ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2532) คือ

1.1 <u>ระบบการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิม (Extensive system)</u>

เริ่มต้นจากการดัดแปลงนาข้าว หรือจากนาเกลือชายฝั่งทะเล ต่อมาได้ขยายเข้าสู่ป่าชายเลนที่ดินยังเค็ม และมีน้ำทะเลท่วมถึง โดยดัดแปลงพื้นที่ดังกล่าวให้เป็นบ่อสำหรับการการเลี้ยงกุ้งเพื่อให้ได้พื้นที่การเลี้ยงและผลผลิตสูงขึ้น บ่อเลี้ยงสร้างขึ้นโดยการขุดร่องน้ำลึกประมาณ 1-1.5 เมตรรอบบริเวณบ่อ (เรียกชาวัว) แล้วนำดินที่ขุดขึ้นมาก่อเป็นคันดินเพื่อกักเก็บน้ำทะเล บ่อเลี้ยงกุ้งระบบดั้งเดิมมีขนาดประมาณ 50-200 ไร่

การเลี้ยงกุ้งระบบนี้อาศัยลูกกุ้งจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเข้าสู่บ่อเลี้ยงโดยการขึ้นลงของน้ำทะเลหรือแรงส่งจากการสูบน้ำ กุ้งในบ่อเลี้ยงจะเจริญเติบโตโดยใช้อาหารธรรมชาติที่เกิดขึ้นเองในระบบของบ่อ แม้ว่าการเลี้ยงกุ้งด้วยระบบดั้งเดิมใช้ต้นทุนการผลิตต่ำเนื่องจากอาศัยธรรมชาติเป็นหลัก แต่ต้องใช้พื้นที่มาก ให้ผลผลิตเพียง 40-70 กก.ต่อไร่ต่อปี และไม่แน่นอน

1.2 <u>การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนา (Semi-intensive system)</u>

เมื่อการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมมีปัญหา คือผลจากลูกกุ้งในน้ำทะเลที่ดันเข้ามามีปริมาณ

ลดน้อยลงเรื่อย ๆ มีการขยายพื้นที่เลี้ยงกุ้งในละแวกใกล้เคียงเพิ่มมากขึ้นจนทำให้พื้นที่เลี้ยงกุ้งมีราคาแพงมากขึ้น จึงคิดหาวิธีแก้ไขโดยใช้ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักลูกกุ้งซึ่งส่วนใหญ่เป็นกุ้งแชบ๊วย (*Peneaus merguiensis*) ไปปล่อยเสริม และดัดแปลงพื้นที่นากุ้งแบบดั้งเดิมบางส่วนเพื่อให้สามารถใช้พื้นที่นากุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีบ่ออนุบาลลูกกุ้งที่ซื้อลูกกุ้งจากโรงเพาะฟัก มีการให้อาหารเสริม เช่น ปลาเป็ด และกำจัดศัตรูลูกกุ้ง เมื่อลูกกุ้งที่อนุบาลโตและแข็งแรงเพียงพอ จึงเปิดประตูปล่อยลูกกุ้งออกไปเลี้ยงรวมกับกุ้งที่เลี้ยงแบบธรรมชาติ (ดั้ง-เดิม) ซึ่งอยู่ในนากุ้งแบบเก่าต่อไป

การเลี้ยงกุ้งแบบนี้บางครั้งเรียกว่า การเลี้ยงกุ้งแบบปล่อยเสริม (Additonal system) สามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 80-100 กก.ต่อไร่ต่อปี

1.3 <u>การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (Intensive system)</u>

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนิยมเลี้ยงแบบพัฒนากันเป็นส่วนใหญ่ โดยสร้างบ่อเลี้ยงตามป่าชายเลนซึ่งเป็นแหล่งน้ำกร่อย ซึ่งส่วนใหญ่จะขุดบ่อขนาด 4-6 ไร่ เพื่อควบคุมสภาพน้ำและดูแลรักษาได้อย่างทั่วถึงโดยใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่ได้รับการถ่ายทอดจากประเทศไต้หวัน และมีอาหารหลักที่ใช้เลี้ยงคืออาหารอัดเม็ดสำเร็จรูป การเลี้ยงแบบนี้ต้องซื้อลูกกุ้งกุลาดำจากโรงเพาะฟักมาปล่อย โดยทั่วไปขนาดลูกกุ้งกุลาดำที่นำมาปล่อยเลี้ยง เป็นลูกกุ้งขนาด P_{15}-P_{20} หรือลูกกุ้งขนาดความยาว 1-1.5 ซม. อัตราการปล่อยเลี้ยงในบ่อเลี้ยงประมาณ 20-200 ตัวต่อตารางเมตร

ลูกกุ้งที่ได้จากโรงเพาะฟัก เป็นลูกกุ้งที่เกิดจากการเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำ หรือการเพาะฟักกุ้งกุลาดำ โดยการนำพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์มาให้ผสมพันธุ์และฟักไข่ในโรงเพาะฟักได้เป็นกุ้งวัยอ่อน และทำการเลี้ยงจนถึงระยะโพสลาวา (post-larva) ซึ่งในระยะนี้ลูกกุ้งมีวิวัฒนาการโดยหลังการลอกคราบแต่ละครั้งจะได้รูปร่างลักษณะเปลี่ยนแปลงสมบรูณ์ขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้ลูกกุ้งมีรูปร่างเหมือนพ่อแม่พันธุ์ แต่ตัวเล็กมากประมาณ 5.50 มม. ระยะโพสลาวาสามารถแบ่งออกเป็น 25 ช่วง ภายใน 25 วัน เรียกว่า โพสลาวาที่ 1 (P_1) เรื่อยไปจนถึงโพสลาวาที่ 25 (P_{25}) ลูกกุ้งที่มีสภาพปกติ จะมีสีเหลืองใส มีลายหรือจุดเกิดขึ้น กรียาวออก หนามบนลำตัวหายไปหมด

ระบบการเลี้ยงแบบนี้สามารถให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ประมาณ 2000-4000 กก. ต่อไร่ต่อปี อีกทั้งได้กุ้งที่มีขนาดเป็นที่นิยมของผู้บริโภคตามความต้องการของตลาดโลกด้วย

การใช้เครื่องให้อากาศเป็นสิ่งจำเป็นมากในการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา มีวัตถุประสงค์หลักคือ เพื่อต้องการรักษาระดับออกซิเจนในน้ำให้เพียงพอ และทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำผสมกันทั่วบ่อ ป้องกันการแบ่งชั้นของน้ำซึ่งอาจจะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำบริเวณก้นบ่อ รวมทั้งรวบรวมเคลื่อนย้ายตะกอนในบ่อไปรวมกันกลางบ่อ เพื่อเพิ่มพื้นที่ก้นบ่อให้สะอาดสำหรับกุ้งพักอาศัย

การจัดการคุณภาพของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนา มีความสำคัญมาก ซึ่งคุณสมบัติของน้ำที่มีความสำคัญ คือ ควรมีความเค็มของน้ำอยู่ระหว่าง 10-25 พีพีที ปริมาณออกซิเจนอยู่ระหว่าง 5 พีพีเอ็มถึงจุดอิ่มตัว ความเป็นกรดเป็นด่างมีค่าระหว่าง 7.5-8.5 ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์สูงสุดไม่เกิน 0.033 พีพีเอ็ม แอมโมเนียไม่เกิน 0.10 พีพีเอ็ม นอกจากนี้คุณภาพของดินในนากุ้งเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงด้วยเช่นกัน เพราะคุณสมบัติของดินมีอิทธิพลต่อคุณภาพน้ำในนากุ้งด้วย โดยเฉพาะสภาพดินเปรี้ยวหรือดินเป็นกรดต้องระมัดระวังมากที่สุด

ในบ่อเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนานั้นจะมีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนที่ก้นบ่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจจะเกิดจากขบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือโดยจุลินทรีย์จำพวกไนตริไฟอิ้ง แบคทีเรีย (nitrifying bacteria) ซึ่งในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทตามลำดับ นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังมีผลต่อการหมุนเวียนก๊าซออกซิเจน ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ในบ่อ และยังทำให้กุ้งป่วยเป็นโรคบางชนิดได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา คงเป็นกลไกสำคัญอย่างยิ่งในการกำหนดทิศทางของอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง แต่ทั้งนี้การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาคงไม่ใช่หมายถึงการเลี้ยงกุ้งที่มุ่งจะเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิต โดยใช้ต้นทุนที่เหมาะสมเพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาคงจะต้องมุ่งที่จะดำเนินงานในลักษณะที่สามารถรักษาและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดไปด้วย

2. ไคติน (Chitin)

ไคติน เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่พบมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส (Ruiz-Herrera, 1978; O'Brien and Cowell, 1987) แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 จากราโดย Henry Braconnat โดยพบว่าเป็นสารประกอบที่ทนต่อสภาวะด่างได้ และให้ชื่อว่า "fugine" ต่อมาในปี ค.ศ.1823 Odier ได้แยกสารนี้จากส่วน elytra ของแมลง และให้ชื่อว่า "chitine" หรือ "chitin" (Cabib, 1987)

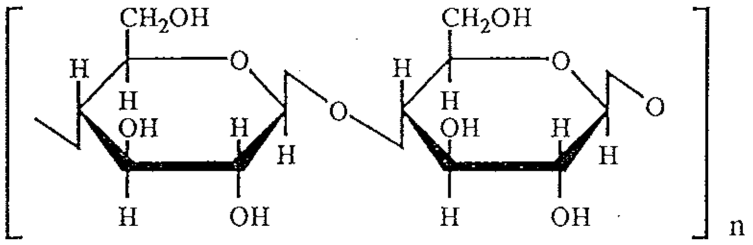
2.1 ลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติของไคติน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์มีลักษณะเป็นโพลิเมอร์ของ N-acetyl-2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranose หรือ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ชนิด β-1,4 เกิดเป็นโครงสร้างของโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาวเช่นเดียวกับเซลลูโลส (รูป 1) แต่ตำแหน่งของคาร์บอนตัวที่ 2 จับกับกลุ่มอะซิติลเอมีน ($-NHCOCH_3$) แทน (Cabib, 1987)

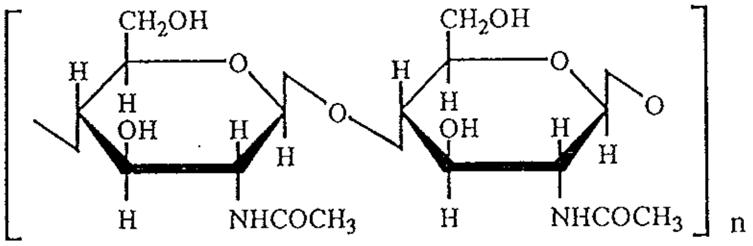
ไคตินบริสุทธิ์ไม่ละลายน้ำ กรดอ่อน ด่างอ่อน ด่างแก่ และในตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม Charles (1984) พบว่าไคตินละลายได้ใน N,N-dimethyl-acetamide (DMAc) ที่มี 5% LiCl ผสมอยู่ โดยไม่มีผลทำลายโครงสร้างของไคติน นอกจากนั้นไคตินยังละลายได้ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ trichloroacetic acid (40%), choral hydrate (40%) และ methylene chloride (20%) แต่จะมีผลทำให้สายยาวของโมเลกุลไคตินแตกหักจนไคตินสามารถละลายได้

2.2 แหล่งของไคติน

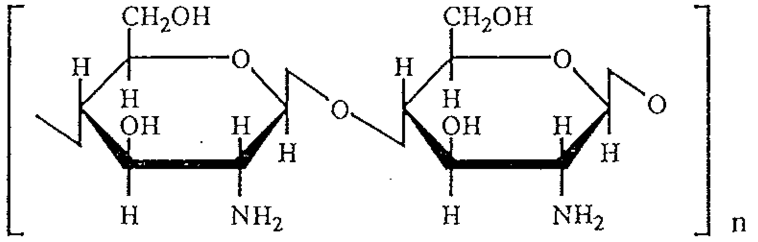
ไคตินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเปลือกนอกและกระดองของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะในสัตว์ขาปล้อง (arthopod) เช่น ครัสตาเชียน (crustacean) และผนังเซลล์รา (Ruiz-Herrera, 1978) ซึ่งไคตินในธรรมชาติจะเกาะเกี่ยวร่วมกับสารชนิดอื่น เช่น คัลเซียมคาร์บอเนต ฟอสเฟต และโปรตีน (Jeuniaux, 1986) นอกจากนี้อาจพบไคตินอยู่ร่วมกับเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช สำหรับปริมาณไคตินนั้นจะแตกต่างไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิตดังแสดงในตาราง 1



cellulose



chitin



chitosan

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส, ไคติน และไคโตแซน

ที่มา : Cabib (1987)

ตาราง 1 ปริมาณไคตินในสัตว์และราบางชนิด

Type	Chitin content (%)	Type	Chitin content (%)
Crustacea		Molluscan Organs	
Cancer (crab)	72.1[c]	Clam shell	6.1
Carcinus (crab)	0.4-3.3[a]	Oyster shell	3.6
	8.29[b]	Squid, skeletal pen	41.0
	64.2[c]	Krill, deproteinized shell	40.2+5.2
Paralithodes (King crab)	35[b]		
Callinectes (blue crab)	14[a]	Insect	
Pleuroncodes (red crab)	1.3-1.8[b]	May bettle	16[b]
Crangon (shrimp)	5.8[b]	Diptera (true fly)	54.8[c]
	69.1[c]	Pieris (sulfur butterfly)	60[c]
Alaskan shrimp	28[d]	Grassshopper	2-4[a]
Nephrops (lobster)	69.8[c]		20[c]
	6.7[b]	Bombyx (silkworm)	44.2[c]
Homorus (lobster)	60.8-77.0[c]	Calleria (wax worm)	33.7[c]
Lepus (barnacles)	58.3[c]	Periplanta (cockroach)	2.0[c]
		Plattela (cockroach)	18.4[c]
			10[b]
			35[c]

ตาราง 1 (ต่อ)

Type	Chitin content (%)	Type	Chitin content (%)
Fungi		Insect (continued)	
Aspergillus niger	42.0[e]	Colcoptera (bettle)	5-15[b]
Penicillium notatum	18.5[e]		27-35[c]
Penicillium chrysogenium	20.1[e]		
Saccharomyces cerevisiae	2.9	Tenebrio (bettle)	2.1[a]
Mucor rouxii	44.5		4.9[b]
Lactarius vellereus (mushroom)	19.0		31.3[c]

[a] Wet body weight

[b] Dry body weight

[c] Organic weight of cuticle

[d] Total dry weight of cuticle

[e] Dry weight of the cell wall

ที่มา : Knorr, 1984 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534

การผลิตไคตินปริมาณมากอย่างต่อเนื่องในธรรมชาตินั้น ทำให้เกิดการถ่ายเทและหมุนเวียนของธาตุคาร์บอน และธาตุไนโตรเจนอย่างเป็นระบบ เช่น copepod สามารถผลิตไคตินได้ถึงปีละหลาย ๆ พันล้านตัน โดยการลอกคราบ 10-12 ครั้งในแต่ละขั้นของการพัฒนาการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามกลับพบว่ามีไคตินหลงเหลือในตะกอนดินใต้ท้องทะเลปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายของ"เอนไซม์" นั้นเอง ดังนั้นปัญหาการขาดแคลนธาตุคาร์บอน และธาตุไนโตรเจนในวงจรของระบบธาตุทั้งสอง สำหรับการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตในมหาสมุทรจึงไม่เกิดขึ้น (Johnstone, 1908 อ้างโดย Zobell and Rittenberg, 1938)

2.3 <u>การนำไคตินไปใช้ประโยชน์</u>

ปัญหาที่เกิดขึ้น สำหรับการนำไคตินที่สกัดจากธรรมชาติไปใช้ประโยชน์ คือไคตินเป็นสารที่ละลายได้ยาก ดังนั้นการนำไคตินไปใช้ จึงมักอยู่ในรูปอนุพันธ์ของไคตินโดยเฉพาะไคโตแซน (รูป 1) ซึ่งเกิดจากการแยกหมู่อะซิติล (deacetylation) ออกจากไคตินเกิดเป็นหมู่อะมิโนอิสระที่สามารถรับโปรตอน และทำให้โพลิเมอร์ที่ได้มีประจุรวมเป็นบวก ด้วยเหตุนี้ไคโตแซน จึงมีคุณสมบัติที่ละลายได้ในสารละลายหลายชนิดในช่วงพีเอชเป็นกรดต่ำกว่า 5.5 (Filar and Wirick อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) และทำให้การใช้ประโยชน์ของไคโตแซนสูงกว่าไคติน

ประโยชน์ของสารไคตินและไคโตแซน สามารถประยุกต์ใช้หลายด้าน เช่น

2.3.1 ด้านการเกษตร ใช้ไคโตแซนเคลือบเมล็ดข้าวสารเพื่อป้องกันเชื้อราทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 20 และใช้ไคตินในการเตรียมดินสำหรับเพาะปลูกทำให้ลดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในดินได้ (Brzeski, 1987 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) นอกจากนี้มีการใช้ไคตินในรูปผลึกขนาดเล็ก (microcrystalline chitin) 2% ผสมกับหางนม 20% ในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่ พบว่าไก่ที่กินอาหารผสมที่มีไคตินและหางนมมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติ และอาหารที่มีการเติมหางนมหรือไคตินเพียงอย่างเดียว (Austin, *et al.*, 1981 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534)

2.3.2 ด้านการแพทย์และเภสัชวิทยา ใช้ไคตินและไคโตแซนในการรักษาบาดแผล (Balassa and Prudolen, 1978 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) ใช้เป็นเลนส์สายตาเนื่องจากมีคุณสมบัติยอมให้ออกซิเจนผ่านเข้าออกได้และไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา ใช้เป็นสารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นตัวจับและตกตะกอนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ใช้ผลิตผนังเทียมพวก functional membrane เช่น ผนังไต ใช้เป็นสารลดคลอเรสเตอรอล และใช้เป็นสารเชื่อมหรืออุดฟันในด้านทันตกรรม (Brzeski, 1987 ; Anonymous, 1989 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534)

2.3.3 ด้านอุตสาหกรรม จากคุณสมบัติของไคโตแซนที่สำคัญหลายประการ เช่น การเป็นสารก่อให้เกิดอิมัลชั่น การจับกับสี การเกิดแผ่นฟิล์ม การเกิดเจลและการเป็นสารลดแรงตึงผิว (Knorr, 1984 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) จึงใช้ไคโตแซนทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางสำหรับผิวและเส้นผม อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมแก้ว อุตสาหกรรมการแปรรูปไม้ และการถ่ายภาพ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารตกตะกอนในการบำบัดน้ำเสีย (No and Meyers, 1989 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) ใช้กำจัดโลหะหนักและสารพิษโดยเฉพาะพวก radioactive isotope (Kurita, *et al.*, 1986 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) ตลอดจนการทำให้น้ำผลไม้ใส (Soto-Peralta, *et al.*, 1989 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) และลดสารที่ไม่ต้องการบางชนิดในอาหารเช่น แทนนินได้ (Knorr, 1984 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534)

2.3.4 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ใช้ไคตินและไคโตแซนสำหรับการตรึงเอนไซม์ (Scisic, *et al.*, 1986 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534) และใช้จับหรือกักเซลล์ (Yoshioka, *et al.*, 1990 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2534)

นอกจากไคติน และไคโตแซนจะถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายแล้ว GlcNAc และเกลือของกลูโคซามีนซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ GlcNAc เช่น Glucosamine hydrochloride สามารถดัดแปลงนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัชวิทยาได้เช่นกัน (Charles, 1984)

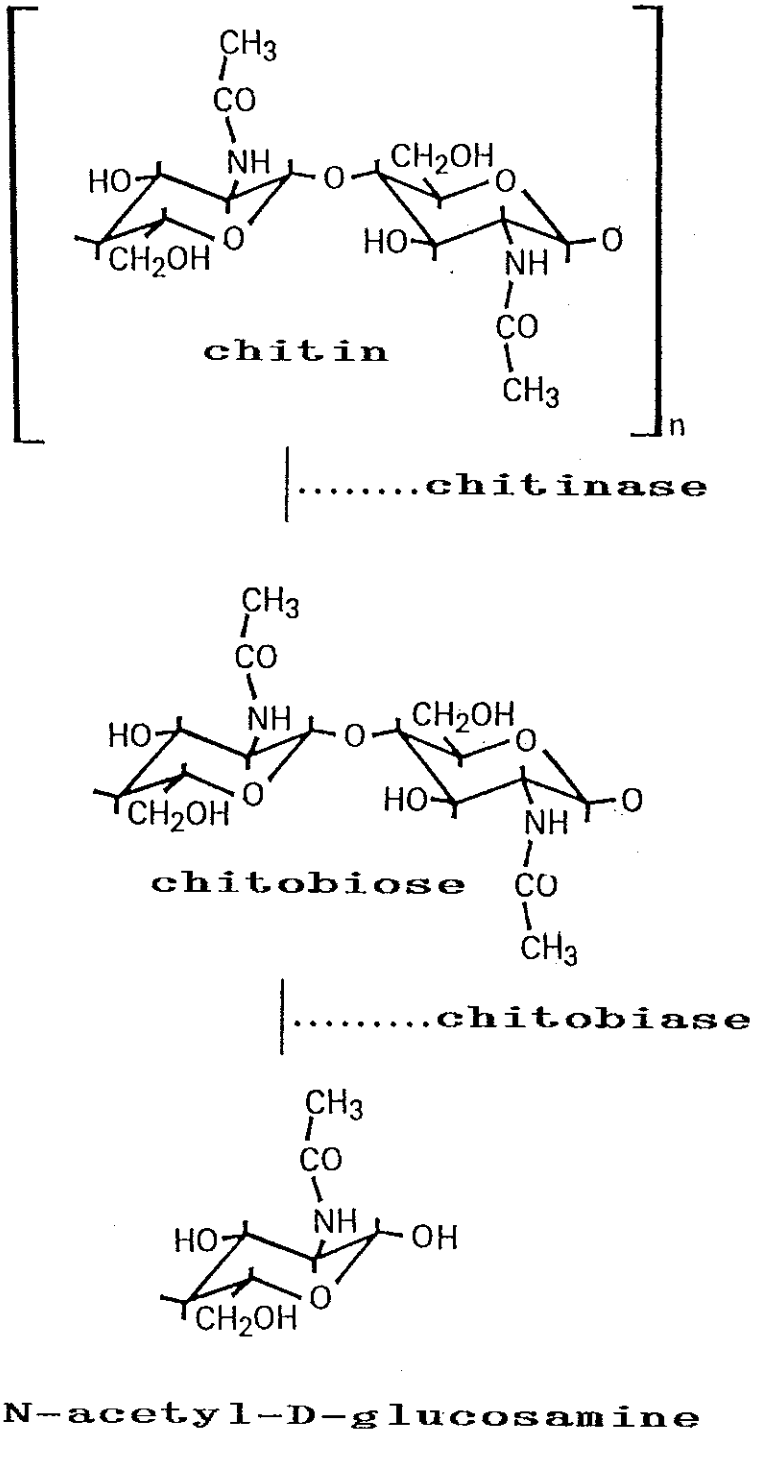
3. การย่อยสลายไคตินโดยเอนไซม์

การทำให้ไคตินอยู่ในรูปของหน่วยย่อย นอกจากผ่านกระบวนการทางเคมีดังที่กล่าวมาแล้ว อาจอาศัยเอนไซม์ย่อยสลายได้ด้วย โดยทั่วไปการย่อยสลายไคตินให้เป็นหน่วยย่อย GlcNAc ในสิ่งมีชีวิต ต้องผ่านกระบวนการ chitinolytic system ซึ่งประกอบด้วย ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 2 ขั้นตอน และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคติน 2 ชนิด คือเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์ไคโตไบเอส (chitobi-ase)

ขั้นตอนแรกไคติเนส หรือ poly-β-1,4-(2 acetamido-2-deoxy)-D-gly-coside glucanohydrolase (EC: 3.2.1.14) จะไฮโดรไลซ์ไคตินหรือโพลิเมอร์ของ GlcNAc ได้เป็นไคโตไบโอส (chitobiose) ซึ่งเป็น dimer ของ GlcNAc และโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ (Correa *et al.* 1939 อ้างโดย Cabib, 1987) และในขั้นต่อไป ไคโตไบเอส หรือ chitobiose acetamido deoxyglucohydrolase หรือ β-acetyl -N-hexosaminidase หรือ exo-N-acetyl-β-glucosaminedase (EC: 3.2.1.29) จะไฮโดรไลซ์ไคโตไบโอสต่อไปจนได้เป็น GlcNAc อิสระ ดังรูป 2 แต่จากรายงานของ Ward and Fairbairn (1972 อ้างโดย Cabib, 1987) พบว่าไคติเนสที่ได้จาก *Ascaris suum* สามารถให้ผลผลิตที่เป็น GlcNAc ได้ด้วย

Zobell และ Rittenberg (1938) เสนอว่า การที่ไคตินสามารถถูกย่อยได้เป็นผลมาจากการแตกหักของพันธะไกลโคซิดิก หรือการถูกตัดของกลุ่มอะซิติลเอมีน

ไคติเนสมีบทบาทสำคัญในธรรมชาติทั้งในด้านการไฮโดรไลซ์พวกคิวติเคิล หรือเปลือกและคราบของสัตว์พวกอาร์โทรปอด มีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมในผนังเซลล์ของรา และในการแบ่งแยกเซลล์เพื่อการเจริญของยีสต์ สำหรับในพืชบางชนิดที่มีไคติเนสนั้นสามารถป้องกันการติดเชื้อจากพวกราได้ด้วย (Cabib, 1987)



รูป 3 ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตไบเอส

4. แหล่งของไคติเนส

4.1 <u>ในสัตว์และพืช</u>

การผลิตไคติเนสพบได้ตั้งแต่ในโปรโตซัวบางชนิด ในพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง กลุ่มซีเลนเตอเรท กลุ่มโพลีคีท กลุ่มโอลิโกคีท ในกลุ่มนีมาโทดบางชนิด (ตาราง 2) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวอาจสังเคราะห์ขึ้นโดยต่อมเนื้อเยื่อ (glandular tissue) ของระบบทางเดินอาหาร ส่วนในพวกสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นพบการสังเคราะห์ไคติเนสทั้งในสัตว์ประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลานบางชนิดได้จากตับอ่อน และ gastric mucosa ในขณะที่สัตว์ประเภทนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดนั้นสังเคราะห์ขึ้นจากจาก gastric mucosa เพียงแหล่งเดียว (Jeuniaux, 1986)

กลุ่มนีมาโทดบางชนิดในช่วงฟักไข่ และกลุ่มของอาร์โทรปอดบางชนิดในช่วงการลอกคราบ (Jeuniaux, 1986) พบว่า มีการสังเคราะห์ไคติเนสโดยเซลล์ใต้ผิวหนัง (epidermal cell) ได้ด้วย

สำหรับในพืชเริ่มจากรายงานของ Zechmeister และ Toth (1938), Zechmeister, Toth และ Baliot (1938) (อ้างโดย Reynolds, 1954) ที่ได้อธิบายถึงสาร emulsin ที่สกัดจากเมล็ดแอลมอน เมื่อถูกแยกโดยโครมาโตกราฟฟี จะได้ β-glucosidase, α-galactosidase, chitinase, polysaccharidase และ chitobiase ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการผลิตไคติเนสในพืชอีกหลายชนิด (ตาราง 2)

4.2 <u>ในจุลินทรีย์</u>

แหล่งของไคติเนสที่ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางนั้นได้จากจุลินทรีย์ซึ่ง Reynolds (1954) กล่าวถึงประวัติการศึกษาไคติเนสในจุลินทรีย์ไว้ว่า เริ่มใน ปี ค.ศ 1921 โดย Benecke เป็นบุคคลแรกที่ทำงานทางด้านการแยกเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไคตินได้ พบว่า *Bacillus chitinovarous* ที่อยู่ในสภาพไม่สร้างสปอร์เป็นสภาวะที่มีการผลิตไคติเนส ในปีเดียวกัน Folpeness พบว่าจุลินทรีย์ Eubacteriales และ Actinomycetes ที่เลี้ยงไว้ สามารถผลิตไคติเนสและขับออกสู่นอกเซลล์ได้โดยสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นเมื่อนำเชื้อทั้งสองไปเลี้ยงบนจานอาหารที่มีสับสเตรทเป็น precipited chitin ในปี ค.ศ 1931 Grassmann และ Rubenbauer พบว่า สารซึ่งเตรียมจากการสกัดของเหลว

ตาราง 2 ชนิดของสัตว์และพืชที่สามารถสังเคราะห์ไคติเนส

Type	Reference
Animal	
Calf serum	Lundblad (1979 อ้างโดย Cabib, 1987)
Spider : *Cupiennius salei*	Mommsen (1980 อ้างโดย Cabib, 1987)
Stable fly : *Stomoxis calcitrans*	Shen, *et al.* (1982 อ้างโดย Cabib, 1987)
Horn worm : *Manduca sexta*	Koga, *et al.* (1983)
Silk worm : *Bombyx mori*	Koga, *et al.* (1983)
Red sea bream : *Pagrus major*	Kono, *et al.* (1987)
Prawn : *Penaeus japonicus*	Kono, *et al.* (1990)
American Lobster : *Homorus americanus*	Lymn (1990)
Plant	
Yam : *Dioscorea opposita*	Tsukamoto, *et al.* (1984 อ้างโดย Cabib, 1987)
Bean : *Pheseolus vulgaris*	Boller, *et al.* (1983)
Wheat germ	Molano, *et al.* (1979)
Tobacco : *Nicotiana tabacum*	Grosset, *et al.* (1990)
Rape : *Brassica napus*	Rusmussen, *et al.* (1992)
Leek : *Allium porrum*	Dumas-Gaudot, *et al.* (1992)
Allium cepa	Dumas-Gaudot, *et al.* (1992)

ที่ได้จาก *Aspergilus niger* เมื่อถูกนำมาอบแห้งภายใต้ชื่อผลิตภัณฑ์ทางการค้าว่า "Luizyme" นั้นสามารถย่อยไคตินได้

จากจุดเริ่มต้นดังกล่าว การคัดเลือกและการศึกษาถึงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไคติเนสได้กระทำอย่างต่อเนื่อง ทั้งในกลุ่มของแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน (ตาราง 3) อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์คงเสาะแสวงหาจุลินทรีย์ต่อไปเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ไคติเนสได้ตามเป้าหมายในการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด และไม่ทำอันตรายสร้างผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในสิ่งแวดล้อมด้วย

5. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไคติเนสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

5.1 <u>องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์</u>

จากรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกเชื้อ และหาสภาวะเหมาะสมในการผลิตไคติเนส พบว่า จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสแตกต่างกัน ซึ่งทุกสูตรประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร พบว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในลักษณะที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น *Serratia marcescens* QM B1466 (Monreal and Reese, 1969) ให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสที่สูง เมื่อใช้สับสเตรทที่เป็น swollen chitin มากกว่า crystal chitin อีกทั้งขนาดของไคตินที่ใช้เมื่อมีขนาดเล็ก จะให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสที่สูงกว่าการใช้ไคตินขนาดใหญ่ นอกจากนี้เปอร์เซนต์ไคตินที่ใช้มีความเหมาะสมแตกต่างกันในแต่ละจุลินทรีย์ เช่น *Alteromonas* sp.O-7 (Tsujibo, *et.al.*, 1991) ใช้ไคติน 0.5% ในขณะที่ *Serratia marcescens* QM B1466 ใช้ไคติน 1.5% และ *Aspergillus fumigatus* ใช้ไคติน 2.0% (Monreal and Reese, 1969) จึงจะให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสสูงสุด

ในการเลี้ยง *Serratia marcescens* QM B1466 ได้มีการเติมน้ำตาลบางชนิด เช่น กลูโคส และแลคโตสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถยับยั้งการผลิตไคติเนส ในขณะที่การเพิ่ม yeast extract 0.02% ให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสที่สูงขึ้น นอกจากนี้การใช้สับ-

ตาราง 3 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ไคติเนส

Type	Reference
Bacteria	
Streptomyces sp.	Reynolds (1954)
Chromobacterium sp.	Clarke and Tracy (1956)
Klesiella sp.	Clarke and Tracy (1956)
Pseudomonas sp.	Clarke and Tracy (1956)
Clostridium sp.	Clarke and Tracy (1956)
Vibrio sp.	Ohtakara, *et al.* (1979)
Vibrio harveyi	Soto-Gil and Zyskind (1984)
Vibrio vulnificus	Wortman, *et al.* (1986)
Vibrio furnissii	Bassler, *et al.* (1991)
Serratia marcescens QM B1466	Monreal and Reese (1969)
Streptomyces griseus	Berger and Reynolds (1958)
Streptomyces antibioticus	Jeuniaux (1986)
Streptomyces orientalis	Tominaga and Tsujisaka (1976)
Streptomyces plicatus	Robbins, *et al.* (1988)
Streptomyces sp. S-84	Ueno, *et al.* (1990)
Streptomyces lividans 66	Miyashita, *et al.* (1991)
Aeromonas hydrophila sub sp. *anaerogenes* A 52	Yabuki, *et al.* (1986)
Aeromonas hydrophila	Chen, *et al.* (1991)
Aeromonas sp. NO.10S-24	Ueda and Arai (1992)

ตาราง 3 (ต่อ)

Type	Reference
Bacteria (continued)	
Arthrobacter sp.	Morissey, *et al.* (1976)
Alteromonas sp.O-7	Tsujibo, *et al.* (1991)
Bacillus megatarum	Bennett and Hood (1980)
Bacillus circulans Wl-12	Watanabe, *et al.* (1990)
Fungi	
Aspergillus fumigatus	Jeuniaux (1986)
Aspergillus niger	Ohtakara (1961 อ้างโดย Ohtakara, *et al.*, 1979)
Aspergillus nidulans	Polachek and Rosenberger (1978)
Aspergillus carneus	Abdel-Naby, *et al.* (1992)
Mucor subtilissimum	Jeuniaux (1986)
Mucor mucedo	Humphreys and Gooday (1984)
Rhizopus oligosporus	Yanai, *et al.* (1992)
Yeast	
Pichia kudriavzevii	Revah-Moiseev and Carroad (1981)
Saccharomyces cerevisiae	Correa, *et al.* (1982)

สเตรทที่อยู่ในรูปของไคตินสามารถเป็น inducer ที่ดี ในขณะที่ไคตินเมื่อถูกเปลี่ยนสภาพเป็นหน่วยย่อย (GlcNAc) หรือถูก deacetylation (Chitosan) จะไม่สามารถชักนำให้มีการผลิตไคติเนส (Monreal and Reese, 1969)

5.2 <u>ฮอร์โมนในพืช</u>

การปรับสภาพให้สามารถทนต่อโรคในพืชชั้นสูงเมื่อมีการติดเชื้อนั้น ส่วนหนึ่งคือการสังเคราะห์โปรตีน ทั้งในกลุ่มของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้าง phytolexin สารพิษต่อแบคทีเรีย และรา), กลุ่มของเอนไซม์ที่ชักนำให้เกิดการดัดแปลงทางกายภาพบริเวณผนังเซลล์พืชจนทำให้ขัดขวางต่อการติดเชื้อ, สารยับยั้งของกลุ่ม serine endoprotease และ กลุ่ม lytic enzyme เช่น ไคติเนส และ β-(1,3) glucanase ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้สามารถเพิ่มขึ้น เมื่อมีฮอร์โมนพืชบางชนิด เช่น เอททิลีน (ethylene) เพิ่มขึ้น โดยพืชจะผลิตเอททิลีนเพิ่มขึ้นก็ต่อเมื่อได้รับแรงกดดันจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่รวมถึงการทำให้เกิดบาดแผล หรือการติดเชื้อในพืชนั้นเอง (Broglie, *et al.*,1986)

จากการทดลองของ Boller, *et al.* (1983 อ้างโดย Cabib, 1987) พบว่า เมื่อให้เอททิลีนในใบถั่ว สามารถชักนำให้มีการผลิตไคติเนสปริมาณที่สูงขึ้น 30-40 เท่า ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน ในระดับกระบวนการแปลรหัส (translation) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อหยุดการแปลรหัสด้วยสาร cyclohexamide จะทำให้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของไคติเนส ในขณะเดียวกัน Mauch, *et al.* (1984 อ้างโดย Cabib, 1987) พบว่าการผลิตเอททิลีนที่เพิ่มขึ้นนั้น มีความสัมพันธ์กับสภาวะการติดเชื้อจริง แต่อาจไม่ใช้เอททิลีนเป็นตัวกลางในวิถีทาง (pathway) ตัวอย่างเช่น ใน peapods มีการผลิตไคติเนสสูงขึ้นได้ โดยถูกกระตุ้นจากสภาวะที่มีการติดเชื้อเพียงประการเดียว แม้ปริมาณเอททิลีนไม่เพิ่มขึ้นก็ตาม

นอกจากนี้ไคติเนสสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยฮอร์โมนพืชบางชนิด เช่น ออกซิน (auxin) และ ไซโตไคนิน (cytochinin) โดยจากการทดลองของ Shinshi, *et al.* (1986) พบว่า เมื่อให้ออกซิน และไซโตไคนินในเนื้อเยื่อของใบยาสูบ ทำให้สามารถยับยั้งการผลิตไคติเนสซึ่งเป็นการยับยั้งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน ในระดับกระบวนการลอกรหัส (transcription)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

5.3 เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

การผลิตไคติเนสของ *Manduca* sp. (Horn worm ชนิดหนึ่ง) พบว่า เมื่อให้กระบวนการย่อยสลายโปรตีนเข้ามามีบทบาท โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสทำการย่อยในองค์ประกอบที่เป็นส่วนของโปรตีนในชั้นคิวติเคิลเป็นผลให้การปลดปล่อยไคติเนสออกไปได้สะดวกขึ้น (Bade, *et al.*, 1976; Bade and Stinson, 1978 อ้างโดย Cabib, 1987) ส่วนการผลิตไคติเนสของ *Mucor mucedo* พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ทริปซิน มีผลให้มีการผลิตไคติเนสเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า (Humphreys and Gooday, 1984)

6. คุณสมบัติของไคติเนสในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

การศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของไคติเนส จำเป็นต้องทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงเสียก่อน จึงจะนำไปทดสอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำ ซึ่งการทำให้ไคติเนสจากจุลินทรีย์ พืช และสัตว์บางชนิดมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นนั้น ได้มีผู้รายงานแล้วเป็นจำนวนมากดังในตาราง 4 ซึ่งแสดงถึงตัวอย่างของไคติเนสที่แยกได้ และได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์

6.1 พีเอชเหมาะสม

โดยทั่วไปงานวิจัยแต่ละเรื่องมีวัตถุประสงค์ที่ไม่เหมือนกัน ทำให้มีวิธีการคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตไคติเนสได้แตกต่างกัน พบว่าสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ผลิตไคติเนสที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง การทำงานของไคติเนสส่วนมากจะถูกยับยั้งที่พีเอชเป็นกรด แต่ก็มีไคติเนสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตบางชนิดทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรด (ตาราง 4) นอกจากนั้นไคติเนสที่ได้จากจุลินทรีย์บางชนิดมีพีเอชเหมาะสมอยู่ในช่วงเป็นด่าง เช่น *Vibro* sp. มีพีเอชเหมาะสมอยู่ที่ 10.5 เมื่อใช้ swollen chitin เป็นสับสเตรท (Ohtakara, *et al.*, 1979)

ไคติเนสที่ได้ส่วนใหญ่ มีความคงทนพีเอชในช่วงกว้าง เช่น ไคติเนสที่ได้จาก *Serratia marcescens* QM B1466 (Monreal and Reese, 1969) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอช ตั้งแต่ 4.5-7.5 และ *Vibrio sp.* (Ohtakara, *et al.*, 1979) ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5.0-11.0

ตาราง 4 คุณสมบัติบางประการของไคติเนสบริสุทธิ์ที่ได้จาก จุลินทรีย์ พืช และสัตว์บางชนิด

Source	Substrate Used	K_m (mM)	pH Optimum	Molecular Weight	Referencee
Serratia marcescens	Chitin	-	4-7	52,000;58,000[a]	Roberts and Cabib (1982 อ้างโดย Cabib, 1987)
Aeromonas sp. NO.10S-24	Chitin	-	4.0	11,200;11,500[a]	Ueda and Arai (1992)
Aeromonas hydrophila sub sp. *anaerogenus* A 52	Chitin	2.8	7.0	110,000[c]	Yabuki, *et al.* (1986)
Alteromonas sp. 0-7	Chitin	-	8.0	70,000[c]	Tsujibo, *et al.* (1991)
Vibro sp.	Chitin	-	6.0-8.0	63,000[c]	Ohtakara, *et al.* (1979)
Aspergillus cerneus	Chitin	4.4	5.2	25,000[c]	Abdel-Naby, *et al.* (1992)

ตาราง 4 (ต่อ)

Source	Substrate Used	K_m (mM)	pH Optimum	Molecular Weight	Reference
Rhizopus oligosporus	Chitin	-	4.0,3.5	44,500;46,500[a]	Yanai, *et al.* (1992)
Streptomyces antibioticus	Chitin	0.5	-	30,000[c]	Jeuniaux (1986)
Streptomyces griseus	Chitin	5	6.3	-	Berger and Reynolds (1958)
Saccharomyces cerevisiae	Chitin	3.9	1.5-2.5	Several bands[d]	Correa, *et al.* (1982)
Wheat germ	Chitin	2	6	30,000[a]	Molano, *et al.* (1979)
Yam (*Dioscorea opposita*)*E-1*	Glycol Chitin	-	3.5,8.5	33,500[f]	Tsukamoto, *et al.* (1984 อ้างโดย Cabib, 1987)

ตาราง 4 (ต่อ)

Source	Substrate Used	K_m (mM)	pH Optimum	Molecular Weight	Reference
Yam (*Dioscorea opposita*)*E-2*	Glycol Chitin	-	-	33,500[c]	Tsukamoto, *et al.* (1984 อ้างโดย Cabib, 1987)
Yam (*Dioscorea opposita*)*E-3*	Glycol Chitin	-	3.5,8	33,500[c]	
Bean (*Phaseolus vulgaris*)	Chitin	-	6.5	30,000[c]	Boller, *et al.* (1983)
Red sea bream (*Pagrus major*)	Chitin	-	5.5	46,000[c]	Kono, *et al.* (1987)
Lobster (*Homarus americanus*)	Chitin	-	-	66,000[c]	Lymn (1990)
Hornworm (*Manduca sexta*) *I*	Glycol Chitin	0.6	6.5	75,000[c]	Koga, *et al.* (1983)

ตาราง 4 (ต่อ)

Source	Substrate Used	K_m (mM)	pH Optimum	Molecular Weight	Reference
Hornworm (*Manduca sexta) II*	Glycol Chitin	0.93	6.5	62,000[c]	Koga, *et al.* (1983)
Hornworm (*Manduca sexta) III*	Glycol Chitin	0.8	5.2	50,000[c]	Koga, *et al.* (1983)
Stable fly (*Stomoxis calcitrans)*	Chitin	33	5	48,000[c]	Chen, *et al.* (1982 อ้างโดย Cabib, 1987)
Spider (*Cupiennius salei)*	Chitin	-	7.2	48,000[c]	Mommsen (1980 อ้างโดย Cabib, 1987)
Calf serum	Glycol Chitin	3	1.5-2	47,000[a]	Lundblad, *et al.* (1979 อ้างโดย Cabib, 1987)

a= two major band is SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

b= by sedimentation analysis

c= the enzyme yield several bands upon polyacrylamide gel electrophoresis

d= SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and sedimentation equilibrium

e= gel filtration

f= SDS- polyacrylamide gel electrophoresis

6.2 <u>อุณหภูมิเหมาะสม</u>

ไคติเนสที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 50°ซ เช่น *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 (Yabuki,*et al.*, 1986) *Serratia marcescens* QM B1466 (Monreal and Reese, 1969) *Aspergillus carneus* (Abdel-Naby, *et al.*, 1992); *Aspergillus niger* (Ohtakara, 1961 อ้างโดย Ohtakara *et al.*, 1979) *Aeromonas* sp.NO.10S-24 (Ueda and Arai, 1992); Red sea bream : *Pagrus major* (Kono, *etal.*, 1987); *Alteromonas* sp. O-7 (Tsujibo, *et.al.*, 1991)

อุณหภูมินอกจากมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยทั่วไปไคติเนสถูกทำลายได้ง่าย แม้บ่มที่อุณหภูมิที่ไม่สูงนัก เช่น ไคติเนสที่ได้จาก *Vibrio* sp. (Ohtakara, *et al.*, 1979) ถูกทำลายเมื่อบ่มไว้ที่ 60°ซ เป็นเวลา 1 ชม. และไคติเนสที่ได้จาก *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 (Yabuki, *et al.*, 1986) ถูกทำลาย เมื่อบ่มไว้ที่ 55°ซ เป็นเวลา 1 ชม.

6.3 <u>ผลของอิออนโลหะและสารเคมี</u>

อิออนโลหะที่ความเข้มข้น 10^{-3} M ของแต่ละชนิดมีผลต่อการทำงานของไคติเนสที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มของ Na^{+},Mg^{2+}, K^{+}, Ca^{2+} สามารถให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่มของ Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{2+} ยับยั้งค่ากิจกรรมของไคติเนสที่ได้จาก *Streptomyces antibiocus* (Jeuniaux, 1986); *Aeromonas hydrophila* sub sp. *Anaerogenes* A 52 (Yabuki, *et al.*, 1986); *Vibro* sp. (Ohtakara, *et al.*, 1979) และ Fe^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} ยับยั้งค่ากิจกรรมของไคติเนสที่ได้จาก *Alteromonas* sp. O-7 (Tsujibo, *et al.*, 1991) อย่างไรก็ตาม Hg^{2+} ที่อยู่ในรูปของ *p*-chloromercuribenzoic สามารถยับยั้งค่ากิจกรรมของไคติเนสที่ได้จาก *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 แต่ไม่ยับยั้งค่ากิจกรรมของไคติเนสที่ได้จาก *Streptomyces antibioticus* (Jeuniaux, 1986) และ *Vibro* sp. (Ohtakara *et al.*, 1979)

7. การหาค่ากิจกรรมของไคติเนส

วิธีการหากิจกรรมของไคติเนสนั้นมีความยุ่งยากบางประการ ประการแรกได้แก่ลักษณะโดยธรรมชาติของไคติน ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เป็นไปอย่างลำบาก และทำให้การแปลผลที่ได้ไม่ถูกต้องนัก นอกจากนี้อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของสับสเตรทด้วย โดยปฏิกิริยาที่ได้จากการใช้สับสเตรทที่ถูกดัดแปลงบางส่วน เช่น colloidal chitin หรือสับสเตรทที่มีความชื้นสูง เช่น regenerated chitin ซึ่งได้จากการ reacetylation ไคโตแซน ให้ปฏิกิริยาที่เร็วกว่าเมื่อใช้สับสเตรทที่เป็น native chitin นอกจากนี้ยังมีสับสเตรทที่เป็นอนุพันธุ์ของไคตินที่นิยมใช้กันมากที่สุดตัวหนึ่งได้แก่ glycol chitin ซึ่งเป็นสารประกอบที่คาร์บอนตัวที่ 6 ของ acetylglucosamine มีหมู่ hydroxy-ethyl มาจับ แต่ glycol chitin มีข้อจำกัดที่การเตรียมแต่ละครั้งจะได้องค์ประกอบที่ไม่เหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลที่ได้ตลอดไป จึงหันมาใช้ 3,4-dinitrophenyl-tetra-*N*-acetylchitotetraose แทน ซึ่งข้อเสียคืออาจมีขนาดเล็กเกินกว่าที่ไคติเนสบางชนิดจะมาย่อยได้ รวมทั้งยังเป็นสารที่ไคโตไบเอส สามารถย่อยได้อีกด้วย

เมื่อเลือกได้สับสเตรทที่ต้องการแล้ว ต่อไปคือการเลือกวิธีการวัดกิจกรรมของไคติเนส ซึ่งอาจทำได้ 2 แบบ คือวัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้น และอัตราการเพิ่มขึ้นของผลผลิตจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท วิธีวัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้นวิธีหนึ่งคือการวัดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของ glycol chitin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ละลายได้ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ถ้าไคติเนสไฮโดรไลซ์ glycol chitin จนถึงบริเวณใกล้กับส่วนกลางของสายโซ่ ความไวของปฏิกิริยาจะลดลงซึ่งเป็นปัญหาเดียวกันที่พบในกรณีของการวัดความขุ่นจากการลดลงของอนุพันธ์ไคตินที่ไม่สามารถละลายได้ เช่น colloidal chitin ด้วย

สำหรับการวัดอัตราการเพิ่มขึ้นของผลผลิตจากปฏิกิริยานั้นสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยม คือการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing end) ซึ่งวิธีนี้จะมีความไวต่ำ ถ้าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตขึ้นมานั้นมีขนาดใหญ่ หรือใช้วิธีการตรวจสอบโดยวัดสารมีสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีจำเพาะทำให้เกิดสี (specific colorimetric reaction) ระหว่างสาร *p*-

dimethylaminobenzaldehyde กับ GlcNAc อย่างไรก็ตามในวิธีหลังนี้หาก GlcNAc มีกิ่งโซ่ที่ C-4 ก็จะไม่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะที่มีสี รวมทั้งข้อจำกัดทางด้านการทำงานของไคติเนสมิได้ให้ GlcNAc เสมอไป ดังนั้นการวัดด้วยวิธีดังกล่าวจึงไม่ได้ผล เว้นเสียแต่จะมีไคโตไบเอสอยู่ด้วย นอกจากนี้มีวิธีการใช้วัดความเข้มของสารมีสีที่เกิดจากการใช้สับสเตรทที่เป็น 3-4-Dinitrophenyl tetra-N-actyl chitotetraose ด้วย

วิธีที่มีความไวมากที่สุดในการวัดไคติเนสคือ radiometric ซึ่งสารตั้งต้นถูกติดฉลากด้วย ^{14}C หรือ ^{3}H และผลผลิตนั้นถูกตรวจหาโดยวัดสารรังสีที่เกิดขึ้น ภายหลังจากที่ได้นำส่วนที่ไม่ถูกย่อยของไคตินออกไปโดยการกรองหรือการเหวี่ยง (centrifugation) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสสูงมาก ได้แก่ chitosan ที่ reactelytion ด้วย ^{3}H acetic anhydride ทั้งนี้เพราะเป็นสารที่มีความชื้นสูง และให้ความไวสูงต่อไคติเนสมากกว่าสับสเตรทที่เป็นไคติน (Cabib, 1987)

8. การนำไคติเนสไปใช้ประโยชน์

การป้องกันพืชติดเชื้อจากพวกเชื้อรา โดยทั่วไปมักใช้สารเคมีเป็นหลัก การใช้วิธีควบคุมโดยวิธีชีวภาพเป็นอีกทางหนึ่งที่สามารถลดอัตราการติดเชื้อได้ดี ซึ่งกระบวนการที่สำคัญคือ อาศัยการย่อยสลายส่วนของผนังเซลล์ในเชื้อรา ที่มีโครงสร้างหลักของผนังเซลล์เป็น"ไคติน" ซึ่งเป็นองค์ประกอบเฉพาะที่ไม่พบในพืชชั้นสูง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงสามารถใช้ไคติเนสไฮโดรไลซ์ไคตินให้เป็นไคโตไบโอสโดยไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ และเนื่องจากไคติเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทำให้ดัดแปลงเพื่อมาใช้ในกระบวนการควบคุมโดยหลักชีวภาพได้ตรงตามเป้าหมายที่วางไว้

ได้มีการนำ *Serratia marcescens* มาควบคุมการติดเชื้อรา พบว่าสามารถลดการติดเชื้อจาก *Sclerotium rolfsii* Sacc. ในพืชได้ถึง 75% อย่างไรก็ตามการใช้ *S. marcescens* ในพืชตระกูลถั่ว สามารถลดการติดเชื้อจาก *Rhizoctonia solani* Kuhn. ได้เพียง 50% และไม่มีผลทำให้ลดการติดเชื้อจาก *Pythium aphani-*

dermatum ในแตงกวา (Ordentlich, *et al.*, 1987 อ้างอิงโดย Shapira *et al.*, 1989)

นอกจากนี้สามารถใช้ไคติเนสเพื่อเตรียมโปรโตพลาส์ของเซลล์พืช เชื้อรา และยีสต์ (Broglie, *et al.*, 1986; Bartinicki-Garcia and Lippman, 1972) จากรายงานของ Yabuki *et al.* (1986) กล่าวว่า ไคติเนสกึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมจากวิธี affinity adsorption ถูกนำมาใช้ร่วมกับ Zymolyase (β-glucanase)ในการเตรียมโปรโตพลาสของ *Aspergillus oryzae* ซึ่งให้ผลที่ดีมาก อย่างไรก็ตามไคติเนสยังมีประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ด้วย เช่น ในทางการแพทย์และเภสัชได้ใช้ไคตินและอนุพันธ์ของไคตินในการรักษาดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยมีไคติเนสเป็นส่วนสำคัญในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไคตินให้ได้ตามความต้องการ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและจำแนกแบคทีเรียจากลูกกุ้ง และตะกอนดินที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนสจากลูกกุ้ง และตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง
3. ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้
4. ศึกษาคุณสมบัติของไคติเนสจากแบคทีเรียที่คัดเลือก

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างในการแยกเชื้อ

1.1 ลูกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricus.)

ใช้ตัวอย่างลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา พี-17 จากฟาร์มเพาะฟักลูกกุ้งของบริษัท ซาโนฟี่แฮทเชอรี จำกัด (Sanofi Hatchery) ต. เสาเภา อ. สิชล จ. นครศรีธรรมราช โดยเก็บในกล่องโฟมที่อุณหภูมิปกติในระหว่างการขนส่ง เมื่อตัวอย่างลูกกุ้งมาถึงห้องปฏิบัติการ นำลูกกุ้งจำนวน 50 ตัวมาบดให้ละเอียดด้วย mortar พร้อมเติม 0.85% NaCl ที่ปราศจากเชื้อลงไป ประมาณ 1 มล. ผสมให้เข้ากัน และนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้สารละลายส่วนใส สำหรับนำไปแยกเชื้อต่อไป

1.2 ตะกอนดิน

ใช้ตะกอนดินจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาที่มีการเลี้ยงกุ้งอยู่ในระยะลอกคราบ ของบริษัทซีคิงส์ฟาร์ม จำกัด ซึ่งตั้งอยู่บริเวณอ่าวปัตตานี อ.เมือง จ.ปัตตานี ขนาด 3-6 ไร่ มีค่าความเค็มระหว่าง 24-32 ส่วนในพัน, อุณหภูมิ 25-34°ซ, มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.6 โดยเก็บตะกอนดินด้วย sediment core จำนวน 2 จุดต่อ 1 บ่อ จุดแรก ณ บริเวณใต้เครื่องตีน้ำซึ่งนับว่ามีการตกตะกอนของสิ่งต่าง ๆ อยู่น้อยที่สุด และจุดที่สอง ณ บริเวณกลางบ่อ ซึ่งมีการตกตะกอนของสิ่งต่าง ๆ อยู่มากที่สุด นำตะกอนดินบริเวณผิวดินชั้นบนหนา 2 ซม. ที่ได้จากทั้งสองจุด มารวมกันในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเก็บลงในกล่องโฟมที่อุณหภูมิปกติในระหว่างการขนส่ง สำหรับนำไปแยกเชื้อทันทีที่ตัวอย่างตะกอนดินมาถึงห้องปฏิบัติการ

2. การเตรียมไคตินและอนุพันธุ์ของไคติน

2.1 Chitin (ตามวิธีของ Jeuniaux, 1986)

นำกระดองปลาหมึกที่บดจนละเอียดด้วยเครื่องบด ปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงใน 1N NaOH ปริมาตร 1900 มล.ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 50°ซ โดยกวนด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วต่ำ ๆ เป็นเวลา 5 ชม. กรองผงตะกอนผ่านผ้ากอซ 4 ชั้น และล้างผงตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง จากนั้นล้างด้วยเมธานอล ตามด้วยอะซิโตน ไคตินที่ได้นำไปอบที่ 50°ซ นาน 15-24 ชม.และผ่านตะแกรงร่อนที่มีตาขนาด 2.00 มม.เพื่อคัดเลือกไคตินที่มีขนาดน้อยกว่า 2.00 มม.มาใช้ในการทดลอง

2.2 Colloidal chitin (ตามวิธีของ West and Cowell, 1984)

ละลายไคตินผง 20 กรัม ใน 50% กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) 600 มล.นำส่วนผสมที่ได้ เติมลงในน้ำขจัดไอออนแล้ว (deionized water) ที่เย็นจัด ปริมาตร 10 ลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วย 10N NaOH เป็นผลให้เกิดตะกอนขึ้น ตั้งส่วนผสมทิ้งไว้ที่ 4°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำส่วนผสมทั้งหมดไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที และล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น โดยการเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเดียวกัน 3 ครั้ง สุดท้ายปรับความเข้มข้นของตะกอนให้ได้ 10% (w/v)

2.3 Swollen chitin (ตามวิธี Soto-Gil and Zyskind, 1984)

ละลายไคตินผง 10 กรัม ใน 85% กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) 100 มล.เก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 48 ชม. นำส่วนผสมที่ได้ไปละลายในบัฟเฟอร์ 1M Tris-HCl (พีเอช 11) เป็นผลให้เกิดตะกอนขึ้น นำไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น โดยการเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเดียวกัน 3 ครั้ง ปรับพีเอชของตะกอนด้วย 1N NaOH จนได้พีเอชเป็น 7.5 นำตะกอนที่ได้ผ่านตะแกรงร่อนที่มีตาขนาด 2.00 มม.เก็บเฉพาะตะกอนที่มีขนาดเล็กกว่า 2.00 มม.มาปรับให้มีความเข้มข้น 30% (w/v)

2.4 Glycol chitin (ตามวิธีของ De-Bolle, *et al.*, 1991)

ในการเตรียมต้องเตรียมจาก glycol chitosan โดยละลาย glycol chitosan 1 กรัม ใน 20 มล.ของ 10% กรดอะซิติก และตั้งทิ้งไว้ทั้งคืนที่ 22°ซ นำสารละ-

ลายที่ได้มาเติมเมธานอล 90 มล.และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ส่วนที่ผ่านการกรองถูกนำไปผสมกับ acetic anhydride 1.5 มล.แล้วตั้งทิ้งไว้ 10-30 นาที จนก่อเป็นรูปเจล ตัดเจลเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผสมกับเมธานอล และทำการบดละเอียดด้วยเครื่องบด นำไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้ละลายในเมธานอล ทำการเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเดียวกัน สุดท้ายนำส่วนตะกอนที่ได้ละลายในน้ำ 100 มล.

3. จุลินทรีย์

ใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการทดลอง เก็บรักษาเชื้อบนหลอดอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar (NA) โดยเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4°ซ และถ่ายโอนเชื้อทุก ๆ 2 เดือน

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ประกอบด้วย peptone 5.0 กรัม, beef extract 3.0 กรัม, yeast extract 1.0 กรัม และ glucose 5.0 กรัม,ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารเหลว Nutrient broth + 0.3% chitin (NB+C) ประกอบด้วย chitin 3.0 กรัม ในอาหารแบบเหลว NB 1.0 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารเหลว Nutrient broth + 0.3% colloidal chitin (NB+CC) ประกอบด้วย colloidal chitin 30.0 มล. ในอาหารแบบเหลว NB 1.0 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารเหลว Minimal medium + 0.3% colloidal chitin (MM+CC) (Reichenbach and Dworkin, 1981)ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 กรัม, KH_2PO_4 0.7 กรัม, Na_2HPO_4 1.1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 2.0 กรัม, $MnSO_4$ 0.01 กรัม, $FeSO_4$ 0.10 กรัม และ Colloidal chitin 30.0

มล.ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ แบบอาหารแข็ง Nutrien agar (NA) ประกอบด้วย อาหารแบบเหลว NB 1.0 ลิตร ซึ่งมีวุ้น 15.0 กรัม

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus รุ่น CH-2
- ตู้อบ ของ Heraeus
- ตู้บ่มเชื้อ ของ WTE.Binder
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Milton roy รุ่น spectronic 21D
- เครื่องเหวี่ยง ของ Sigma รุ่น 2K15
- เครื่องเหวี่ยง ของ Kokusan รุ่น CH-1200B
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ของ Labline รุ่น Orbit
- เครื่องฉายแสงอุลตร้าไวโอเล็ต ของ UVP
- ชุดสำหรับทำอิเลคโตรโฟริซีส แบบ slab gel ของ ATTO corporation
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ของ BIO-RAD รุ่น 1000/500
- เครื่องวัดพีเอช ของ Activon รุ่น 109
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของ Precisa รุ่น Junior 2000 C
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius
- เตาอบไมโครเวฟ ของ Singer รุ่น MW-1100
- ตะแกรงร่อนตาขนาด 1.00 มม.และ 2.00 มม.ของ Endecotts

วิธีการ

1. การแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกกุ้งและตะกอนดินที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

1.1 การแยกเชื้อ

1.1.1 นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากลูกกุ้ง ซึ่งเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 11 มิ.ย. 2536 ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายส่วนใสขึ้นมา 1 มล.ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล.ปริมาตร 100 มล.เขย่าที่ 25°ซ 200 รอบต่อนาที

สำหรับตัวอย่างตะกอนดิน เติมประมาณ 10 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล.ปริมาตร 100 มล.โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันในแต่ละครั้งของตัวอย่างตะกอนดินที่เก็บอยู่ใน ช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม 2536 เพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายในการแยกจุลินทรีย์ให้ได้มากที่สุด โดยในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ครั้งนี้ ส่วนหนึ่งเป็นงานของโครงงานนักศึกษาปริญญาตรีคณะวิทยาศาสตร์ (สายใจ ปานวิเชียร, 2536)

ครั้งที่ 1 เก็บตัวอย่างตะกอนดิน เมื่อวันที่ 21 เม.ย. 2536 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC เขย่าที่ 25°ซ และ 37°ซ 200 รอบต่อนาที

ครั้งที่ 2 เก็บตัวอย่างตะกอนดิน เมื่อวันที่ 28 มิ.ย. 2536 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC เขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที

ครั้งที่ 3 เก็บตัวอย่างตะกอนดิน เมื่อวันที่ 1 ก.ค. 2536 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC และ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC+0.5% NaCl บ่มที่ 37°ซ โดยไม่เขย่า

ครั้งที่ 4 เก็บตัวอย่างตะกอนดิน เมื่อวันที่ 6 ก.ค. 2536 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC เขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที

ครั้งที่ 5 เก็บตัวอย่างตะกอนดิน เมื่อวันที่ 13 ก.ค.2536 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC และ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MM+CC+0.5% NaCl บ่มที่ 37°ซ โดยไม่เขย่า

1.1.2 เมื่อพบการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1 (โดยสังเกตจากความขุ่น) ใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อที่ได้ปริมาณเต็ม loop แล้วเกลี่ยเชื้อลงไปในจานอาหาร NA บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้นี้ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37°ซ

1.1.3 แยกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างแตกต่างกัน มาเลี้ยงในจานอาหาร NA เมื่อเจริญจะทำการย้ายแบคทีเรียลงไปในจานอาหาร NA ใหม่อีก ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนสามารถแยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นเอียง NA

1.2 การจำแนกเชื้อ

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์แยกได้ทั้งหมดมาจำแนกออกเป็นกลุ่ม ส่วนแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนส มาจำแนกหาสายพันธุ์ถึงระดับสกุล (genus) ตามวิธีของ MacFaddin, 1980 (ภาคผนวก ข.)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนส

2.1 <u>วิธีคัดเลือก โดยทดสอบการสร้างสารเรืองแสงเนื่องจาก การย่อยสลายสาร 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide [4MUF.GlcNAc] ตามวิธีของ O'Brien และ Cowell (1987)</u>

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบมาป้ายลงบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่แบ่งพื้นที่ออกเป็นช่อง ๆ ละ 1 สายพันธุ์ จากนั้นหยด 4MUF.GlcNAc reagent (ภาคผนวก ก.1) 20 ไมโครโมล ทับบริเวณที่มีการป้ายแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ไว้แล้ว นำแผ่นกระดาษกรองที่ได้นี้ไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น หยดสาร Sodium bicarbonate ที่อิ่มตัว ทับอีกครั้งหนึ่ง

สำหรับชุดควบคุมที่อยู่บนแผ่นกระดาษกรองแผ่นเดียวกัน ประกอบด้วย การป้ายแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบแต่หยดทับด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer พีเอช 7.4 (c) (ภาคผนวก ก. 2) ตรวจผลการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร คิดเป็นผลบวก เมื่อพบการเรืองแสงในแต่ละเชื้อแบคทีเรียในชุดที่หยด 4MUF.GlcNAc reagent แต่ไม่พบในชุดควบคุม ในการทดสอบให้ใช้จุลินทรีย์ที่ทราบแน่ชัดว่าให้ผลตรวจสอบเป็นลบ (ในที่นี้ คือ *Escherichia coli*) แทนแบคทีเรียที่ต้องการ

ตรวจสอบ และการหยด 4MUF.GlcNAc reagent เพียงอย่างเดียวเข้าประกอบด้วย ดังนี้

E. coli	*E. coli*(c)
เชื้อที่แยกได้....	เชื้อที่แยกได้....(c)
เชื้อที่แยกได้....	เชื้อที่แยกได้....(c)
เชื้อที่แยกได้....	เชื้อที่แยกได้....(c)
4MUF.GlcNAc reagent	

2.2 วิธีคัดเลือก โดยทดสอบการสร้างบริเวณใส (clear zone) บนอาหารที่มีไคตินเป็นสับสเตรท ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Monreal และ Reese (1969)

เตรียมจานอาหาร NA ที่ปราศจากเชื้อไว้ แล้วเททับด้วย 3.0% วุ้น 6 มล.และ 30.0% swollen chitin 4 มล. ที่หลอมละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อชั้นบนที่เพิ่งเทไว้แข็งตัว โอนถ่ายแบคทีเรียที่แยกได้ลงไปและนำจานอาหารที่ได้นี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลทุกวันโดยสังเกตการเกิดบริเวณใสบนจานอาหาร

2.3 วิธีคัดเลือกโดยทดสอบค่ากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไคติเนส

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 100 มล.ปริมาตร 50 มล.เขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นปิเปตเชื้อเริ่มต้นที่ได้ในปริมาณ 1.0% ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+CC และ NB+C ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล.ปริมาตร 100 มล. เพาะเชื้อ โดยเขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. ทำการเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสไปหาค่ากิจกรรมของไคติเนสต่อไป

2.3.1 ทดสอบจากปริมาณของ GlcNAc ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Jeuniaux (1986)

ทำโดยบ่มส่วนใสที่ได้จากการแยกเซลล์ 0.10-2.00 มล. และเอนไซม์ไคโตไบเอส 1 มล. กับสับสเตรทคือ chitin suspension (ภาคผนวก ก.3) 1.00 มล. ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.6 mM citric acid-1.2 M Na_2HPO_4) พีเอช 5.1 (ภาคผนวก ก.4) 1.00 มล. และปรับปริมาตรรวมด้วยน้ำกลั่นเป็น 4.00 มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลานาน 3.00 ชม. ปั่นแยกอีกครั้งเอาเฉพาะส่วนใส 1.50 มล. มาหาปริมาณ GlcNAc ตามวิธีของ Jeuniaux (1986) โดยผสมกับ 0.8 M $Na_2B_4O_7$ 0.1 มล. (ภาคผนวก ก.5) 2.00 มล. นำไปต้มเดือดนาน 3 นาที วางให้เย็นแล้วเติม DMAB solution (ภาคผนวก ก.6) 3 มล. นำไปวางที่ 37°ซ นาน 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตร (รูปภาคผนวก 1) โดยใช้น้ำตาล GlcNAc เป็นสารละลายมาตรฐาน ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีหลอดควบคุม 2 ชนิดคือ หลอดที่ 1 ใช้บัฟเฟอร์แทนส่วนใส และหลอดที่ 2 มีสารละลายทุกอย่างเช่นเดียวกับหลอดปฏิกิริยาแต่นำไปต้มทันทีนาน 10 นาที นำผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตร (ΔO.D) ที่ได้จากหลอดที่ 2 และหลอดปฏิกิริยาไปอ่านค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวนเป็นจำนวนหน่วยของเอนไซม์

2.3.2 ทดสอบจากปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Tsujibo และคณะ (1991)

ทำโดยบ่มส่วนใสที่ได้จากการแยกเซลล์ 0.20 มล.กับ สับสเตรทคือ 10% colloidal chitin 0.20 มล.ในสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl) พีเอช 7.5 (ภาคผนวก ก.7) 7.60 มล. ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลานาน 20 นาที ปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนใส 1.50 มล.มาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Tsujibo และคณะ (1991) โดยผสมกับ Schales reagent (ภาคผนวก ก.8) 2.00 มล. นำไปต้มเดือดนาน 15 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร (รูปภาคผนวก 2)โดยใช้น้ำตาล GlcNAc เป็นสารละลายมาตรฐาน ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีหลอดควบคุม 2 ชนิดคือ หลอดที่ 1 ใช้บัฟเฟอร์แทนส่วนใส และหลอดที่ 2 มีสารละลายทุกอย่างเช่นเดียวกับหลอดปฏิกิริยา แต่นำไปต้มทันทีนาน 10 นาที นำผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร (ΔO.D)

ที่ได้จากหลอดที่ 2 และ หลอดปฏิกิริยาไปอ่านค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.1) นำค่าที่ได้ มาคำนวนเป็นจำนวนหน่วยของเอนไซม์

โดย 1 หน่วย คือ ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาล GlcNAc 1 ไมโครโมลในเวลา 1 ชม. ภายใต้วิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐานและค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสคำนวนได้จากหน่วยของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (1976) และเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากกราฟที่ใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ค. 2)

3. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้**

3.1 <u>ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส</u>

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่แตกต่างกันคือ NB, NB+C และ NB+CC ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาภส์ขนาด 250 มล.ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม.เปรียบเทียบโดยหากิจกรรมของไคติเนสจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารแบบเหลวทั้งสามสูตร

3.2 <u>ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส</u>

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (จากข้อ 3.1) ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาภส์ขนาด 1000 มล.ปริมาตร 250 มล.เขย่าที่ 37°ซ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. และทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ทุก ๆ 5 ชั่วโมง จนกระทั่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ มีแนวโน้มลดลง

4. **คุณสมบัติของไคติเนส**

เตรียมสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารแบบเหลวที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.1) ปริมาตร 500 มล.ในระยะเวลาที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.2) จากนั้นเตรียมสารละลายส่วนใส โดยได้จากการเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยความเร็ว 8000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ให้สารละลายมีความอิ่มตัวสุดท้ายเป็น 20.0% - 80.0% แล้วนำตะกอนโปรตีนที่ได้ มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl พีเอช 7.5 บรรจุสารละลายนี้ลงในถุงไดอะไลซ์ ที่ยอมให้สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 12,000 Da เท่านั้นผ่านได้ และทำการไดอะไลซ์ในบัฟเฟอร์เดียวกันปริมาตรมากเป็นเวลา 10-24 ชม.ที่อุณหภูมิ 4°ซ นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้ว มาตรวจสอบค่ากิจกรรมของไคติเนส ตะกอนโปรตีนที่ไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะทิ้งไป และเก็บเฉพาะตะกอนโปรตีนที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

4.1 <u>พีเอชที่เหมาะสม</u>

โดยให้สารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ทำปฏิกริยากับสับสเตรทในบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ตั้งแต่ พีเอช 3.0-12.0 โดย พีเอช 3.0-7.0 ใช้ McIlvaine buffer (0.1 M citric acid-0.2 M Na_2HPO_4) (ภาคผนวก ก.9), พีเอช 8.0 ใช้ 50 mM Tris-HCl buffer และพีเอช 9.0-12.0 ใช้ 50 mM Glycine-NaOH buffer (ภาคผนวก ก.10)

4.2 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

โดยให้สารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในพีเอชที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, และ 70°ซ ในการวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

4.3 <u>ความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ</u>

โดยอุ่นสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, และ 70°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ อุณหภูมิ และพีเอชเหมาะสม

4.4 <u>การตรวจสอบแบบแผนของไคติเนสโดยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโพรีซิส ตามวิธีของ Pan และคณะ (1991)</u>

นำสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ มาหยอดบนโพลีอะคริละไมด์เจลความเข้มข้น 12% (ภาคผนวก ก.11) และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 mA เพื่อทำการแยกโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายออกเป็นแถบตามขนาดของโปรตีนเป็นเวลาประมาณ 3-4 ชม.แผ่นเจลที่ได้นำไป

แช่ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ก.12) 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลที่ประกอบด้วย 7.5% acrylamide และ 0.04% glycol chitin ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ก.13) ปิดทับบนแผ่นเจลที่ได้ทำการแยกโปรตีนให้สนิท นำแผ่นเจลทั้งสอง ที่อยู่ในลักษณะประกบกันเช่นนี้ไปบ่มที่ 40°ซ เป็นเวลา 1.5 ชม.ภายใต้สภาวะที่มีความชื้นสูง

เมื่อครบเวลา แยกแผ่นเจลชั้นบนไปแช่ใน 0.01% (w/v) fluorescent brightener 28 ในบัฟเฟอร์ 0.5 M Tris-HCl พีเอช 8.9 (ภาคผนวก ก.14) เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำกลั่นโดยตั้งทิ้งไว้ทั้งคืนในตู้เย็นตามลำดับ ตรวจดูแถบของเอนไซม์ในแผ่นเจลชั้นบนที่ได้ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต ส่วนแผ่นเจลชั้นล่างหรือแผ่นเจลที่ได้ทำการแยกโปรตีน นำมาศึกษาแถบโปรตีนโดยแช่ในสารละลาย staining (ภาคผนวก ก.15) 2 ชม. และ แช่ในสารละลาย destaining (ภาคผนวก ก.16) 24 ชม.ขึ้นไปตามลำดับ

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากลูกกุ้งและตะกอนดินที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้ง

1.1 <u>แบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้ง</u>

เมื่อแยกเชื้อโดยทำการเลี้ยงบนจานอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24-48 ชม.ในระยะแรกจะปรากฏมีจุลินทรีย์ขึ้นปะปนในจานอาหารมาก รวมทั้งบางจานอาหารมีเชื้อราปนอยู่ด้วย จึงได้ทำการแยกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันลงในจานอาหารใหม่และทำซ้ำอยู่หลายครั้ง จนในที่สุดสามารถแยกจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างกัน 11 สายพันธุ์ คือ CP1-CP11 แต่ในระหว่างการทดลองซึ่งแม้จะมีการเก็บและถ่ายเชื้อจุลินทรีย์อยู่เป็นประจำ ปรากฏว่าจุลินทรีย์ CP3 และ CP11 ได้ตายไป

*นำจุลินทรีย์ที่แยกได้ข้างต้นมาย้อมติดสีด้วยวิธีของแกรม เพื่อดูรูปร่างและแยกประเภทตามการติดสีของจุลินทรีย์ ได้ผลปรากฏในตาราง 5 พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างกลม (cocci) ในขั้นต้นได้ทำการแยกสายพันธุ์คร่าว ๆ โดยทดสอบ การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส และ ทดสอบผลในอาหารเอียง TSI ทำให้สามารถจัดประเภทได้ตามวิธีของ MacFaddin (1980) (ในตาราง 5)

1.2 <u>แบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง</u>

แบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้งของบริษัท ซีคิงส์ฟาร์ม จำกัด ที่เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนเมษายน-กรกฎาคม 2536 และนำตัวอย่างตะกอนดินที่ได้ มาเลี้ยงในอาหารและสภาวะที่แตกต่างกัน ซึ่งในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ครั้งนี้ส่วนหนึ่งเป็นงานของโครงงานนักศึกษาปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ (สายใจ ปานวิเชียร, 2536) นั้น พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งสิ้น 57 สายพันธุ์ (CS1-CS57) (ตาราง 6) และในระหว่างการทดลองปรากฏว่าจุลินทรีย์ CS1, CS6, CS24, CS29, CS54 และ CS55 ได้ตายไป จึงเหลือให้ทำการศึกษาต่อเพียง 51 สายพันธุ์

ตาราง 5 คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้ง

Group	Gram stain, Morphology	Oxidase	TSI	Isolates	Probable Genus
1	-, bacilli	-	K/K	CP2, CP5 CP7, CP9 CP10,	*Acinetobacter*, *Bordetella*
2	-, bacilli	+	A/A	CP1, CP3 CP4, CP6 CP8,	*Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*
3	-, bacilli	+	K/K	CP11	*Alcaligenes*, *Pseudomonas*

K/K = ข้างบนหลอดมีสีแดง/ข้างล่างหลอดมีสีแดง

A/A = ข้างบนหลอดมีสีเหลือง/ข้างล่างหลอดมีสีเหลือง

ตาราง 6 จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MH+CC ภายใต้สภาวะแตกต่างกัน

วันที่เก็บตัวอย่าง	อาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยง						หมายเลขจุลินทรีย์ที่แยกได้
	อุณหภูมิ		เขย่า	ไม่เขย่า	อาหาร MH+CC	อาหาร MH+CC+ 0.5%NaCl	
	25°ซ	37°ซ					
21เม.ย.2536	x	x		x	x		CS1-CS14
28 มิ.ย.2536		x		x	x		CS15-CS18
1 ก.ค. 2536		x		x	x		CS22-CS24 CS27-CS29
		x		x		x	CS19-CS21 CS25,CS26
6 ก.ค. 2536		x	x		x		CS48-CS57
13 ก.ค.2536		x		x	x		CS30-CS36 CS40-CS44
		x		x		x	CS37-CS39 CS45-CS47

จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดที่ได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างกลม (cocci) และเป็นแท่ง (bacilli) ส่วนผลการทดสอบทางชีวเคมีบางอย่าง สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้อย่างกว้าง ๆ ตามตาราง 7 ซึ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่จำแนกได้ทั้งหมดเมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Alcaligenes* หรือ *Pseudomonas* 50.88%; กลุ่ม *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio* 21.01%; กลุ่ม *Neisseria* หรือ *Branhamella* 14.04%; กลุ่ม *Bordetella* หรือ *Acinetobacter* 5.26%; กลุ่ม *Staphylococcus* หรือ *Micrococcus* 1.75% และที่ไม่สามารถจัดจำแนกแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 7.02%

แบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละครั้ง พบว่ามีความหลากหลายของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (ตาราง 6-ตาราง 7) เช่น แบคทีเรียที่แยกได้ในวันที่ 12 เม.ย. 2536 คือ CS1-CS14 พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม 2, 3, 4, 5, และ 6 (ตาราง 7) ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้ในวันที่ 1 ก.ค.2536 คือ CS19-CS29 พบว่าสายพันธุ์เกือบทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม 5 ยกเว้น CS2 อยู่ในกลุ่ม 2 และCS29 อยู่ในกลุ่ม 6 (ตาราง 7) ดังนั้นนอกเหนือจากการใช้สภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันในการแยกเชื้อ จะมีผลให้ได้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่หลากหลายแล้ว สภาวะของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญเติบโตของกุ้งซึ่งเกิดจากการปรับสภาพบ่อ ประเภทของอาหารที่ใช้เลี้ยง หรือของเสียจากการขับถ่ายของกุ้ง และสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ภูมิอากาศ อาจมีผลทำให้การกระจายตัวของจุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างที่เป็นตะกอนดิน ทำให้ได้ตะกอนดินที่ไม่จำเป็นต้องมีองค์ประกอบเดียวกันทุกครั้งไป

* สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย CS30, CS34 และ CS41 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนสสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ (ผลจากการทดลองในหัวข้อ 2) มีคุณสมบัติต่าง ๆ ในตาราง 8 เมื่อเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol.1 (Krieg and Holt, 1984) พบว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์นี้คือ *Aeromonas* sp.

ตาราง 7 คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง

Group	Gram stain ,Morphology	Catalase	Oxidase	TSI	Isolates	Probable Genus
1	+, cocci	+	–	A/A	CS40	*Staphylococcus*, *Micrococcus*
2	-, cocci	+	V	V	CS12,CS15 CS16,CS20 CS31,CS35 CS52,CS57	*Neisseria*, *Branhamella*
3	–, bacilli	ND	–	K/K	CS 5,CS36 CS53	*Acinetobacter*, *Bordetella*
4	-, bacilli	ND	+	A/A	CS 1,CS55 CS 2,CS13 CS 8-CS11 CS30,CS34 CS41,CS48	*Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*

ตาราง 7 (ต่อ)

Group	Gram stain +Morphology	Catalase	Oxidase	TSI	Isolates	Probable Genus
5	-, bacilli	ND	+	K/K	CS 3 CS 4,CS 6 CS 7,CS14 CS17-CS19 CS21-CS28 CS32-CS33 CS37-CS39 CS42-CS47 CS49,CS56	*Alcaligenes*, *Pseudomonas*
6	-, bacalli	ND	+	A/K	CS29,CS50 CS51,CS54	Unidentified group

ND = ไม่ได้ทำการวัด (Not determine)

V = ค่าผันแปรได้ (Variable)

K/K = ข้างบนหลอดมีสีแดง/ข้างล่างหลอดมีสีแดง

A/A = ข้างบนหลอดมีสีเหลือง/ข้างล่างหลอดมีสีเหลือง

A/K = ข้างบนหลอดมีสีเหลือง/ข้างล่างหลอดมีสีแดง

หมายเหตุ แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบ พบว่าไม่มีการผลิตแก๊สในอาหาร TSI ยกเว้น CS12,CS13, ส่วน CS3,CS4,CS7,CS9,CS32,CS48 ผลิตแก๊ส H_2S

ตาราง 8 คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรีย CS30, CS34 และ CS41เพื่อจัดจำแนกสกุล

Characteristics	CS30	CS34	CS41
Morphological			
Form	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Motility	Motile	Motile	Motile
Spore formation	-	-	-
Gram stain	Negative	Negative	Negative
Biochemical			
Oxidase test	+	+	+
TSI test	A/A	A/A	A/A
H_2S production	-	-	-
Indole test	+	+	+
M-R test	+	+	+
V-P test	-	-	-
O-F test	O/F	O/F	O/F
Starch hydrolysis	+	+	+
Decarboxylase test			
Arginine	+	+	+
Lysine	-	-	-
Acid production-from sugar			
Manitol	+	+	+
Inositol	-	-	-

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนส

จากแบคทีเรียที่แยกได้ในหัวข้อ 1.1 และ 1.2 ทั้งสิ้น 68 สายพันธุ์ ตายไปเสีย 8 สายพันธุ์ที่เหลืออีก 60 สายพันธุ์ ถูกนำมาทำการสำรวจเบื้องต้น (primary screening) ว่ามีแบคทีเรียใดบ้างที่ผลิตไคติเนส วิธีการที่ใช้ต้องเป็นวิธีที่สะดวกต่อการสำรวจจากแบคที-เรียตัวอย่าง ครั้งละมาก ๆ และให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ โดยทั่วไปมักดูจากการทำให้เกิดบริเวณใสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในจานอาหารที่มีไคตินเป็นสับสเตรท ซึ่งวิธีนี้เป็นการตรวจสอบผลที่เกิดจากไคติเนสโดยตรง เพราะไคติเนสไปย่อยไคตินในจานอาหารทำให้อาหารซึ่งมีลักษณะขุ่นกลับใสขึ้น แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดคือ ต้องเตรียมอาหารโดยให้มีไคตินในปริมาณที่เหมาะ-สม มิฉะนั้นจะมองเห็นบริเวณใสไม่ชัดเจน และยังเป็นวิธีที่มีความไวต่ำ คือ แบคทีเรียที่ผลิตไคติเนสในปริมาณน้อย หรือเป็นไคติเนสที่มีความว่องไวต่ำก็จะทำให้บริเวณใสเกิดขึ้นได้ช้า บางสายพันธุ์อาจใช้เวลานาน 7-10 วัน ซึ่งการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนาน ๆ มักมีปัญหาเรื่องมีจุลินทรีย์อื่นขึ้นปะปน ผู้ทำการวิจัยจึงหันมาใช้วิธีทดสอบการสร้างสารเรืองแสงเป็นการสำรวจเบื้องต้น แบคทีเรียที่ให้ผลบวกโดยวิธีนี้ จะถูกนำมาทดสอบซ้ำว่าสามารถทำให้เกิดบริเวณใสด้วยหรือไม่ ทั้งนี้เพราะการเกิดสารเรืองแสงมิได้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากไคติเนสโดยตรง ซึ่งจะได้อธิบายต่อไปในหัวข้อที่ 2.1 เมื่อได้แบคทีเรียที่ให้ผลบวกในการสำรวจเบื้องต้น ก็นำแบคทีเรียเหล่านั้นมาทดสอบค่ากิจกรรมของไคติเนสโดยละเอียด ก็จะทำให้ทราบแน่นอนว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดมีค่ากิจกรรมของไคติเนสสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับการสำ-รวจครั้งแรก แล้วได้ผลสอดคล้องกันอย่างไร

2.1 <u>วิธีคัดเลือกโดยทดสอบการสร้างสารเรืองแสงเนื่องจากการย่อยสลาย 4MUF-GlcNAc</u>

วิธีการนี้เป็นการตรวจสอบความสามารถในการผลิตไคติเนสของแบคทีเรียโดยทางอ้อม ในวิถีการสลายไคตินนอกจากไคติเนสแล้ว ยังมีเอนไซม์อีกชนิดที่มีความสำคัญ คือ ไคโตไบเอส เป็นเอนไซม์ที่อยู่ระหว่างเยื่อเซลล์ มีหน้าที่สลายไคโตไบโอส ซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่เกิดจากการสลายไคตินโดยไคติเนส (ดังรูป 2) จุลินทรีย์ใดผลิตไคโตไบเอสย่อมสามารถผลิตไคติเนสด้วย (O'Brien and Cowell, 1987) ด้วยหลักการเช่นนี้ เราจึงทำการ

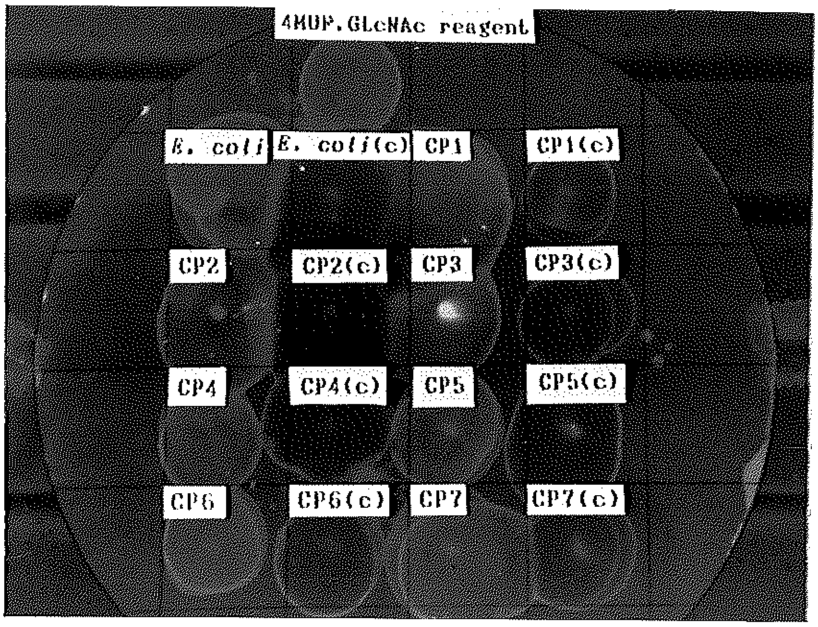
สำรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดโดยดูผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของไคโตไบเอส

ปฏิกิริยาของไคโตไบเอส สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยการให้ไคโตไบเอสย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสง คือ 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (4MUF.GlcNAc) ซึ่งเมื่อถูกตัดด้วยไคโตไบเอสจะได้สาร methylum belliferone ออกมาซึ่งจะเรืองแสงเมื่อส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร การเรืองแสงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ หรือความว่องไวของไคโตไบเอส

รูป 3-11 เป็นผลที่ได้จากการทดสอบด้วย 4MUF.GlcNAc reagent กลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้ง (CP) มีเพียงสายพันธุ์ CP3 ที่ให้การเรืองแสงสูงสุด (รูป 3) ส่วนกลุ่มแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินบ่อเลี้ยงกุ้ง (CS) ที่ให้การเรืองแสงสูงคือ CS30, CS34, CS41, CS51, CS56 และ CS48 กลุ่มที่ให้การเรืองแสงปานกลางคือ CS36 CS57 และกลุ่มที่เรืองแสงเล็กน้อยคือ CS3, CS4, CS7, และ CS13 นอกเหนือไปจากนี้ พบว่าไม่มีการเรืองแสงเลย

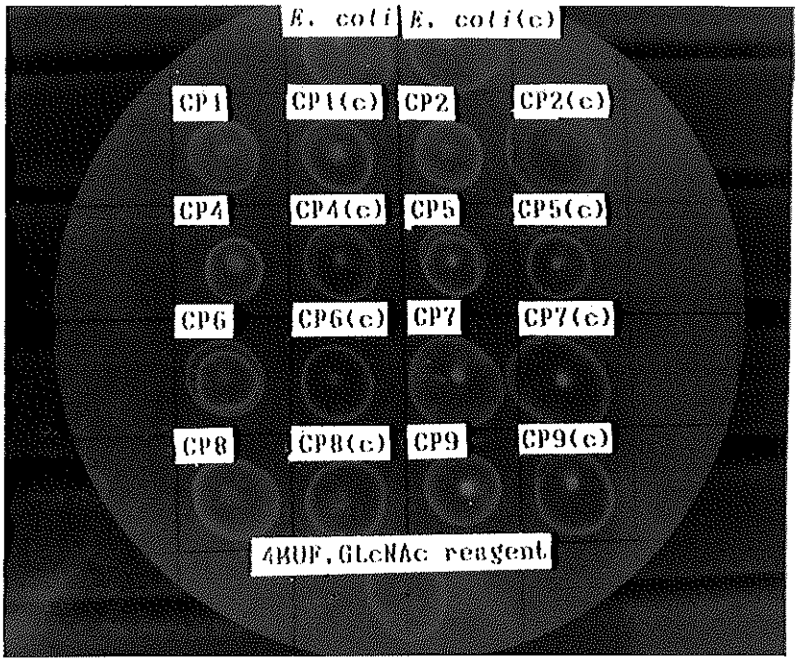
แบคทีเรียทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio* 6 สายพันธุ์ คือ CP3, CS13, CS30, CS34, CS41, CS48; กลุ่ม *Alcaligenes* หรือ *Pseudomonas* 4 สายพันธุ์ คือ CS3, CS4, CS7, CS56; กลุ่ม *Neisseria* หรือ *Branhamella* 1 สายพันธุ์ คือ CS57; กลุ่ม *Bordetella* หรือ *Acinetobacter* 1 สายพันธุ์ คือ CS36; และอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ 1 สายพันธุ์ คือ CS51 (จากตาราง 7)

อย่างไรก็ตาม ความเข้มที่ได้จากการเรืองแสงของแบคทีเรียทั้ง 13 สายพันธุ์นี้ยังไม่สามารถระบุได้เลยว่า ตัวใดมีไคโตไบเอสสูงสุด เนื่องจากในการป้ายเชื้อแบคทีเรียมาเพื่อทำการทดสอบแต่ละครั้งไม่สามารถควบคุมให้มีปริมาณของเชื้อเท่ากันได้แต่เมื่อทดลองทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งก็พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CS41 น่าจะมีความเรืองแสงสูงสุด



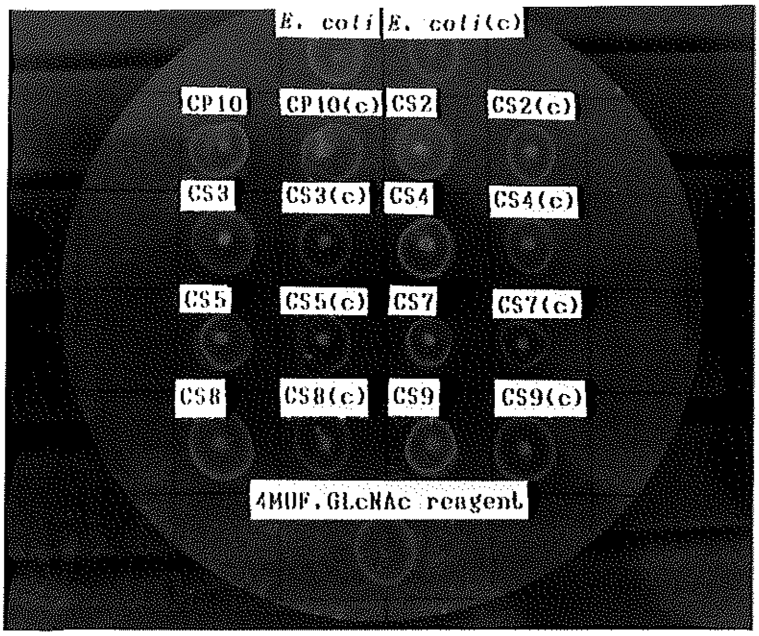
แบคทีเรีย	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7
การเรืองแสง	-	-	++++	-	-	-	-

รูป 3 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP1-CP7 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



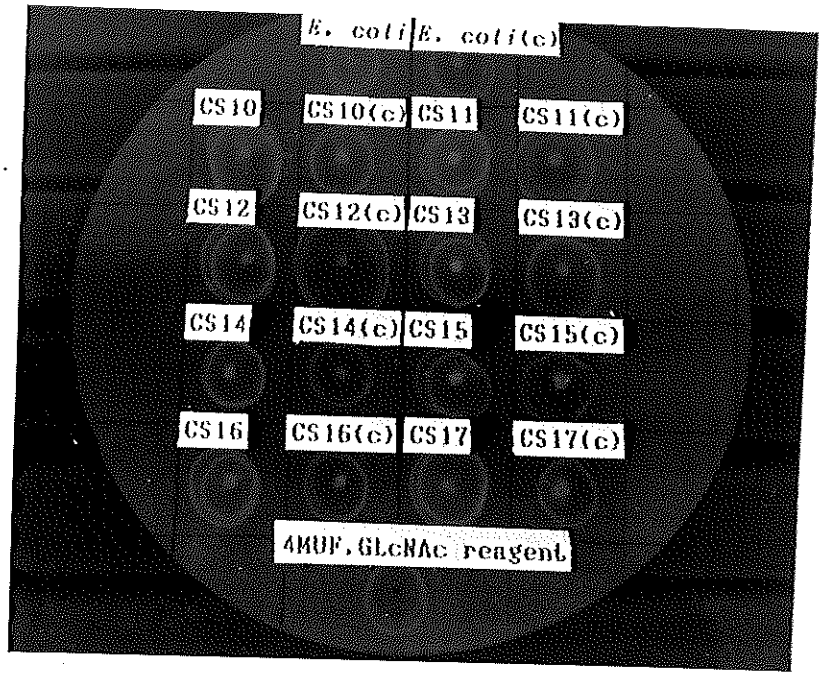
แบคทีเรีย	CP1	CP2	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9
การเรืองแสง	-	-	-	-	-	-	-	-

รูป 4 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP1, CP2 และ CP4-CP9 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



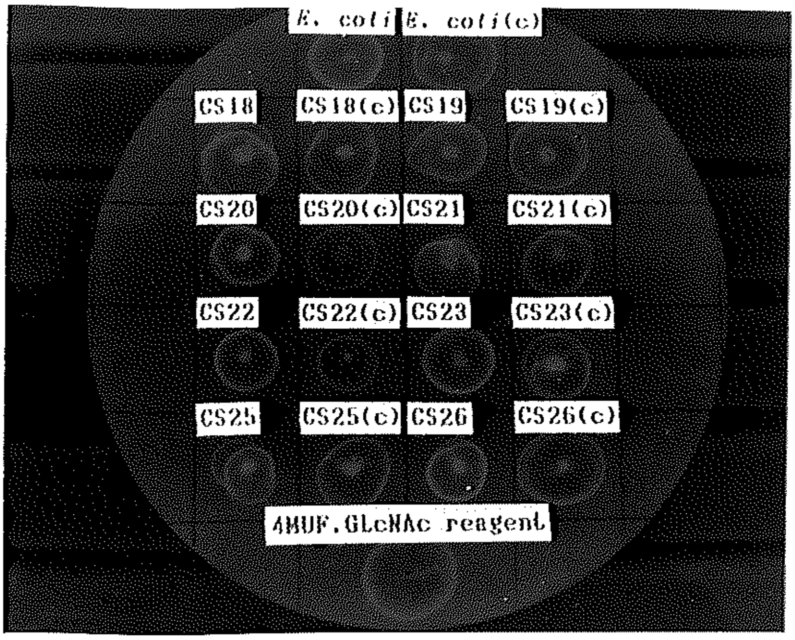
แบคทีเรีย	CP10	CS2	CS3	CS4	CS5	CS7	CS8	CS9
การเรืองแสง	-	-	+	+	-	+	-	-

รูป 5 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CP10, CS2-CS5 และ CS7-CS9 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatmanเบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



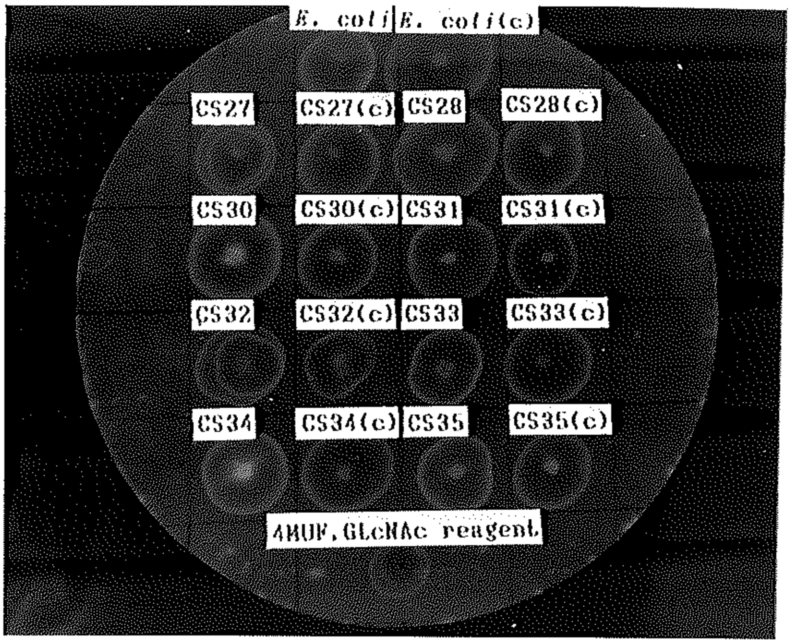
แบคทีเรีย	CS10	CS11	CS12	CS13	CS14	CS15	CS16	CS17
การเรืองแสง	-	-	-	+	-	-	-	-

รูป 6 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS10-CS17 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



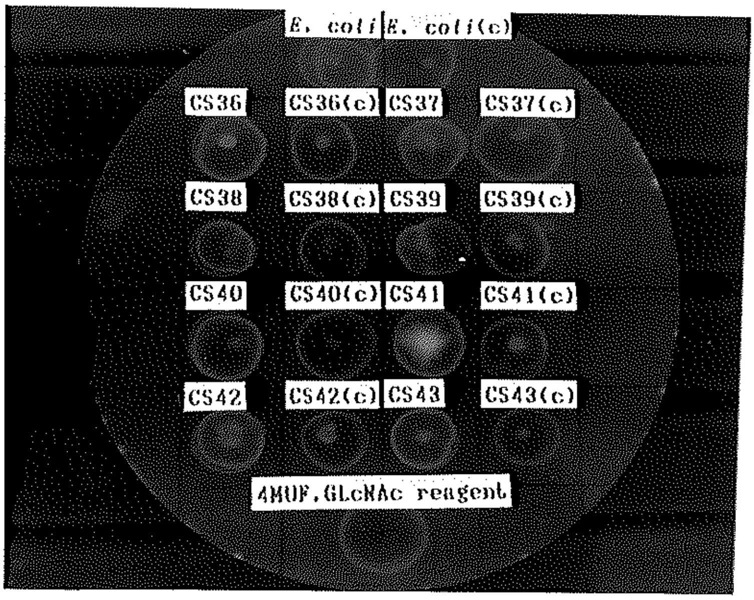
แบคทีเรีย	CS18	CS19	CS20	CS21	CS22	CS23	CS25	CS26
การเรืองแสง	-	-	-	-	-	-	-	-

รูป 7 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS18-CS23, CS25 และ CS26 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



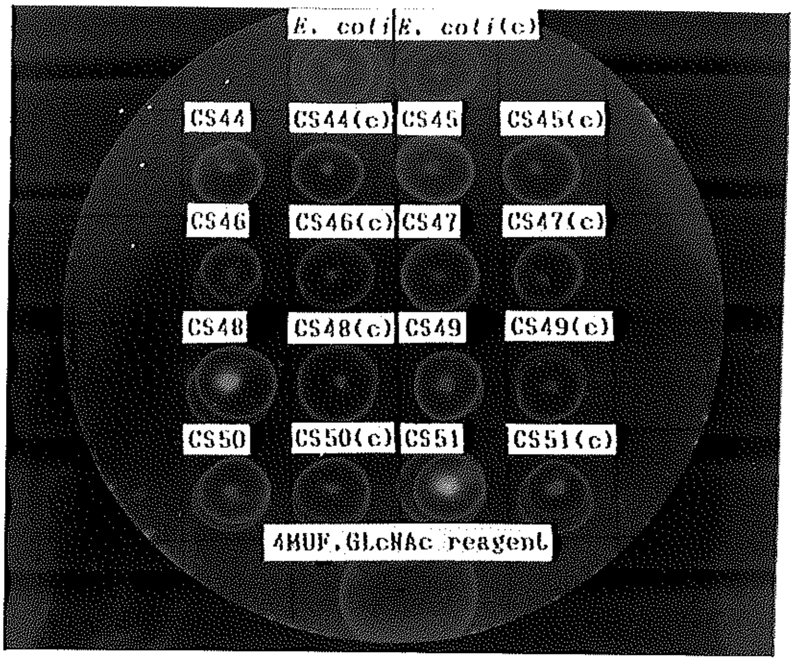
แบคทีเรีย	CS27	CS28	CS30	CS31	CS32	CS33	CS34	CS35
การเรืองแสง	-	-	+++	-	-	-	+++	-

รูป 8 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS27, CS28 และ CS30-CS35 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



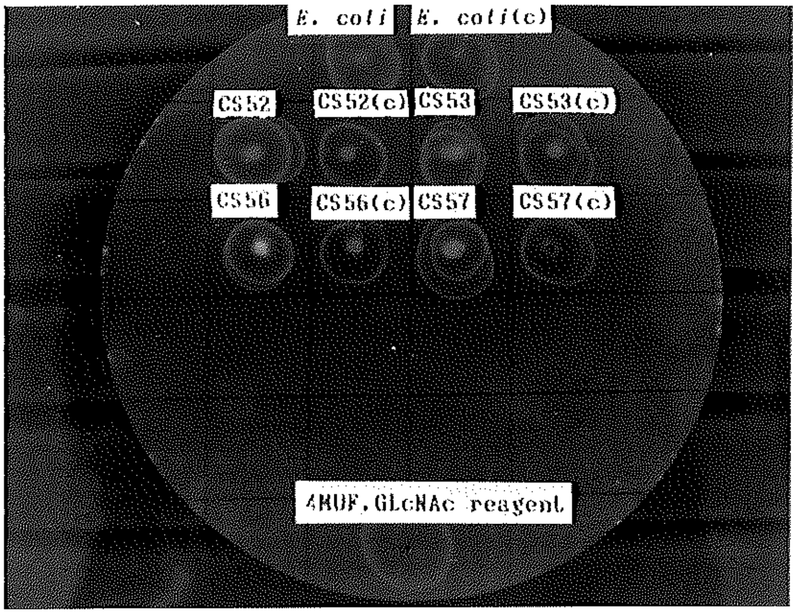
แบคทีเรีย	CS36	CS37	CS38	CS39	CS40	CS41	CS42	CS43
การเรืองแสง	++	-	-	-	-	++++	-	-

รูป 9 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS36-CS43 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



แบคทีเรีย	CS44	CS45	CS46	CS47	CS48	CS49	CS50	CS51
การเรืองแสง	-	-	-	-	+++	-	-	+++

รูป 10 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS44-CS51 ย่อย สับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร



แบคทีเรีย	CS52	CS53	CS56	CS57
การเรืองแสง	-	-	+++	++

รูป 11 สารเรืองแสง Methylumbelliferone ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS52, CS53 CS56 และ CS57 ย่อยสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์เรืองแสงคือ 4 MUF.GlcNAc บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ 366 นาโนเมตร

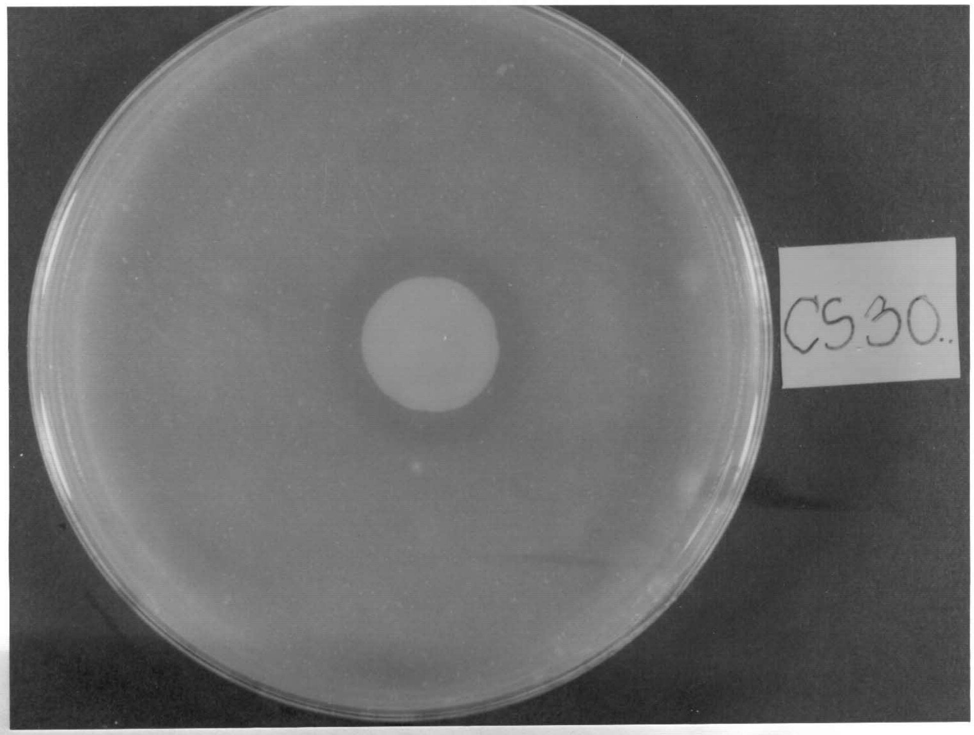
2.2 <u>วิธีคัดเลือกโดยทดสอบการสร้างบริเวณใสบนอาหารที่มีไคตินเป็นสับสเตรท</u>

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า วิธีนี้มีข้อจำกัดตั้งแต่การเตรียมจานอาหารให้เหมาะสม จึงได้ทดลองผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ให้มีส่วนประกอบของ swollen chitin ในเปอร์เซนต์ที่แตกต่างกัน คือ 3.0%, 6.0%, 9.0%, 12.0% และ 15.0% ผลการทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย ปรากฏว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มี swollen chitin 12.0%-15.0% จะให้บริเวณใสชัดเจนที่สุด จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มี swollen chitin 12.0% สำหรับการทดลองครั้งนี้ เมื่อนำกลุ่มแบคทีเรียที่ให้ผลบวก ในข้อที่ 2.1 มาเลี้ยงบนจานอาหารเป็นเวลา 3 วัน ที่ 37°ซ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CS30, CS34 และ CS41 เท่านั้น ที่ทำให้เกิดบริเวณใสภายใน 3 วัน (รูปที่ 12-14) ส่วนในสายพันธุ์ CP3 ซึ่งมีค่าการเรืองแสงค่อนข้างมาก ไม่ได้นำมาทดสอบเนื่องจากแบคทีเรียตาย ส่วนในแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ปรากฏบริเวณใสให้เห็นนั้น แม้จะให้ผลการเรืองแสงเป็นบวกก็ตามอาจเนื่องจากบ่มเชื้อแบคทีเรียไว้เพียง 3 วันเท่านั้น โดยในที่นี้ตั้งใจจะเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตไคติเนสสูงสุด จึงใช้เวลาบ่มเพียง 3 วัน ส่วนแบคทีเรียที่ให้การเรืองแสงเป็นลบ ก็ไม่สามารถทำให้เกิดบริเวณใสได้ด้วย

แบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณใสได้พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio* (จากตาราง 7)

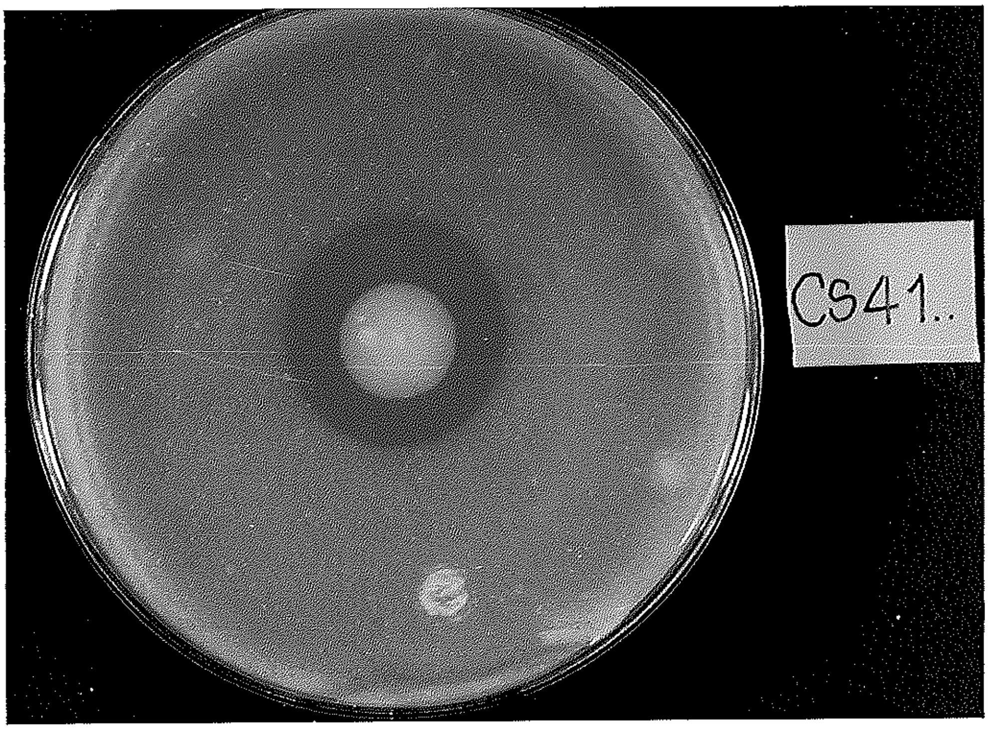
2.3 <u>วิธีคัดเลือกโดยทดสอบค่ากิจกรรมของไคติเนส</u>

จากผลการทดลองในข้อ 2.1 ซึ่งสามารถเลือกแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 60 สายพันธุ์ โดยคาดว่าแบคทีเรียเหล่านี้น่าจะมีความสามารถในการผลิตไคติเนสด้วย แต่จากการทดสอบในข้อ 2.2 พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ที่ให้บริเวณใสและดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้นว่า การให้ผลลบกับการเกิดบริเวณใสมิได้หมายความว่าจุลินทรีย์นั้น ๆ ไม่สามารถผลิตไคติเนส และเพื่อเป็นการพิสูจน์ข้อดังกล่าวนั้นจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียโดยการหาค่ากิจกรรมของไคติเนสโดยทำการตรวจสอบดูผลผลิตที่ได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองใช้ 2 วิธี คือ



รูป 12 บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS30 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสับสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน

รูป 13 บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS34 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสับสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน



รูป 14 บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย CS41 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่มี Swollen chitin ในปริมาณ 12% เป็นสับสเตรท บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 วัน

2.3.1 ทดสอบปริมาณ GlcNAc

การทดสอบนี้มีหลักการคือไคติเนสไปย่อยไคตินเป็นโพลีเมอร์สายสั้น ๆ ซึ่งถูกย่อยต่อด้วยไคโตไบเอสหรือ β-glucosidase ได้ผลผลิตเป็น GlcNAc เมื่อทำปฏิกิริยากับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) จะเกิดเป็นสารมีสีวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 585 นาโนเมตร

วิธีนี้มีข้อจำกัด คือต้องเติมไคโตไบเอสในปริมาณที่เพียงพอจึงจะเกิดปฏิกิริยาได้ดี และวิธีนี้จะไม่ไวพอ หากผลลัพธ์ที่ได้จากการย่อยไคตินคือ สายโอลิโกเมอร์ (oligomer) ที่ค่อนข้างยาว จากการทดลองใช้วิธีดังกล่าวกับส่วนใสที่ได้ จากการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ CP3 พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างไปจากหลอดควบคุมน้อยมาก (ประมาณ 0.01) จึงได้พยายามเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบให้เหมาะสมยิ่งขึ้น เช่นได้เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และพีเอชที่ใช้ในการทดสอบ หรือเพิ่มเวลาในการบ่มปฏิกิริยา แต่ก็ไม่ได้ผลการทดสอบที่ดีขึ้นประกอบกับในการทดลองทุกครั้งต้องเติมไคโตไบเอสซึ่งมีราคาแพงลงไปด้วยทุกครั้ง จึงเปลี่ยนไปใช้วิธีที่ 2

2.3.2 ทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิธีนี้เป็นการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของผลผลิตที่ได้ จากการย่อยด้วยไคติเนส ปกติการหาน้ำตาลรีดิวส์มีอยู่หลายวิธี เช่น ใช้สารละลาย Copper reagent กับ Nelson's Arsenomolybdate color reagent (Somogyi Nelson's method) หรือ 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) หรือ Potassium ferricyanide (Schales reagent) แต่ในที่นี้จะทำตามวิธีของ Tsujibo และคณะ, 1991 ซึ่งใช้สารละลาย Potassium ferricyanide เพราะเป็นวิธีที่มีความว่องไวสูง

ตาราง 9 แสดงค่า ผลต่างการดูดกลืนแสง ปริมาณโปรตีน ค่ากิจกรรม และค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CS30, CS41 และ CS34 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงตามลำดับ 1, 2, และ 3 ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากนี้ได้มีการทดสอบหาค่ากิจกรรมโดยวิธีเดียวกัน แต่ใน CP3 ค่าที่ได้เป็นการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียตัวแรกที่เริ่มต้นในการทดสอบ และต่อมาแบคทีเรียตายไปทำให้ไม่สา-

ตาราง 9 ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+C เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ

แบคทีเรีย	ค่า Δ OD ที่ 420 nm.	ค่ากิจกรรมของไคติเนส (U/ml)	ค่าโปรตีน (mg)	กิจกรรมจำเพาะของไคติเนส (U/mg.protein)
CP 3	0.72	0.625	0.0273	22.80*
CS 30	2.00	2.467	0.0578	42.69
CS 41	1.60	2.072	0.0508	40.80
CS 34	1.28	1.579	0.0651	24.26
CS 56	0.56	0.691	0.0303	22.79
CS 51	1.08	1.332	0.0613	21.73
CS 48	0.92	1.135	0.0678	16.74
CS 36	0.68	0.719	0.0600	11.98
CS 57	0.80	0.844	0.0714	11.82
CS 7	0.84	0.882	0.0770	11.46
CS 4	0.56	0.611	0.0764	9.04
CS 3	0.12	0.148	0.0798	1.86
CS 13	0.08	0.099	0.0892	1.11

* = ใช้การทดสอบต่างจากตัวอื่น ๆ คือ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิ 37°ซ (เนื่องจากเป็นแบคทีเรียตัวแรกที่ใช้เริ่มต้นในการทดสอบ และต่อมาแบคทีเรียตายไป ทำให้ไม่สามารถนำมาทดสอบซ้ำที่อุณหภูมิ 50°ซได้)

มารถนำมาทดสอบซ้ำที่อุณหภูมิ 50°ซ ได้ ดังนั้นจึงไม่พบแบคทีเรียใดมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงกว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากหัวข้อ 2.1-2.3 (ตาราง 10) จะเห็นว่าวิธีการสำรวจเบื้องต้นโดยดูการเกิดสารเรืองแสงนั้น เป็นวิธีการที่เหมาะสมและเชื่อถือได้ ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียใดที่ให้ผลลบกับวิธีทดสอบการสร้างสารเรืองแสงด้วย 4MUF.GlcNAc reagent ก็ไม่สามารถหาค่ากิจกรรมของไคติเนสโดยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ ส่วนแบคทีเรียที่ให้ผลบวกกับวิธีทดสอบการสร้างสารเรืองแสงด้วย 4MUF.GlcNAc reagent ก็สามารถหาค่ากิจกรรมของไคติเนสได้ และค่ากิจกรรมของไคติเนสที่มากหรือน้อยยังสอดคล้องกับปริมาณการเรืองแสงด้วย และพบว่าแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในระดับสูง ๆ เท่านั้นจึงจะให้ผลบวกกับการทดสอบการเกิดบริเวณใสบนจานที่มี swollen chitin เป็นสับสเตรท

แบคทีเรียที่ได้รับการคัดเลือกว่ามีความสามารถในการผลิตไคติเนสทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่า เกือบครึ่งเป็นกลุ่มของ *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio* (ผลจากตาราง 7) อีกทั้งเป็นกลุ่มที่ให้ค่ากิจกรรมของไคติเนสอยู่ในระดับสูงด้วย (CS30, CS34 และCS41) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียทุกกลุ่มซึ่งแยกได้จากงานวิจัยครั้งนี้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ เป็นกลุ่มที่มีการศึกษาถึงไคติเนสอย่างกว้างขวางในงานวิจัยอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน (ตาราง 3) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

3.1 <u>ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส</u>

แบคทีเรียที่แยกได้และให้ผลบวกในการทดสอบด้วยการสร้างสารเรืองแสง และการสร้างบริเวณใส สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (OD_{600} ของ CP3 =0.7) แต่ไม่พบค่ากิจกรรมของไคติเนสด้วยวิธีการทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไม่มีการผลิตเอนไซม์ หรือมีการผลิตในปริมาณที่ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ เมื่อใส่ chitin 0.3% (NB+C) หรือ colloidal chitin 0.3% (NB+CC) ในอาหาร NB ปรากฏว่าแบคทีเรียสามารถใช้ chitin หรือ colloidal chitin ได้ โดยสังเกตได้จาก ผง

ตาราง 10 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส กับการสร้างสารเรืองแสง และการสร้างบริเวณใส จากแบคทีเรียที่คัดเลือกในขั้นต้นจากความสามารถสร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (U/mg.protein)	การสร้างสารเรืองแสง	การสร้างบริเวณใส
CP 3	22.80*	++++	UD
CS 30	42.69	+++	+++
CS 41	40.80	++++	+++
CS 34	24.26	+++	+++
CS 56	22.79	+++	-
CS 51	21.73	+++	-
CS 48	16.74	+++	-
CS 36	11.98	++	-
CS 57	11.82	++	-
CS 7	11.46	+	-
CS 4	9.04	+	-
CS 3	1.86	+	-
CS 13	1.11	+	-

\+ = ปริมาณของสารเรืองแสง หรือบริเวณใส

โดย + ที่มากขึ้น หมายถึงปริมาณของสารเรืองแสง หรือบริเวณใสที่เพิ่มขึ้น

* = ใช้การทดสอบต่างจากตัวอื่น ๆ คือ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิ 37 °ซ

UD = ไม่สามารถทำการวัดได้ (Undetermine)

ของ chitin จะค่อย ๆ หายไป หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใสขึ้นเนื่องจาก colloidal chitin ถูกใช้ไปภายใน 24-48 ชม. เมื่อสำรวจค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB+C หรือ NB+CC มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในระดับสูง (ค่ากิจกรรมของ CP3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB+C =22.80, ใน NB+CC =10.80) จากการทดลองนี้พอที่จะสรุปได้ว่าไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียที่ถูกกระตุ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี chitin หรือ colloidal chitin เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนจัดว่าเป็น inducible enzyme และพบว่า chitin สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตไคติเนสได้ดีกว่า colloidal chitin ดังเห็นได้จากกิจกรรมไคติเนสของ CP3 (ตาราง 11)

จากการทดลองกับ *Aeromonas* sp.CS34 เพื่อต้องการทดสอบว่า หากเพิ่มปริมาณของ chitin ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว จะช่วยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นด้วยหรือไม่ ผลการทดลองแสดงดังตาราง 12 ซึ่งพบว่าการใช้ chitin 0.3% และ chitin 0.5% ให้ค่ากิจกรรมที่สูงใกล้เคียงกัน และมีแนวโน้มว่า ปริมาณสับสเตรทที่เพิ่มขึ้นกลับทำให้กิจกรรมลดลงทั้งนี้อาจเกิดจากสารปะปนใน chitin เนื่องจาก chitin ที่ใช้ในอาหารเป็น chitin ที่ไม่บริสุทธิ์ อาจมีส่วนของอิออนหลงเหลือและไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (ดูหัวข้อ 6.3 ประกอบ) ดังนั้นยิ่งเพิ่มปริมาณ chitin ในอาหารก็เท่ากับไปเพิ่มปริมาณสารยับยั้งด้วย จากข้อสังเกตในการทดลองครั้งนี้ น่าจะได้มีการทดลองต่อ โดยเตรียม chitin ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น และนำ chitin ที่ได้ มาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวในปริมาณต่าง ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดไปมากกว่านี้ และอาจทำให้สรุปได้ว่า ปริมาณสับสเตรทที่เพิ่มขึ้นมีผลยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์หรือไม่ อย่างไรก็ตามผลการทดลองในตาราง 12 ยังคงยืนยันว่าการใช้ chitin ปริมาณ 0.3% (โดยได้สูตรมาจาก Reichenbach and Dworkin, 1981) นั้นเพียงพอต่อการกระตุ้นให้แบคทีเรียผลิตไคติเนส จึงได้ใช้เป็นสูตรสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียในทุกการทดลองที่จะได้กล่าวต่อไป

ตาราง 11 ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรียที่สร้างสารเรืองแสงทั้ง 13 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงเปรียบเทียบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB, NB+C และ NB+CC เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ

แบคทีเรีย	อาหาร NB		อาหาร NB+C		อาหาร NB+CC	
	การเจริญของเชื้อ ($OD._{600}$)	กิจกรรมจำเพาะ U/mg.protein	การเจริญของเชื้อ ($OD._{600}$)	กิจกรรมจำเพาะ U/mg.protein	การเจริญของเชื้อ ($OD._{600}$)	กิจกรรมจำเพาะ U/mg.protein
CP 3	0.700	0.00	1.140	22.80*	0.726	10.80*
CS 30	0.662	0.00	0.790	42.69	ND	ND
CS 41	0.684	0.00	0.920	40.80	ND	ND
CS 34	0.766	0.00	0.680	24.26	ND	ND
CS 56	0.307	0.00	0.494	22.79	ND	ND
CS 51	0.491	0.00	0.988	21.73	ND	ND
CS 48	0.714	0.00	0.623	16.74	ND	ND
CS 36	0.525	0.00	0.597	11.98	ND	ND
CS 57	0.424	0.00	0.434	11.82	ND	ND
CS 7	0.671	0.00	0.766	11.46	ND	ND
CS 4	0.930	0.00	0.878	9.04	ND	ND
CS 3	0.748	0.00	0.774	1.86	ND	ND
CS 13	0.840	0.00	0.832	1.11	ND	ND

* = ใช้การทดสอบต่างจากตัวอื่น ๆ คือ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิ 37°ซ

ND = ไม่ได้ทำการวัด (Not determine)

ตาราง 12 ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจากแบคทีเรีย CS34 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+C เป็นเวลา 24 ชม. ที่ 37°ซ โดยใช้เปอร์เซนต์ของ chitin ที่แตกต่างกัน

เปอร์เซนต์ของ chitin ที่ใช้ (%)	การเจริญของเชื้อ ($OD._{600}$)	กิจกรรมจำเพาะ (U/mg.protein)
0.3	0.635	24.00
0.5	0.575	20.01
0.7	0.501	18.00
1.0	0.575	16.65

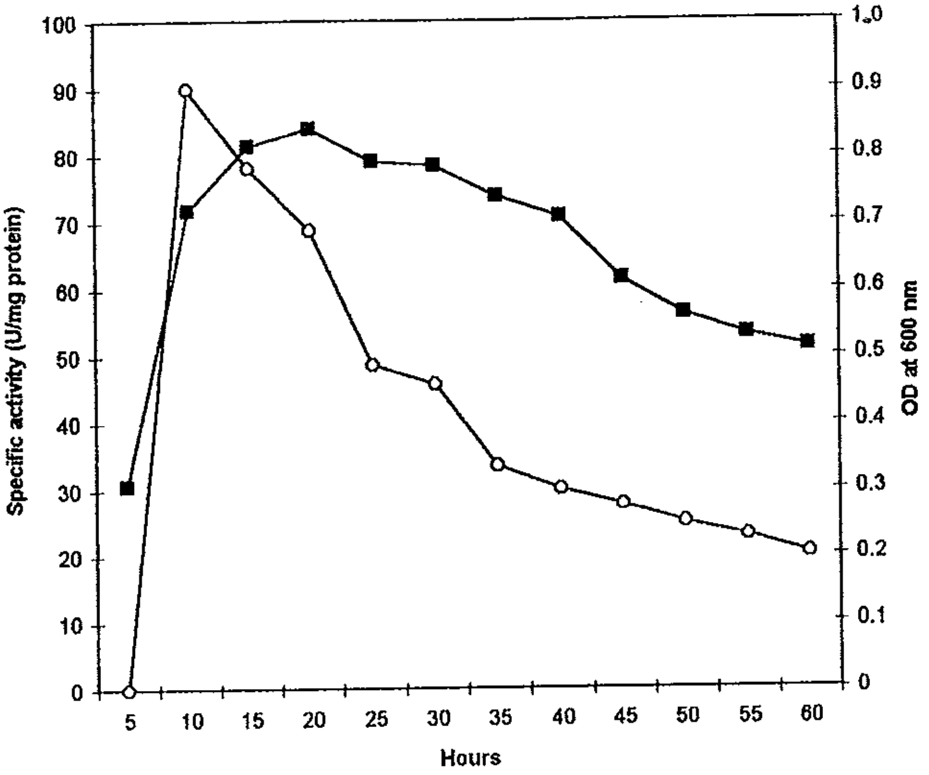
3.2 <u>ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนส</u>

เนื่องจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 13 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียสามสายพันธุ์ที่สามารถให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสที่สูงในอาหารเหลวสูตรเหมาะสมดังที่คัดเลือกไว้ (NB+C) คือ CS30, CS34 และ CS41 ซึ่งผลจากการจำแนกสายพันธุ์ (ในหัวข้อ 1.2) พบว่าเป็น *Aeromonas* sp. นั้น การศึกษาในหัวข้อต่อไปจึงเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงสามสายพันธุ์ มาทำการทดลอง

3.2.1 *Aeromonas* sp.CS30

ทำ preculture โดยเลี้ยง *Aeromonas* sp.CS30 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB 5 มล. ที่ 37°ซ นาน 24 ชม. นำ preculture มาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว NB+C ปริมาตร 250 มล.เป็นเวลา 72 ชม.เก็บตัวอย่างทุก ๆ 5 ชม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อดูค่าการเจริญเติบโตของเชื้อและวัดค่ากิจกรรมของไคติเนส จากผลการทดลองแสดงไว้ในรูป 15 พบว่าในช่วงระยะชั่วโมงที่ 5 ถึงชั่วโมงที่ 10 ค่าความขุ่นที่แทนปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีอัตราการเพิ่มในลักษณะเอกซ์โปเนนเชียล (exponential) พร้อมกับค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสมีอัตราการเพิ่มขึ้นในลักษณะเอกซ์โปเนนเชียลเช่นกัน โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงสุด 90.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในช่วง early stationary phase หรือในชั่วโมงที่ 10 ของการเจริญเติบโต และเมื่อค่าความขุ่นของแบคทีเรียเข้าใกล้ช่วง stationary phase จนถึงช่วง dead phase พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสเริ่มมีค่าลดลงตามลำดับ

ลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Aeromonas* sp.CS 30 กับปริมาณของไคติเนส แสดงให้เห็นว่าเมื่อแบคทีเรียเริ่มเจริญเติบโตและมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นก็จะเริ่มมีการหลั่งไคติเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไปพร้อมกัน และเมื่อปริมาณเซลล์แบคทีเรียลดลง ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสก็ลดลงควบคู่ไปด้วย กล่าวได้ว่า ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูป 15 การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS30 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin

3.2.2 *Aeromonas* sp.CS34

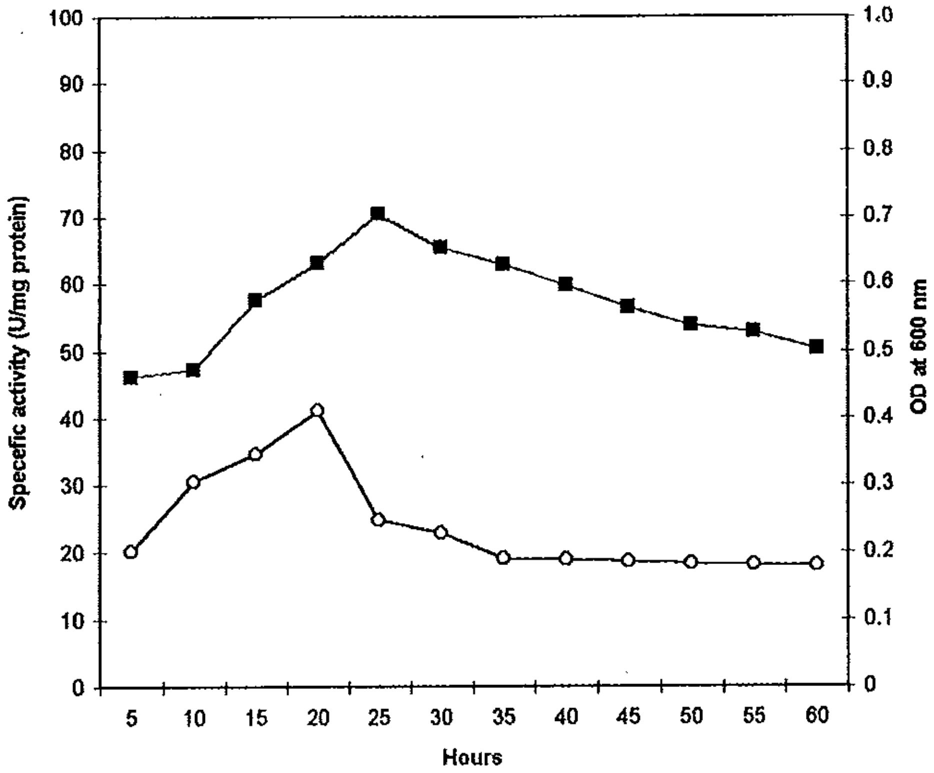
ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และพบว่า (รูป 16)ในช่วงระยะชั่วโมงที่ 10 ถึงชั่วโมงที่ 20 ค่าความขุ่นที่แทนปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่มีชีวิต มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีอัตราการเพิ่มในลักษณะเอกซ์โปเนนเชียล พร้อมกับค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส มีอัตราการเพิ่มขึ้นในลักษณะเอกซ์โปเนนเชียลเช่นกัน โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงสุด 41.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในช่วง early stationary phase หรือ ในชั่วโมงที่ 20 ของการเจริญเติบโต และเมื่อค่าความขุ่นของแบคทีเรียเข้าใกล้ช่วง stationary phase จนถึงช่วง dead phase พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสเริ่มมีค่าลดลงตามลำดับ

ลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Aeromonas* sp.CS34 กับปริมาณของไคติเนส แสดงให้เห็นว่า เมื่อแบคทีเรียเริ่มเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นก็จะเริ่มมีการหลั่งไคติเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไปพร้อมกัน และเมื่อปริมาณเซลล์แบคทีเรียลดลง ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสลดลงควบคู่ไปด้วย กล่าวได้ว่า ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

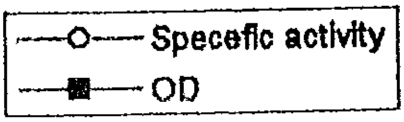
3.2.3 *Aeromonas* sp.CS 41

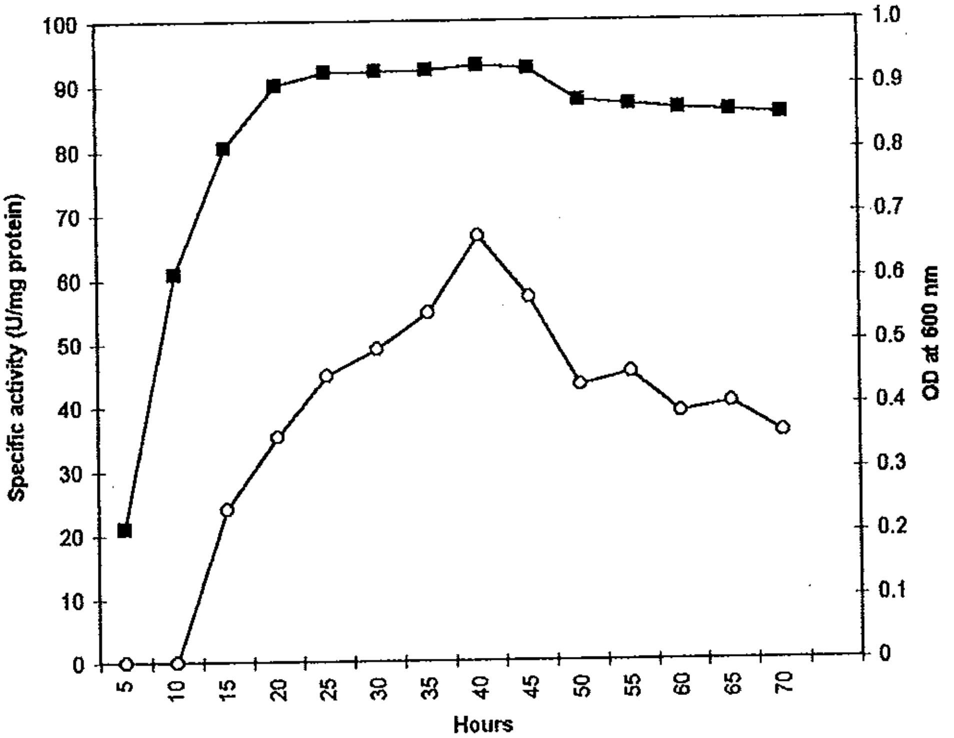
ผลของการนำ *Aeromonas* sp.CS 41 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (รูป 17) พบว่ามีความแตกต่างไปจาก *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34 คือ ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส มีอัตราการเพิ่มขึ้นในลักษณะเอกซ์โปเนนเชียลควบคู่ไปกับการเจริญของแบคทีเรีย และยังมีค่ากิจกรรมสูงแม้การเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ช่วง stationnary phase ในช่วงระหว่าง 20-40 ชม.โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงในช่วง late stationary phase หรือในชั่วโมงที่ 40 ของการเจริญและหลังจาก 40 ชม. ไปแล้ว พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสเริ่มมีค่าลดลง

ลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *Aeromonas* sp.CS41 กับปริมาณของไคติเนส แสดงให้เห็นว่า เมื่อแบคทีเรียเริ่มเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ก็จะเริ่มมีการหลั่งไคติเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไปพร้อมกัน และเมื่อปริมาณเซลล์



รูป 16 การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS34 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin





รูป 17 การเจริญและการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS41 ในอาหารแบบเหลว Nutrient broth ที่มี 0.3% chitin

แบคทีเรียเริ่มคงที่ หรือการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเริ่มจำกัดนั้นยังไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส กล่าวคือยังคงมีลักษณะเอกซ์โปเนนเชียลเช่นเดิม แต่ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจะมีค่าลดลงเมื่อแบคทีเรียเริ่มตายไป กล่าวได้ว่า ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติเนสของ *Aeromonas* sp.CS30, CS34 และCS41 กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีแบบแผนการผลิตไคติเนสที่สัมพันธ์แบบ แปรผันตรงกับการเจริญเติบโตด้วยเช่นกัน แต่ใช้ระยะเวลาที่มากกว่าในการผลิตไคติเนสให้ได้ค่าสูงสุด เช่น 110 ชม. ใน *Serratia marcescens* QM B1466 (Monreal and Reese, 1969), 72 ชม. ใน *Vibro* sp. (Ohtakara, *et al.*,1979); *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 (Yabuki, *et al.*, 1986); *Streptomyces* sp.S-84 (Ueno, *et al.*, 1991)

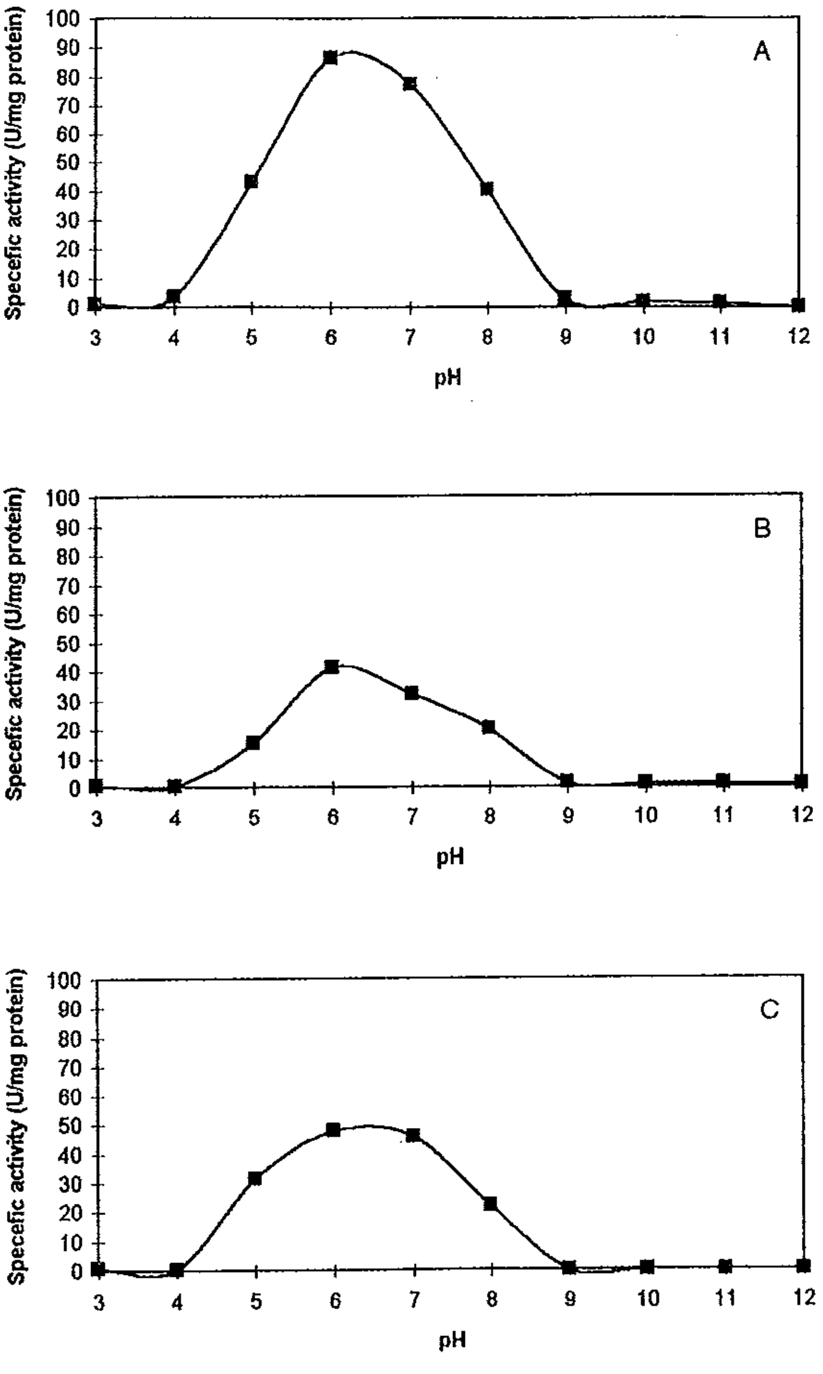
4. คุณสมบัติของไคติเนส

ผลจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์ให้กึ่งบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการไดอะไลซ์พบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 20.0-40.0% ไม่มีค่ากิจกรรมของไคติเนส ส่วนโปรตีนที่ตกตะกอนระหว่าง 40.0%-80.0% มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จึงนำสารละลายโปรตีนดังกล่าวมาศึกษาคุณสมบัติดังต่อไปนี้

4.1 พีเอชที่เหมาะสม

การตรวจสอบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ พีเอชใด นับเป็นข้อมูลสำคัญประการหนึ่งในการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ และเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์อื่น ๆ ในหัวข้อนี้จึงทำการทดลองเปลี่ยนพีเอชที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาของไคติเนส แล้วนำค่าที่ได้มาวาดกราฟเพื่อเปรียบเทียบ

รูป 18 จะเห็นได้ว่าไคติเนส ที่ผลิตได้จาก *Aeromonas* sp.CS30, *Aeromonas* sp.CS34 และ *Aeromonas* sp.CS41 ทำงานได้ในช่วง พีเอชเป็นกลางโดยมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของไคติเนสได้ดีในช่วง พีเอช 6-7



รูป 18 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของไคติเนสที่อุณหภูมิ 50°ซ

A. *Aeromonas* sp.CS30

B. *Aeromonas* sp.CS34

C. *Aeromonas* sp.CS41

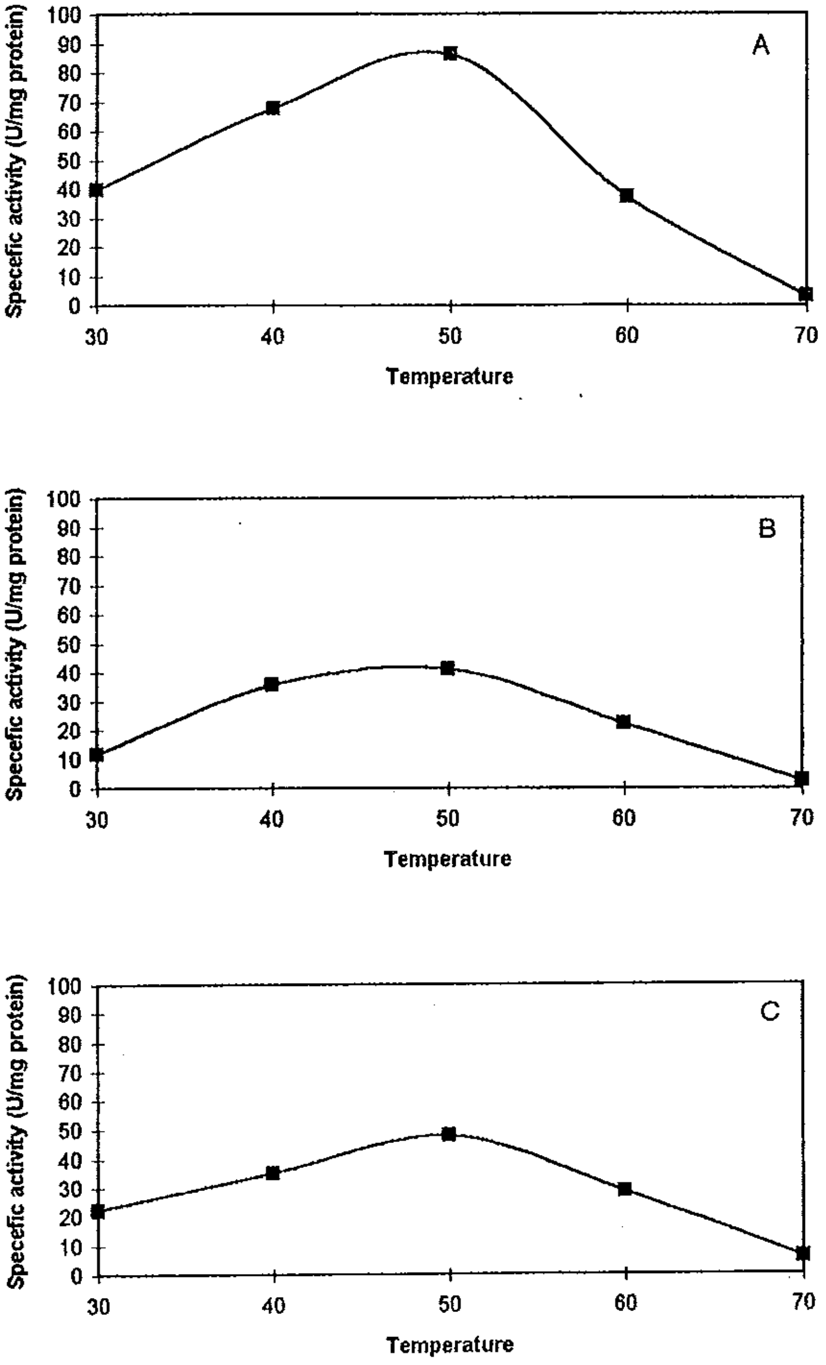
เมื่อเทียบกับไคติเนสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่าส่วนมากจะทำงานได้ดีในพีเอชที่เป็นกลางเช่นกัน เช่น *Serratia marcescens* QM B1466 ในพีเอช 6.4 (Monreal and Reese, 1969), *Streptomyces griseus* ในพีเอช 6.3 (Berger, and Reynolds, 1958), *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 ในพีเอช 7.0 (Yabuki, *et. al.*, 1986), *Vibro* sp. ในพีเอช 7.0-8.0 (Ohtakara, *et al.*, 1979), Bean : *Phaseolus vulgaris* ในพีเอช 6.5 (Boller *et. al.*, 1983), Hornworm : *Manduca sexta* ในพีเอช 6.5 (Koga, *et al.*,1983) และ Spider : *Cupiennius salei* ในพีเอช 7.2 (Mommsen, 1983 อ้างโดย Cabib, 1987)

4.2 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

การตรวจสอบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิใด นับเป็นข้อมูลอีกประการหนึ่งที่สำคัญไม่แพ้เรื่องพีเอชของเอนไซม์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของไคติเนสทั้งสามชนิดคือ 50°ซ (รูป 19) ซึ่งอุณหภูมิที่ต่ำและสูงกว่านี้ ประสิทธิภาพการทำงานของไคติเนสจะมีค่าน้อยลง คุณสมบัติเช่นนี้ใกล้เคียงกับไคติเนสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52 (Yabuki, *et al.*, 1986); *Serratia marcescens* QM B1466 (Monreal and Reess, 1969) *Aspergillus carneus* (Abdel-Naby, *et al.*, 1992); *Aspergillus niger* (Ohtakara, 1961 อ้างโดย Ohtakara *et al.*, 1979) *Aeromonas* sp.NO.10S-24 (Ueda and Arai, 1992); Red sea bream : *Pagrus major* (Kono, *et al.*, 1987); *Alteromonas* sp. O-7 (Tsujibo, *et.al.*, 1991)

4.3 <u>ความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ</u>

คุณสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของเอนไซม์ คือหากตั้งเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลานาน ๆ เอนไซม์จะยังคงสภาพเดิมหรือไม่ และที่อุณหภูมิใดที่เอนไซม์เริ่มสลายในการทดลองนี้ ทำการอุ่นสารละลายเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ไว้ที่ อุณหภูมิ 30°ซ-70°ซ เป็นระยะเวลา 1 ชม.แล้วจึงนำมาทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ผลการทดสอบแสดงในรูป 20 พบว่าไคติเนสทั้งสามสายพันธุ์มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิ 40°ซ หรือต่ำกว่าเป็นเวลา 1 ชั่ว-

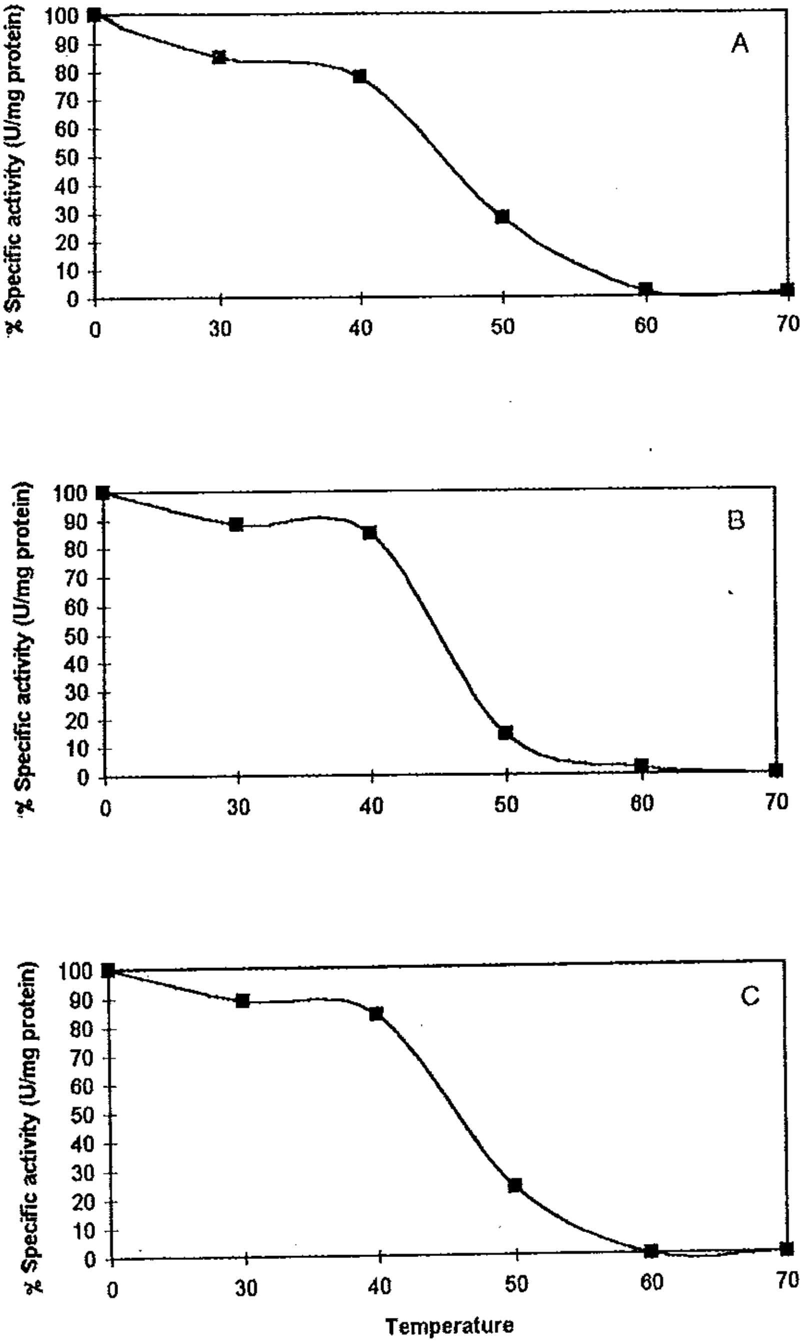


รูป 19 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของไคติเนสที่พีเอช 6.0

A. *Aeromonas* sp.CS30

B. *Aeromonas* sp.CS34

C. *Aeromonas* sp.CS41



รูป 20 ความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

A. *Aeromonas* sp.CS30

B. *Aeromonas* sp.CS34

C. *Aeromonas* sp.CS41

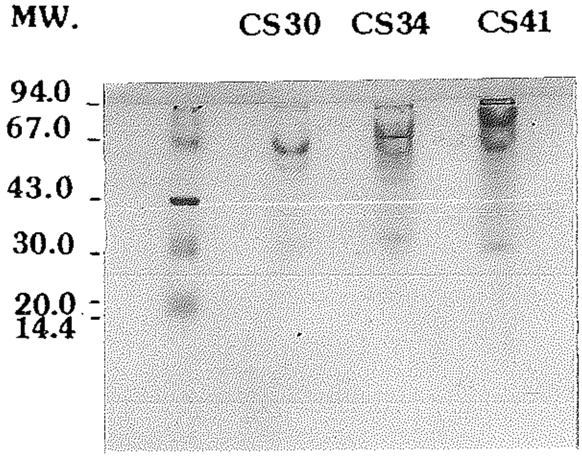
โมงได้ดี แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°ซ ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับ *Aeromonas* sp. No. 10S-24 (Ueda and Arai, 1992); *Aeromoas hydrophila* sub sp. *anaerogenes A 52* (Yabuki, *et al*., 1986); *Vibrio* sp. (Ohtakara, *et al* ., 1979) โดยที่ 50°ซ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ *Aeromonas* sp.CS30, *Aeromonas* sp.CS34 และ *Aeromonas* sp.CS41 จะเหลือเพียง 33.04%, 16.19%, และ 26.19% ตามลำดับ และจะหมดประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4 <u>การตรวจสอบแบบแผนของไคติเนสโดยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส</u>

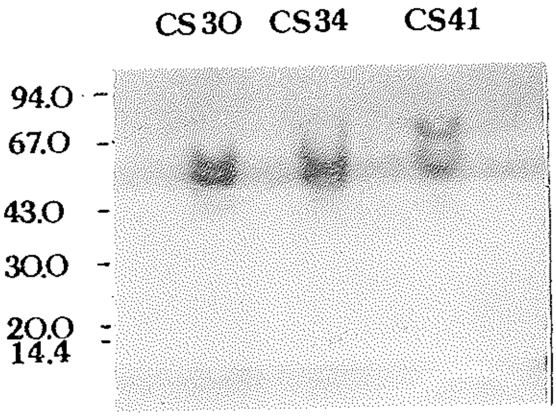
เนื่องจากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งสามสายพันธุ์คือ *Aeromonas* sp. ผลิตไคติเนสที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาใกล้เคียงกันมาก อาจเป็นไปได้ว่าไคติเนสของแบคทีเรียเหล่านี้ มีโครงสร้างของโปรตีนที่เหมือนกัน วิธีหนึ่งที่จะช่วยระบุได้คร่าว ๆ ว่าเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันหรือไม่ คือการตรวจสอบด้วยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ซึ่งมีวิธีการทำคือ นำสารละลายโปรตีนกึ่งบริสุทธิ์ดังกล่าวมาแยกในเจลความเข้มข้น 12.0% นำแผ่นเจลอีกแผ่นซึ่งมีส่วนผสมของสับสเตรท glycol chitin ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมาปิดทับ แถบโปรตีนใดที่มีคุณสมบัติของไคติเนส ก็จะซึมออกมาย่อยสับสเตรทเกิดเป็นแถบใส ซึ่งเมื่อเติมสารละลาย fluorescent brightener 28 จะปรากฏเป็นแถบเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต เมื่อเกิดปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้ว ก็นำเจลแผ่นล่างไปย้อมเจลด้วย Coomassie blue โดยวิธีนี้จะทำให้ทราบว่าแถบโปรตีนขนาดใด คือโปรตีนของไคติเนส

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34 ผลิตไคติเนสอย่างน้อย 2 ไอโซไซม์ โดยมีแบบแผนที่เหมือนกัน คือมีขนาดตรงกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน 55 kDa และ 65 kDa (รูป 21) ส่วน *Aeromonas* sp. CS41 ผลิตไคติเนส2 ไอโซไซม์เช่นกัน แต่มีแบบแผนต่างออกไป คือมีขนาดตรงกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานที่ 60 kDa และ 70 kDa

จากข้อมูลข้างต้นสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34 อาจเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน เพราะต่างผลิตไคติเนสที่มีขนาดตรงกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานเดียวกัน อีกทั้งใช้ระยะเวลาในการผลิตไคติเนสสูงสุดใกล้เคียงกัน (ชม.ที่



A.



B.

รูป 21 แบบแผนของไคติเนสเมื่อตรวจสอบโดยโพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

A. บน non-SDS โพลีอะคริละไมด์เจล 12%

B. บน โพลีอะคริละไมด์เจล + Glycol chitin

เพื่อดู activity stain ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต

10 และชม.ที่ 20 ตามลำดับ) ส่วน *Aeromonas* sp.CS41 อาจเป็น *Aeromonas* สายพันธุ์ที่แตกต่างออกไป เพราะผลิตไคติเนสที่มีขนาดตรงกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน และใช้ระยะเวลาในการผลิตไคติเนสสูงสุดแตกต่างออกไป (ชม.ที่ 40) แต่อย่างไรก็ตามทั้ง *Aeromonas* sp.CS30 ,CS34 และ CS41 มีแบบแผนการผลิตไคติเนส แบบแปรผันตรงกับการเจริญ นอกจากนี้ค่าของอุณหภูมิหรือพีเอชที่เหมาะสม มีค่าเดียวกัน และเป็นค่าที่ใกล้เคียงกันกับไคติเนสที่พบในสิ่งมีชนิดอื่น ๆ ด้วย

ในการวิจัยครั้งนี้การพบแบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินในบ่อเลี้ยงกุ้งและมีความสามารถในการผลิตไคติเนสอาจยังไม่มีความหลากหลายมากนัก ทั้งนี้เพราะสภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อในครั้งแรกไม่ครอบคลุมถึงแบคทีเรียทั้งหมดที่ควรจะมีในตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งแบคทีเรียที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาวะและอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนั้นต้องถูกคัดทิ้งไป แต่เราก็ได้แนวทางในการปฏิบัติเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่อาจมีความสามารถในการผลิตไคติเนส และมีคุณสมบัติเฉพาะต่าง ๆ ที่น่าสนใจเพื่อนำมาศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 4

สรุป

1. แบคทีเรียที่แยกได้จากลูกกุ้ง 11 สายพันธุ์สามารถจัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้ดังนี้ คือกลุ่มที่ 1 *Bordetella* หรือ *Acinetobacter* 5 สายพันธุ์; กลุ่มที่ 2 *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio* 5 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 3 *Alcaligenes* หรือ *Pseudomonas* 1 สายพันธุ์ ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้จากตะกอนดินมี 57 สายพันธุ์ สามารถจัดแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 *Alcaligenes* หรือ *Pseudomonas*; กลุ่มที่ 2 *Aeromonas, Pleisiomonas* หรือ *Vibrio*; กลุ่มที่ 3 *Neisseria* หรือ *Branhamella*; กลุ่มที่ 4 *Bordetella* หรือ *Acinetobacter*; กลุ่มที่ 5 *Staphylococcus* หรือ *Micrococcus* และกลุ่มที่ 6 เป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ คิดเป็นจำนวน 50.88%, 21.01%, 14.04%, 14.04, 5.26% และ 1.75% ของทั้งหมดตามลำดับ

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด พบว่ามีแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารเรืองแสง methylumbelliferone โดยมี 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างบริเวณใสบนอาหารที่มีไคตินเป็นสับสเตรทได้ด้วย คือ CS30, CS34 และ CS41 ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์ให้ผลของค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสที่สูงด้วยเช่นกัน และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ทั้งสามพบว่าเป็นแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. ทั้งหมด

3. เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Nutrient broth +0.3% chitin (NB+C) จะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Nutrient broth+ 0.3% colloidal chitin (NB+CC) โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงสุดเป็น 90.00, 66.61 และ 41.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ในชั่วโมงที่ 10, 40 และ 20 ของการเจริญเติบโตสำหรับแบคทีเรีย CS30, CS41 และ CS34 ตามลำดับ

4. เมื่อทำการเตรียมโปรตีนให้กึ่งบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟตในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB+C เป็นระยะเวลาที่ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนสสูงสุดในแต่ละสายพันธุ์ นำโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นแอมโม-เนียมซัลเฟต 40%-80% มาศึกษาคุณสมบัติของไคติเนส พบว่าไคติเนสทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 6 ถึง 7 ที่อุณหภูมิ 50°ซ ทั้งสามสายพันธุ์ ส่วนความคงทนของเอนไซม์ พบว่า *Aeromonas* sp.CS30, *Aeromonas* sp.CS41 และ *Aeromonas* sp.CS34 เหลือค่ากิจกรรมของเอน-ไซม์เพียง 28.06%, 23.39% และ 14.29% ตามลำดับ เมื่อบ่มเอนไซม์ก่อนที่จะนำมาหาค่ากิจกรรมที่ 50°ซ เป็นเวลา 1 ชม. และเมื่อทำการสำรวจแบบแผนของไคติเนสโดยโพลีอะ-คริละไมด์พบว่า แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ต่างผลิตไคติเนสอย่างน้อย 2 ไอโซไซม์ โดย *Aeromonas* sp.CS30 และ *Aeromonas* sp.CS34 มีแบบแผนไอโซไซม์ที่เหมือนกัน แต่ต่างจากแบบแผนที่ได้จาก *Aeromonas* sp.CS41

เอกสารอ้างอิง

คะเน กิตติโกวิท. 2537. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับกุ้งกุลาดำ. ว.แลใต้. 14 : 22-25.

ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2532. กุ้งกุลาดำ. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท. นนทบุรี. 64 หน้า

สายใจ ปานวิเชียร. 2536. การจำแนกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคตินได้จากดินเลนบ่อเลี้ยงกุ้ง. รายงานการวิจัย, ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หาดใหญ่. สงขลา. 48 หน้า.

สุกธวัฒน์ เบญจกุล. 2534. แนวทางการใช้ประโยชน์จากเปลือกกุ้ง : ไคติน และไคโตแซน วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หาดใหญ่. สงขลา. หน้า. 4-35.

Abdel-Naby, M. A., El-Shayeb, N. M. A. and Sherief, A. A. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aspergillus carneus*. Appl. Biochem. Biotechnol. 37 : 141-154.

Bartinicki-Garcia, S. and Lippman, E. 1972. The bursting tendency of hyphal tip in fungi : presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. J. Gen. Microbiol. 73 : 487-500.

Bassler, B. V., Yu, C., Lee, Y. C. and Roseman, S. 1991. Chitin utilization by marine : degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. J. Biol. Chem. 266 :

24276-24285.

Bennett, C. B. and Hood, M. A. 1980. Effects of cultural conditions on the production of chitinase by *Bacillus megatarum.* Dev. Indust. Microbiol. 21 : 357-363.

Berger, L. R. and Reynolds, D. M. 1958. The Chitinase system of a strain of *Streptomyces qriseus.* Biochim. Biophys. Acta. 29 : 522-534.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. 1983. Chitinase in bean leaves, induction by ethylene, purification, and possible function. Planta. 157 : 22-31.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 12 : 248-254.

Broglie, K. E., Gaynor, J. J. and Broglie, R. M. 1986. Ethylene regulated gene expression : molecular cloning of the gene encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 6820-6824.

Cabib, E. 1987. The synthesis and degradation of chitin. Adv. Enzymol. 59 : 59-101.

Chandramohan, D. and Thomas, F. 1984. Studies on chitinase activity and chitinoclastic bacteria in sediments, fishes and prawn. Proc. Symp. Coastal Aquaculture. 3 : 839-845.

Charles, J. B. 1984. Chitin : accomplishment and perspectives. *In* Chitin, Chitosan and Related enzymes (ed. J. P. Zikakis), pp. 17-24, New York : Academic Press.

Chen, J., Nagayama, F. and Chang, M. C. 1991. Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 2426-2428.

Clarke, P. H. and Tracy, M. V. 1956. The occurrence of chitin in some bacteria. J. Gen. Microbiol. 14 : 315-320.

Cody, R. M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. Curr. Microbiol. 19 : 201-202.

Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I. and Cabib, E. 1982. Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 257 : 1392-1397.

De-Bolle, M. F. C., Goderis, I. J., Terras, F. R. G, Cammue, B. P. A, Broekaert, W. F. and Janssens, F. A. 1991. A technique for detecting antifungal activity of proteins seperated by

polyacrylamide gel eletrophoresis. Electrophoresis. 12 : 442-444.

Dumas-Gaudot, E., Grenier, J., Furlan, V. and Asselin, A. 1992. Chitinase, chitosanase and β-1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomous* species. Plant Sci. 84 : 17-24.

Grey, D. L., Dall, W. and Baker, A. 1983. A guide to the Australian Penaeid prawn. Australia : Northen Territory Goverment Printing Office.

Grosset, J., Meyer, Y., Chartier, Y., Kauffmann, S., Leyrand, M. and Fritig, B. 1990. Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3-β-glucanase, chitinase and "osmotin" during in vitro culture. Plant Physiol. 92 : 520-527.

Hsing-Chen, C., Mei-Ying, H., Moody, M. and Shann-Izong, J. 1991. Distribution and hydrolysis enzyme activities of aerobic, heterotrophic bacteria isolated from grass prawn, *Peneaus monodon*. J. Fish. Soc. Taiwan. 18 : 301-310.

Humphreys, A. M. and Gooday, G. W. 1984. Properties of chitinase activities from *Mucor mucedo* : evidence for a membrane-bound zymogenic form. J. Gen. Microbiol. 130 : 1359-1366.

Imoto, T. and Yagishita, K. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. Agr. Biol. Chem. 35 : 1154-1156.

Jeuniaux, C. 1986. Chitinase. Methods Enzymol. 8 : 645-650.

Koga, O., Jilka, J. and Kramer, K. J. 1983. Insect endochitinase : glycoprotein from moulting fluid, integument and pupal hemolymph. Insect Biochem. 13 : 295-305.

Kono, M., Matsui, T. and Shimizu, C. 1987. Purification and some properties of chitinase from the stomach of red sea bream *Pagrus major*. Nippon Suisan Gakkaishi. 53 : 131-136.

Kono, M., Mutsui, T. Shimizu, C. and Koga, D. 1990. Purification and some properties of chitinase from the liver of a prawn, *Panaeus japonicus*. Agric. Biol. Chem. 54 : 2145-2147.

Krieg, N. R. and Holt, J.C. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Baltimore : Williams and Wilkins

Laemmli, U .K. 1970. Clevage of structures of protiens during assembly by head of bacteriophage-T4. Nature. 227 : 680-685.

Lymn, K. R. 1990. Chitinases and chitobiases from the American lobster (*Homarus americanus*). Comp. Biochem. Physiol. 96 : 761-766.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Baltimore : Williams and Willkins

Miyashita, K., Fujii, T. and Sawada, Y. 1991. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. J. Gen. Microbiol. 137 : 2065-2072.

Molano, J., Polochek, I., Duran, A. and Cabib, E. 1979. An endochitinase from wheat germ : Actvity on nascent and performed chitin. J. Biol. Chem. 254 : 4901-4907.

Monreal, J. and Reese, E. T. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol. 15 : 689-696.

Morissey, R. F., Dugan, E. P. and Koths, J. S. 1976. Chitinase production by *Arthrobacter* sp. lysing cells of *Fusarium roseum*. Soil Biol. Biochem. 8 : 23-28.

O'Brien, M. and Cowell, R. R. 1987. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 1718-1720.

Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. 1979. Purification and some properties from *Vibrio sp.* J. Ferment. Technol. 57 : 169-177.

Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kue, J. 1991. A technique for detection of chitinase, beta-1,3-glucanase, and protein patterns after a single seperation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrorphocusing. Phytoplankton. 81 : 970-974.

Perrin, D. D. and Dempsey, B. 1974. Buffers for pH and Metal Ion Control. New York : John Willey and Sons.

Polachek, I. and Rosenberger, R. F. 1978. Distribution of autolysis in hyphae of *Aspergillus nidulans:* evidence for a lipid - mediated attachment to hyphal walls. J. Bacteriol. 135 : 741-747.

Rasmussen, U., Bojsen, K. and Collinge, D. B. 1992. Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 20 : 277-287.

Reichenbach, H. and Dworkin, M. 1981. The order cytophagales (with addenda on tha genera *Herpetosiphon*, *Saprospira* and *Flexithrix*). *In* Procaryotes (ed. M. P. Starr *et al.*), pp. 356-379, New York : Springer-Verlag.

Revah-Moiseev, S. and Carroad, P. A. 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. Biotech.Bioen. 23 : 1067-1078.

Reynolds, D. M. 1954. Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. J. Gen. Microbiol. 11 : 150-159.

Robbins, P. W., Albright, C. and Benfield, B. 1988. Cloning and expression of a *Steptomyces plicatus* chitinase (chitinase -63) in *Escherichia coli.* J. Biol. Chem. 263 : 443-447.

Roby, D., Toppan, A. and Esquerre-Tugaye, M. T. 1986. Chitinase : plant defense protein related to resistance against fungal pathogen. *In* Chitin in nature and technology (ed. R. Mazzarelli, C. Jeuniaux, and G. W. Gooday), pp. 231-233, New York : Plenum press

Ruiz-Herrera, J. 1978. The distribution and quantitative importance of chitin in fungi. Proceeding of the First International Conference on Chitin/Chitosan (ed. R. A. A. Muzzaralli and E. R. Pariser), MIT Sea Grant Program. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. pp. 11-21.

Shaphira, R., Ordentlich, A., Chet, I. and Oppenheim, A. B. 1989 Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli.* Phytopathology. 79 : 1246-1249.

Shinshi, H., Mohnen, D. and Frederick Meins, Jr. 1986. Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme : inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco

tissues by auxin and cytokinin. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA. 84 : 89-93.

*Soto-Gil, R. W. and Zyskind, J. W. 1984. Cloning of *Vibro harveyi* chitinase genes in *Escherichia coli*. *In* Chitin, Chitosan and Related enzymes (ed. J. P. Zikakis), pp. 169-177, New York : Academic Press .

*Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y. 1976. Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. Agric. Biol. Chem. 40 : 2325-2333.

*Tsujibo, H., Yoshida, Y., Imada, C., Okami, Y., Miyamoto, K. and Inamori, Y. 1991. Isolation and characterization of a chitin degrading marine bacterium belonging to the genus *Alteromonas*. Nippon Suisan Gakkaishi. 57 : 2127-2131.

*Ueda, M. and Arai, M. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 : 460-464.

*Ueno, H., Miyashita, K., Sawada, Y. and Oba, Y. 1990. Purification and some properties of extracellular chitinase from *Streptomyces* sp. S-84. J. Gen. Microbol. 36 : 377-392.

※Watanabe, T., Suzuki, K., Oyanagi, W., Ohnishi, K. and Tanaka, H., 1990. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. J. Biol. Chem. 265 : 15659-15665.

West, P. A. and Cowell, R. R. 1984. Identification and classification of Vibrionaceae-an overview. *In* Vibrios in the Environment (ed. R. R. Cowell), pp. 285-368, New York : Wiley.

※Wortman, A. C., Somerville, C. C. and Cowell, R. R. 1986. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus* : gene cloning and application of a chitinase probe. Appl. Environ. Microbiol. 52 : 142-145.

※Yabuki, M., Mizushina, K., Amatatsa, T., Ando, A., Fujii, T., Shimada, M. and Yamashita, M. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A 52. J. Gen. Appl. Microbiol. 32 : 25-38.

Yanai, K., Takara, N., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohata, A. and Takaga, M. 1992. Purification of two chitinase from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of encoding genes. J. Bacteriol. 174 : 7398-7406.

Zobell, C. E. and Rittenberg, S. C. 1938. The occurrence and characterisstics of chitinoclastic bacteria in the sea. J. Bacteriol. 35 : 275-287.

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส

1. 4 MUF. GlcNAG reagent (O'Brien and Cowell, 1987)

นำ 0.025 M 4 MUF.GlcNAG ใน Dimethylformamide 0.6 มล.มาเจือจางในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate (พีเอช 7.4) 9.4 มล.

2. 0.1 M phosphate buffer (Perrin and Dempsey, 1974)

สารละลาย A : 0.2 M dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4 18.39 กรัม หรือ Na_2HPO_4-$2H_2O$ 35.61 กรัม หรือ Na_2HPO_4-12 H_2O 71.64 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4-H_2O 27.60 กรัม หรือ NaH_2PO_4 -$2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

เตรียมได้จาก การผสมสารละลาย A x มล.กับสารละลาย B (50-x) มล. ตามพีเอชที่ต้องการ จากนั้นเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

A(มล.)	พีเอช	A(มล.)	พีเอช
4.0	5.8	30.5	7.0
6.15	6.0	36.0	7.2
9.25	6.1	40.5	7.4
13.25	6.4	43.5	7.6
18.75	6.6	45.75	7.8
24.5	6.8	47.35	8.0

3. chitin suspention (Jeuniaux, 1986)

เตรียมได้จากการผสม chitin 5 มก.ในน้ำกลั่น 1 มล.

4. 0.6 M citric acid-1.2 Na_2HPO_4 buffer (พีเอช 5.1) (Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จาก การละลาย citric acid ($C_6H_8O_7$) 120.6 กรัม และ dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) 170.03 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับพีเอชให้ได้เป็น 5.1 ด้วย citric acid จากนั้นจึงปรับปริมาตรจนได้เป็น 1 ลิตร

5. 0.8 M $Na_2B_4O_7$ (Jeuniaux, 1986)

เตรียมได้จาก ละลาย disodium tetraborate ($Na_2B_4O_7$) 30.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

6. DMAB solution (Jeuniaux, 1986)

p-Dimethyl aminobenzaldehyde(DMAB)	0.5	มก.
conc. acetic acid	49.4	มล.
10 N HCl	0.6	มล.

7. 50 mM Tris-HCl buffer (พีเอช 7.5) (Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จาก การละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) 60.55 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับพีเอชให้ได้เป็น 7.5 ด้วย conc.HCl จากนั้นจึงปรับปริมาตรจนได้เป็น 1 ลิตร

8. Schales reagent (Imoto and Yagishita, 1971)

Potassium ferricyanide	0.5	กรัม
0.5 M sodium carbonate	1.0	ลิตร

9. Mcllvaine buffer (0.1 M citric acid-0.2 M Na_2HPO_4) (Perrin and Dempsey, 1974)

สารละลาย A : 0.1 M citric acid ($C_6H_8O_7$ 21.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4-$2H_2O$ 35.61 กรัม หรือ Na_2HPO_4 28.40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

เตรียมได้จากการผสม สารละลาย A x มล.กับสารละลาย B (100-x) มล. ตามพีเอชที่ต้องการ

A (มล.)	พีเอช	A (มล.)	พีเอช
98.0	2.2	47.0	5.2
94.9	2.4	44.8	5.4
90.3	2.6	42.6	5.6
85.8	2.8	40.2	5.8
81.1	3.0	37.5	6.0
76.6	3.2	34.6	6.2
72.4	3.4	31.1	6.4
68.7	3.6	27.1	6.6
65.2	3.8	22.8	6.8
61.9	4.0	17.8	7.0
59.0	4.2	13.0	7.2
56.3	4.4	9.4	7.4
53.8	4.6	6.5	7.6
51.4	4.8	4.2	7.8
49.0	5.0	2.8	8.0

10. 50 mM Glycine-NaOH buffer (Perrin and Dempsey, 1974)

สารละลาย A : 0.2 M Glycine ($C_2H_5O_2$ 15.014 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M Sodium hydroxide (NaOH 8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 25 มล. กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ จากนั้นเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

B (มล.)	pH
4.4	9.0
16.0	10.0
19.3	11.0
22.75	12.0

11. **โพลีอะคริละไมด์เจลความเข้มข้น 12.0 % (Laemmli, 1970)**

<u>สารละลาย A</u> : 30% acrylamide solution (Acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. กรองผ่านกระดาษกรอง เก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียม)

<u>สารละลาย B</u> : 1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8 (ละลาย Tris 18.17 กรัมในน้ำกลั่น และปรับพีเอชด้วย HCl ให้ได้เป็น 8.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

<u>สารละลาย C</u> : 0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8 (ละลาย Tris 6.60 กรัมในน้ำกลั่น และปรับพีเอชด้วย HCl ให้ได้เป็น 6.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

<u>สารละลาย D</u> : 10% Ammonium persulfate (ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

<u>TEMED</u> : N,N,N,N,-tetramethyl ethylene diamine

เตรียมได้จากการผสม น้ำกลั่น, สารละลาย A, B, C, D และ TEMED เรียงตามลำดับดังนี้

	12.0% Resolving gel (มล.)	4.5% Stacking gel (มล.)
น้ำกลั่น	6.00	3.6
สารละลาย A	7.5	0.9
สารละลาย B	4.5	-
สารละลาย C	-	1.5
สารละลาย D	0.07	0.018

TEMED	0.01	0.01

ปิเปตดูดสารละลาย resolving gel โดยผสมสารต่าง ๆ ตามตารางใส่ลงในระหว่างแผ่นแก้วของชุดแผ่นแก้วที่ใช้สำหรับทำ slab gel จากนั้นค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัว เทส่วนบนที่เป็นน้ำกลั่นทิ้งไปและซับให้แห้ง จากนั้นปิเปตดูดสารละลาย stacking gel ที่เตรียมไว้ตามตาราง เทลงบน resolving gel แล้วจึงสอด comb ลงไป เพื่อให้เกิดเป็นช่องสำหรับใส่สารที่ต้องการแยกเจล

12. 0.1 M sodium acetate buffer (พีเอช 5.0) (Perrin and Dempsey, 1974)

<u>สารละลาย A</u> : 0.2 M acetic acid (conc.CH_3COOH 1.14 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร)

<u>สารละลาย B</u> : 0.2 M sodium acetate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 27.216 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

เตรียมได้จาก การผสมสารละลาย A x มล.กับ สารละลาย B (50-x) มล. ตามพีเอชที่ต้องการ จากนั้นเจือจางจนได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

A (มล.)	พีเอช	A (มล.)	พีเอช
46.3	3.6	20.0	4.8
44.0	3.8	14.8	5.0
41.0	4.0	10.5	5.2
36.8	4.2	8.8	5.4
30.5	4.4	4.8	5.6
25.5	4.6		

13. แผ่นเจลที่มี Glycol chitin (Pan, *et al.*, 1991)

ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	5.5	มล.
30% acrylamide solution	3.0	มล.
Glycol chitin	0.8	มล.
1 M Sodium acetate buffer (pH 5.0)	1.5	มล.
Ammonium persulfate	1.2	มล.
TEMED	0.015	มล.

14. 0.01% (w/v) fluorescent brightener 28 (Pan, *et al.*, 1991)

fluorescent brightener 28	0.1	กรัม
500 mM Tris-HCl buffer(pH 8.9)	1000.0	มล.

15. Staining (Laemmli, 1970)

Coomassie brilliant blue	2.5	กรัม
เมธานอล	500.0	มล.
กรดอะซิติก	100.0	มล.
น้ำกลั่น	400.0	มล.

16. Destaining (Laemmli, 1970)

เมธานอล	250.0	มล.
กรดอะซิติก	70.0	มล.
น้ำกลั่น	680.0	มล.

ภาคผนวก ข

การทดสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Mac Faddin, 1980)

1. การย้อมสีด้วยวิธีของแกรม

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

1.1 Crystal violet-ammonium oxalate

Solution A

Crystal violet (90%)	2.0	กรัม
Ethyl alcohol (95%)	20.0	มล.

Solution B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มล.

(ผสม Solution A และ B เก็บไว้ 24 ชม. ก่อนใช้กรองผ่านกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชา)

1.2 Gram's iodine

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มล.

1.3 Decolorizer

Ethyl alcohol	95.0%

1.4 Counter stain, Safranin

Safranin O	2.5	มล.
95% ethyl alcohol	10.0	มล.
น้ำกลั่น	100.0	มล.

วิธีการ :

นำเชื้อมาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ที่มีหยดน้ำ ทิ้งเชื้อให้แห้งแล้ว fix ด้านหลังสไลด์ผ่านเปลวไฟ หยด Gram's crystal violet จนท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ 30-60 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นหยด Gram's iodine จนท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 60 วินาที ล้างด้วย decolourizer และล้างด้วยน้ำประปาตามลำดับ ย้อมทับอีกครั้งด้วย Counter stain 15 วินาที แล้วล้างออกซับให้แห้ง

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

Catalase reagent

Hydrogen peroxide (H_2O_2)	3.0%

วิธีการ :

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอายุ 18-24 ชม. ไปวางบริเวณตรงกลางแผ่นสไลด์แล้วหยด H_2O_2 ลงไป อย่าทำสลับลำดับ เพราะจะทำให้เกิดผลบวกปลอม สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น หรืออาจทำการทดสอบได้โดยหยด H_2O_2 ลงไปบนเชื้อบริสุทธิ์ที่ขึ้นบนจานอาหารได้เลย แต่วิธีนี้ใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใช่ blood agar อ่านผลเป็นบวกเมื่อมีฟองก๊าซเกิดขึ้น

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

p-aminodimethylaniline monohydrochloride	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	10.0	มล.

(บรรจุขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็นจะทำให้ใช้ได้หลายวัน หากมีตะกอนให้อุ่นจนตะกอนละลาย)

วิธีการ:

หยด สารละลาย p-amino dimethyl aniline monohydrochloride เข้มข้น 1% ลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ให้หมาด ๆ ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชม.เป็นเส้นยาว 1-3 ซม.สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาที ถ้าเกิดสีม่วงตามแนวขีด แสดงว่าแบคทีเรียที่ทดสอบมีเอนไซม์ cytochrom C oxidase ถือว่าผลการทดสอบเป็นบวก

4. **การทดสอบคุณสมบัติบางประการบนอาหารเลี้ยง TSI**

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar) (พีเอช 7.4)

Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	15.0	กรัม
Proteose peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Dextrose(glucose)	1.0	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Phenol red (Acid, yellow; Alkaline, red)	0.024	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

(นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที)

วิธีการ :

เพาะเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชม. ในหลอดอาหารเอียง TSI แบบ stab ตลอดความลึกของหลอดอาหารและเขี่ยเชื้อบนผิวหน้าของอาหารที่เอียงด้วย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1-5 วัน เชื้อที่ผลิต H_2S ได้ จะให้สีดำของ ferrous sulfite ตามรอยต่อที่เพาะเชื้อ อ่านผลเป็นบวก

นอกจากจะทดสอบ H_2S ได้แล้ว หลอดอาหารเอียง TSI ยังสามารถทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ได้อีก 2 อย่าง คือ ทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต และทดสอบการเกิดก๊าซ เพราะในอาหาร TSI มีน้ำตาล 3 ชนิดคือ กลูโคส 1 ส่วน ซูโครส 10 ส่วน และแลคโตส 10 ส่วน โดยมี phenol red เป็นดัชนี ดังนั้น ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลในขบวนการหมักได้ จะเจริญที่ก้นหลอด แต่ถ้าใช้น้ำตาลในขบวนการหายใจ (oxidation)ได้ จะมีการเจริญที่ผิวหน้าเอียงของอาหาร และแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างเดียวในขบวนการหมัก ทำให้มีกรดเกิดน้อย จึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดส่วนที่ผิวจะมีสีแดง แต่ถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลแลคโตส หรือซูโครสได้จะมีสีเหลืองไปถึงผิวหน้าเอียงของหลอดด้วย เพราะมีกรดเกิดจำนวนมาก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีเลยแสดงว่าไม่มีการหมักเกิดขึ้น หากมีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาลจะพบฟองก๊าซอยู่ในหลอดอาหาร

5. การทดสอบการสร้าง methyl red และ acetyl methyl carbinol

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

5.1 <u>Methyl red-Voges-Proskauer medium (MR-VP medium)</u>

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0	กรัม
Bacto-dextrose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

(นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที)

5.2 Methyl red solution

Methyl red	1.0	กรัม
Ethanol	300.0	มล.
น้ำกลั่น	200.0	มล.

5.3 Voges-Proskauer test reagent

solution A

α napthol	5.0	กรัม
Ethanol 95%	100.0	มล.

solution B

Potassium hydroxide	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

วิธีการ :

เพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นำมาตรวจผลทุกวันจนครบ 4 วัน การทดสอบ methyl red เป็นการตรวจสอบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณเพียงพอที่จะทำให้ พีเอชลดลงถึง 4.2 หรือน้อยกว่าได้หรือไม่ โดยหยดสารละลาย methyl red ลงไปใน MR-VP medium ที่มีเชื้อเจริญอยู่ 2-3 หยด ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าผลเป็นบวก แต่ถ้ายังคงสีเหลืองแสดงว่าผลเป็นลบ ส่วนการทดสอบการสร้าง acetyl methyl carbinol ทำโดยหยด solution A 0.6 มล. และ solution B 0.2 มล.ลงใน MR-VP medium ที่มีเชื้อเจริญอยู่อีกส่วนหนึ่งซึ่งแบ่งไว้ ถ้าเกิดสีแดงจะได้ผลบวก ส่วนหลอดที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจะบันทึกผลเป็นลบ

6. การทดสอบการสร้าง indole

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ:

6.1 Tryptone broth

Bacto-trytone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม

น้ำกลั่น	1000.0	มล.

6.2 Kovac's reagent

Para-dimethyl-aminobenzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or butyl alcohol	75.0	มล.
Hydrochloric acid concentrate	25.0	มล.

(ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน บรรจุในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น)

วิธีการ :

เพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร tryptone broth และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่ 37°ซ ตรวจผลเมื่อเชื้ออายุ 1 และ 2 วัน โดยหยด Kovac's reagent 0.5 ถึง 1.0 มล. ลงใน tryptone broth ที่มีเชื้อเจริญอยู่ เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ จะเกิดสารละลายสองชั้น ถ้าสีของชั้นแอลกอฮอล์ที่อยู่ส่วนบนของสารละลายมีสีแดง แสดงว่ามี indole เกิดขึ้น บันทึกผลเป็นบวก แต่ถ้าสีของชั้นแอลกอฮอล์เป็นสีเหลือง แสดงว่าไม่มี indole เกิดขึ้น บันทึกผลเป็นลบ

7. **การทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ**

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

Glucose OF-medium (พีเอช 6.8)

Peptone	2.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
Agar	2.0-3.0	กรัม
Bromthymol blue	0.03-0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

(นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที)

วิธีการ :

เพาะเชื้อแบบ stab ตลอดความลึกของหลอดอาหาร Glucose O-F จำนวน 2 หลอด หลอดแรกเททับด้วยพาราฟินเหลวปราศจากเชื้อหนา 2-3 ซม. เพื่อให้เชื้อเจริญในสภาพไม่มีอากาศ ส่วนอีกหลอดไม่เททับพาราฟิน เพื่อให้เจริญในสภาพมีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลจนครบ 7 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ถือว่าเป็นผลบวก

8. การทดสอบสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

8.1 Phenol red broth base (pH 7.4)

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Phenol red (Acid,yellow; Alkaline,pink-red)	0.018	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

(ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นปรับ พีเอช ให้ได้ 7.4 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่ 45-50°ซ)

8.2 น้ำตาล

น้ำตาลที่ใช้ส่วนมากได้แก่ glucose, lactose, sucrose, mannitol, dulcitol, salicin, adonitol, inositol, sorbitol, arabinoes, raffinose, rhomnose, xylose, trehalose, cellobiose, galactose, inulin, fructose, และ melibiose

ในการเตรียมมักนิยมใช้ความเข้มข้นของน้ำตาล 1.0% ยกเว้น salicin ใช้ 0.5% เตรียมโดยละลายน้ำตาลแต่ละชนิดแยกกันให้ได้ความเข้มข้น 10% ในน้ำกลั่นแล้วนำไปกรองผ่าน millipore membrane filter ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเติมลงใน sterile phenol red broth base ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5%

หรือ 1.0% ตามต้องการ (โดยการเติม 50 มล.ของ salicin ลงใน phenol red broth base 1 ลิตร หรือ 100 มล.ของน้ำตาลตัวอื่นลงไป) แบ่งใส่หลอดละ 4-5 มล. เฉพาะหลอดที่เป็นน้ำตาลกลูโคสให้ใส่ Durham tube ลงไปด้วย

วิธีการ :

เพาะเชื้อลงในหลอดทดสอบที่มีส่วนผสมของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ตามต้องการ บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ตรวจผลจนครบ 7 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีแดงส้มเป็นสีเหลือง ถือว่าเป็นผลบวก

9. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (Decarboxylase)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ:

Falkow lysine decarboxylase broth pH 6.8

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	1.00	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
L-amino acid (L-arginine,		
L-lysine หรือ L-ornitine)	5.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มล.

(ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้ได้ 6.8 ด้วย 1N NaOH แล้วนำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 15 นาที

วิธีการ :

เพาะเชื้อลงในหลอดอาหาร Falkow decarboxylase broth ที่มีส่วนผสมของกรดอะมิโน L-arginine, L-lysine หรือ L-ornitine เข้มข้น 1% (w/v) นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35°ซ ตรวจผลทุกวันจนครบ 4 วัน โดยสังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าเป็นสีม่วงแสดงว่าเกิด decarboxylation ในขณะที่ชุดควบคุมและชุดที่ให้ผลลบจะเป็นสีเหลือง

10. การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ :

Nutrient starch

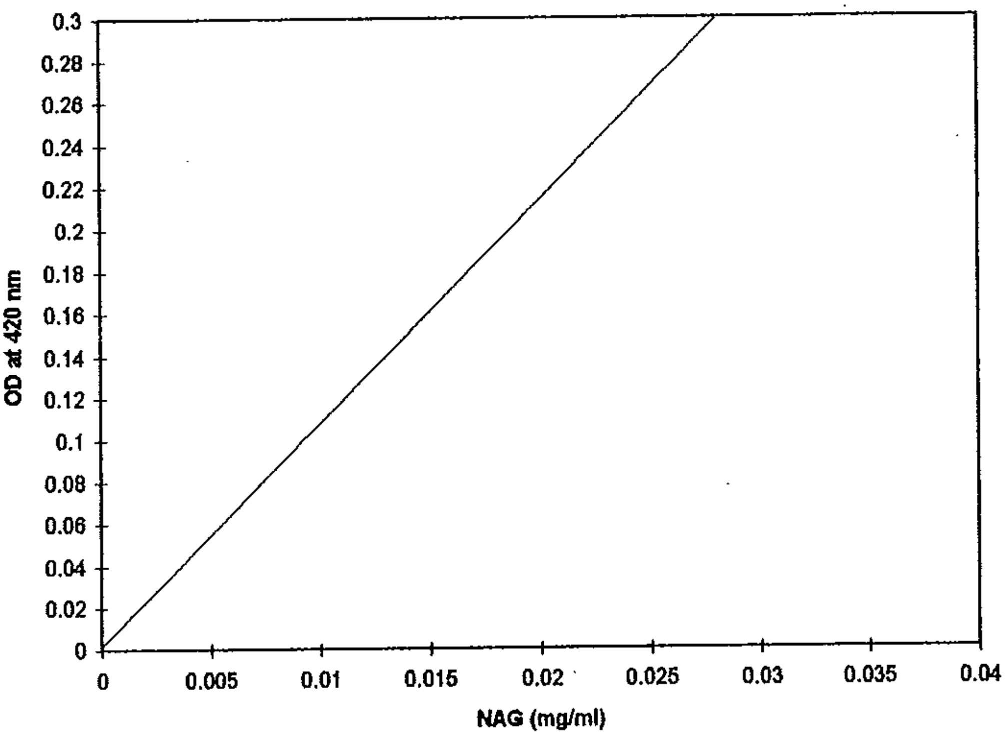
Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Starch	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

วิธีการ :

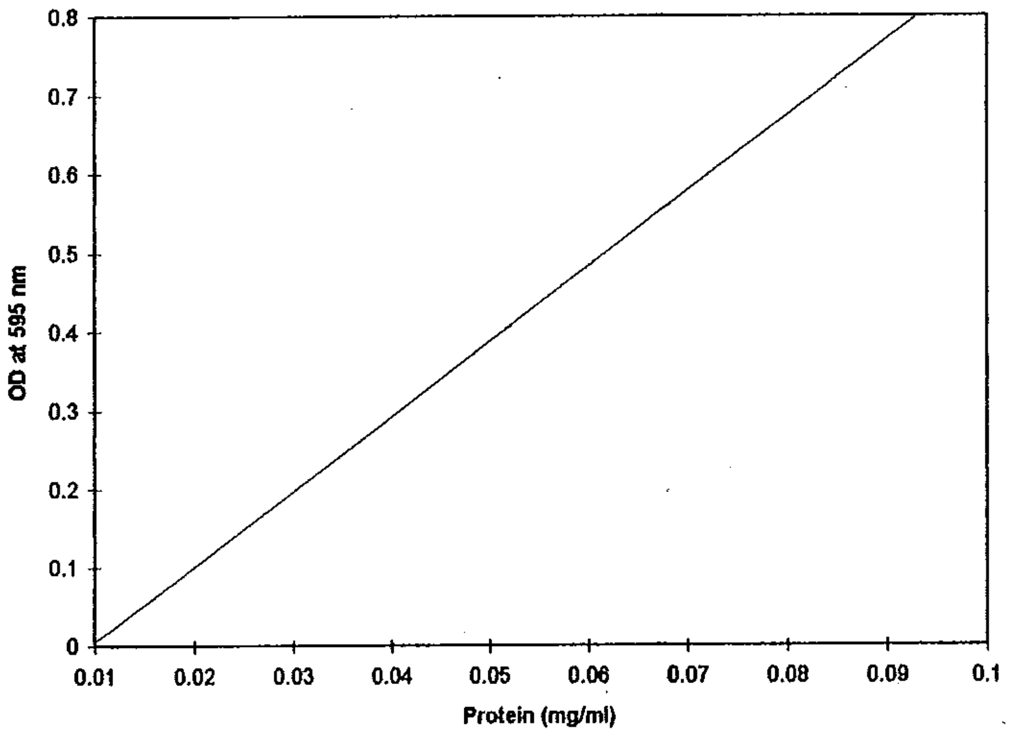
โดยเพาะเชื้อลงในจานอาหาร Nutrient starch นำจานอาหารที่ได้ไปบ่มที่ 37°ซ ตรวจผลทุกวันเพื่อสังเกตการเกิดบริเวณใสบนจานอาหาร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตราฐาน



ภาคผนวก ค.1 กราฟมาตราฐานของ N-acetyl-D-glucosamine



ภาคผนวก ค.2 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumine

สารละลายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 10 มล.

ปั่น 10,000 รอบต่อนาที, 10 นาที

ดูดส่วนใสมา 0.1-0.1 มล.

+ 1 มล. Chitin suspension

+ 1 มล. 0.6 M Citric acid-1.2 M Na_2HPO_4 buffer พีเอช 5.1

+ 1 มล. ไคโตไบเอส

ปรับปริมาตรเป็น 4 มล.ด้วยน้ำกลั่น

หลอดที่หนึ่ง 2 มล. ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

หลอดที่สอง 2 มล. บ่มที่ 37°ซ; 180 นาที

ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

วางในน้ำเย็น

ปั่น 10,000 รอบต่อนาที, 10นาที

ดูดส่วนใส 0.5 มล.

+0.8 M $Na_2B_4O_7$,0.1 มล.

ต้มในน้ำเดือด 3 นาที

+ DMAB solution 3 มล.

วางใน Water bath 37°ซ 20 นาที

วางทิ้งไว้ให้เย็น

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร

โดยมีหลอดที่หนึ่งเป็น blank

รูปภาคผนวก 1 ขั้นตอนการหากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสโดยการวัดปริมาณของ N-acetyl-β-D-glucosamine ตามวิธีของ Jeuniaux (1986)

สารละลายเชื้อที่เลี้ยงไว้ 10 มล.

ปั่น 10,000 รอบต่อนาที, 10 นาที

ส่วนใสที่ได้จากการปั่น 0.1 มล.

+0.5 mM Tris-HCl buffer พีเอช 7.5,

3.8 มล.

+Colloidal chitin 0.1 มล.

หลอดที่หนึ่ง 2 มล. ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

หลอดที่สอง 2 มล. บ่มที่ 50°ซ, 20 นาที

ต้มในน้ำเดือด 15 นาที

วางในน้ำเย็น

ปั่น 10,000 รอบต่อนาที, 10 นาที

ดูดส่วนใส 1.5 มล.

+Potassium ferricyanide 2 มล.

ต้มในน้ำเดือด 15นาทีวางในน้ำเย็น

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

โดยมีหลอดที่หนึ่งเป็น blank

รูปภาคผนวก 2 ขั้นตอนการหากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
ด้วยวิธีของ Tsujibo และคณะ (1991)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ ทัศนีย วาหะ

วัน เดือน ปี เกิด 5 สิงหาคม 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต(ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศิลปากร	2534