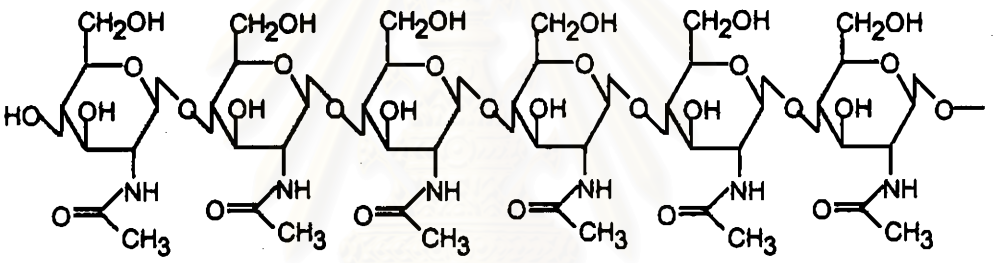
บทที่ 1

บทนำ

ไคทิน (Chitin)

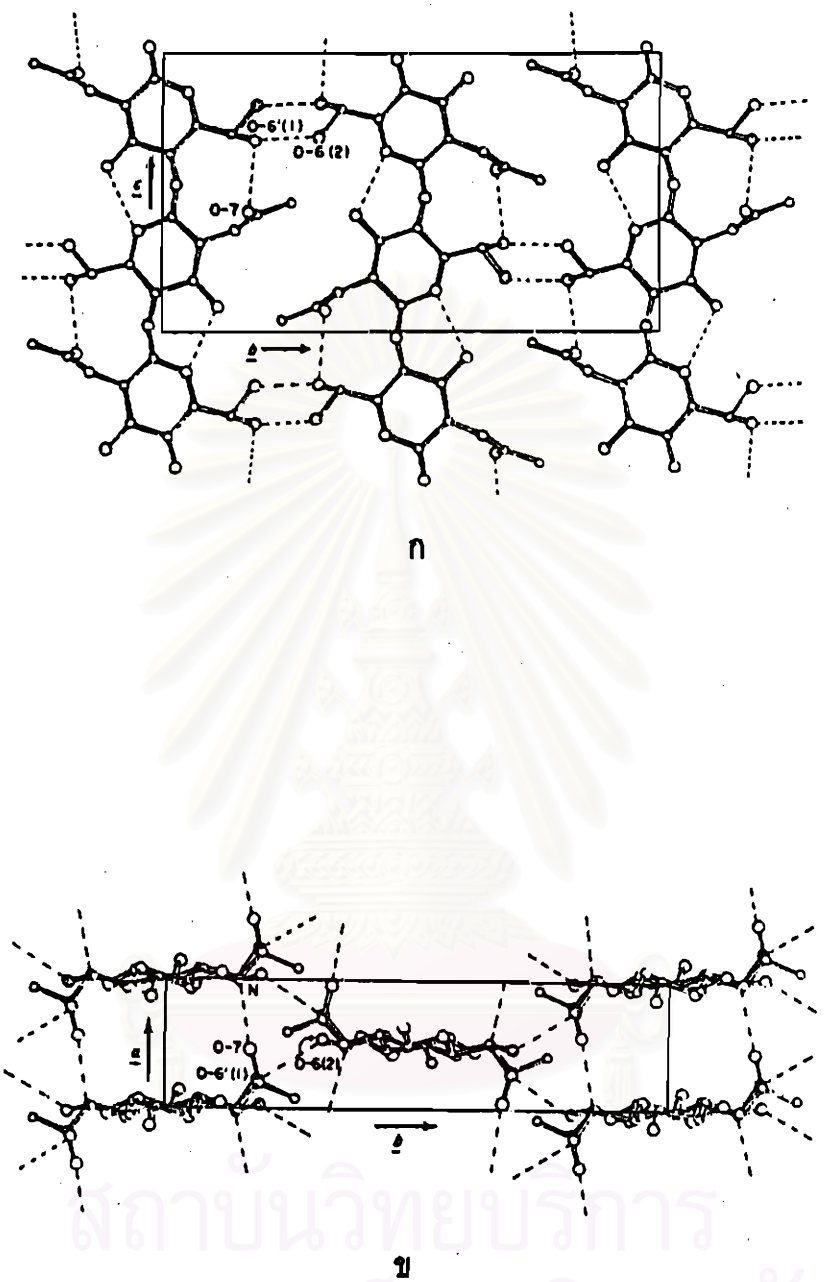
ไคทินเป็นสายพอลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine (NAG) ที่จับกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic (รูปที่ 1) Braconnot เป็นผู้ค้นพบไคทินเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 จากเห็ด *Agaricus valvaceus* (Muzzarelli,1977) ไคทินเป็นพอลิเมอร์ที่มีอยู่มากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส พบในรา (fungi) ครัสเตเชียน (crustacean) และแมลง (insects) ซึ่งทำหน้าที่เป็นเปลือกนอกแข็งของสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิด และเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา ไคทินที่พบในธรรมชาติมีอยู่ 3 ชนิดได้แก่ แอลฟา-ไคทิน (α-chitin) บีทา-ไคทิน (β-chitin) และ แกมมา-ไคทิน (γ-chitin) โดยไคทินทั้ง 3 ชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกันคือ α-chitin มีการจัดเรียงตัวของชีท (sheet) ของสายพอลิเมอร์ของ NAG ในแบบ antiparallel เกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่างชีท เป็นผลให้ไคทินที่มีโครงสร้างแบบนี้มีความแข็งแรงอย่างมาก ซึ่งจะพบในครัสเตเชียน แมลง และรา เป็นต้น และมีอยู่เป็นจำนวนมากในธรรมชาติ (รูปที่ 2) β-chitin มีการจัดเรียงตัวของชีทของสายพอลิเมอร์ของ NAG ในแบบ parallel ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นเฉพาะในชีท แต่ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนขึ้นระหว่างชีท ซึ่งจะพบที่บริเวณหนาม (spines) ของ *Aphrodite* น้ำหมึกของ *Loligo* หลอด (tubes)ของ *Pogonophora* และ หนามของไดอะตอมบางชนิด เป็นต้น ไคทินชนิดนี้มีอยู่เป็นจำนวนน้อยกว่า α-chitin (รูปที่ 3) สำหรับ γ-chitin มีการจัดเรียงตัวในแบบที่สลับกันระหว่าง antiparallel และ parallel โดยเป็น parallel 2 ชีทตามด้วย antiparallel 1 ชีท ซึ่งจะพบในกระเพาะของ *Luligo* เป็นต้น ไคทินชนิดนี้พบได้น้อยมากในธรรมชาติและมีการศึกษาถึงรายละเอียดไม่มากนัก (Gardner และ Blackwell, 1975 ; Blackwell, 1988 ; Sugiyama และคณะ, 1999)

ไคทินที่พบในธรรมชาติมักจะไม่เป็นผลึกของ NAG ล้วนๆ (non-crystalline homopolymers) มีความผันแปรของดีกรีการเกิดผลึก (degree of crystallinity) ปริมาณของหมู่อะซีทิลในสายไคทิน และการจับกับโมเลกุลอื่น (copolymer) ซึ่งได้แก่ ในราไคทินจับกับβ-glucans ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Wessel, 1988) ในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังไคทินจับ



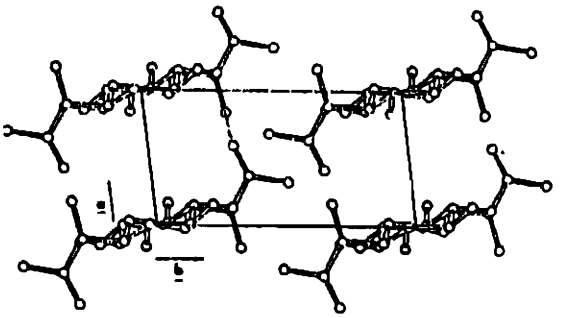
รูปที่ 1 โครงสร้างของไคทิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

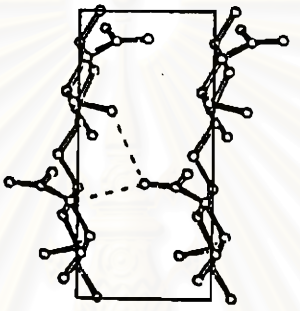


รูปที่ 2 โครงสร้างของ α-chitin ก. bc projection ข. ab projection (Blackwell, 1988)

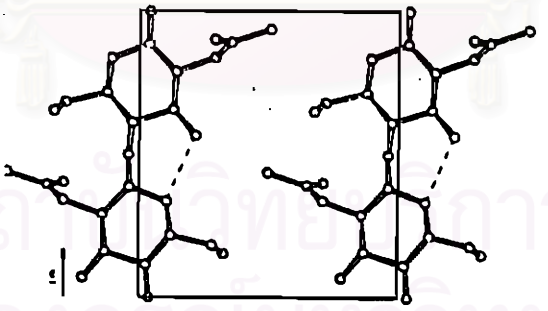
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



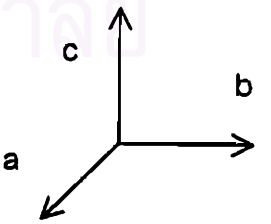
ก



ข



ค



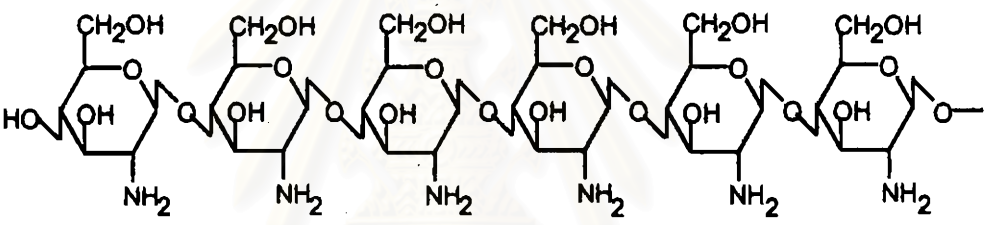
รูปที่ 3 โครงสร้างของ β-chitin ก. ab projection ข. ac projection ค. bc projection (Blackwell, 1988)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กับโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Giraud-Guille และ Bouligand, 1986) ในสัตว์ประเภทครัสเตเชียนไคทินจับกับแคลเซียมคาร์บอเนตที่บริเวณเปลือกนอกแข็ง ในพืชไคทินจับกับเซลลูโลส และในสัตว์ไคทินจับกับคอลลาเจน เป็นต้น (Davis และ Hayes, 1988) ส่วนที่เป็น highly crystalline ได้แก่ β-chitin ที่พบใน pogonophore tubes และ spines ของไดอะตอมบางชนิด (Gardner และ Blackwell, 1975)

อนุพันธุ์ของไคทินชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญคือไคโตแซน (chitosan) (รูปที่ 4) ความแตกต่างของไคทินและไคโตแซนขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่อะซีทิลในโมเลกุลของ D-glucosamine โดยปกติไคทินมีหมู่อะซีทิลมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไคโตแซนจะมีหมู่อะซีทิลน้อยกว่า 40 เปอร์เซนต์ ดังนั้นไคทินและไคโตแซนจึงเป็นโคพอลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine และ D-glucosamine โดยจะเรียกไคทินเมื่อโคพอลิเมอร์นี้ประกอบด้วยไนโตรเจนน้อยกว่า 7 เปอร์เซนต์ และจะเรียกไคโตแซนเมื่อประกอบด้วยไนโตรเจนมากกว่า 7 เปอร์เซนต์ (Davis และ Hayes, 1988) เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์ไคทินคือไคทิเนส ส่วนเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์ไคโตแซนคือไคโตแซนเนส (chitosanase) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลถึงความแตกต่างของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังไม่มีความชัดเจนเท่าใดนัก (Ando และคณะ, 1992) Mitsutomi และ Ohtakara (1990) ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาความแตกต่างของรูปแบบในการไฮโดรไลซ์ไคโตแซนที่ถูกเติมหมู่อะซีทิลบางส่วน (partially N-acetylated chitosan) โดยไคทิเนสและไคโตแซนเนสจากจุลินทรีย์พบว่า การทำงานของไคโตแซนเนสมีความแตกต่างจากไคทิเนสโดยจะมีความจำเพาะกับพันธะ β-D-glucosaminidic แต่ไม่จำเพาะกับพันธะ N-acetyl-β-D-glucosaminidic (Mitsutomi และ Ohtakara, 1990) นอกจากนี้มีการศึกษาถึงผลของ deacetylation ต่อความสามารถในการละลายของไคทิน พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณของ deacetylation กับความสามารถในการละลายน้ำ โดย Sannan และคณะ (1975) พบว่าไคทินที่เกิด deacetylation ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถละลายน้ำได้ แต่ถ้าปริมาณของ deacetylation แตกต่างไปจากนี้จะมีผลต่อการละลายซึ่งอาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายปัจจัยด้วยกันเช่น โครงสร้างทุติยภูมิเปลี่ยนไปหรือสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic property) เปลี่ยนไปเมื่อจำนวนของหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้นหรือลดลง (Sannan และ คณะ, 1975)

นอกจากไคโตแซนแล้วยังมีอนุพันธุ์ของไคทินอื่นอีกหลายชนิดที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อนำมาใช้ในด้านต่างๆ อนุพันธุ์เหล่านี้ได้แก่ คอลลอยดัลไคทิน (colloidal chitin) เตรียมโดย



รูปที่ 4 โครงสร้างของไคโตแซน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การไฮโดรไลซ์ไคทินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น อัลคาไลน์ไคทิน (alkaline chitin) เตรียมโดยนำไคทินมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไกลคอลไคทิน (glycol chitin) หรือ O-2-ไฮดรอกซีเอทธิลไคทิน (O-2-hydroxyethyl chitin) เตรียมโดยนำอัลคาไลน์ไคทินมาทำปฏิกิริยากับเอทธิลินคลอโรไฮดริน หรือ 2-คลอโรเอทธานอล คาร์บอกซีเมทธิลไคทิน (carboxymethyl chitin,CM-chitin) เตรียมโดยนำอัลคาไลน์ไคทินมาทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรอะซิติก โดยทั้งไกลคอลไคทินและคาร์บอกซีเมทธิลไคทินมีสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้และถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยไคทิเนสและไลโซไซม์ (lysozyme, EC 3.2.1.17) (Hirano, 1988) อนุพันธุ์ของไคทินเหล่านี้ถูกนำมาใช้เหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ผลิตไคทิเนส ใช้เป็นสับสเตรทของไคทิเนสเพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายและ/หรือในเจลอิเล็กโทรฟอรีซีส ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติของอนุพันธุ์ของไคทินแต่ละชนิด

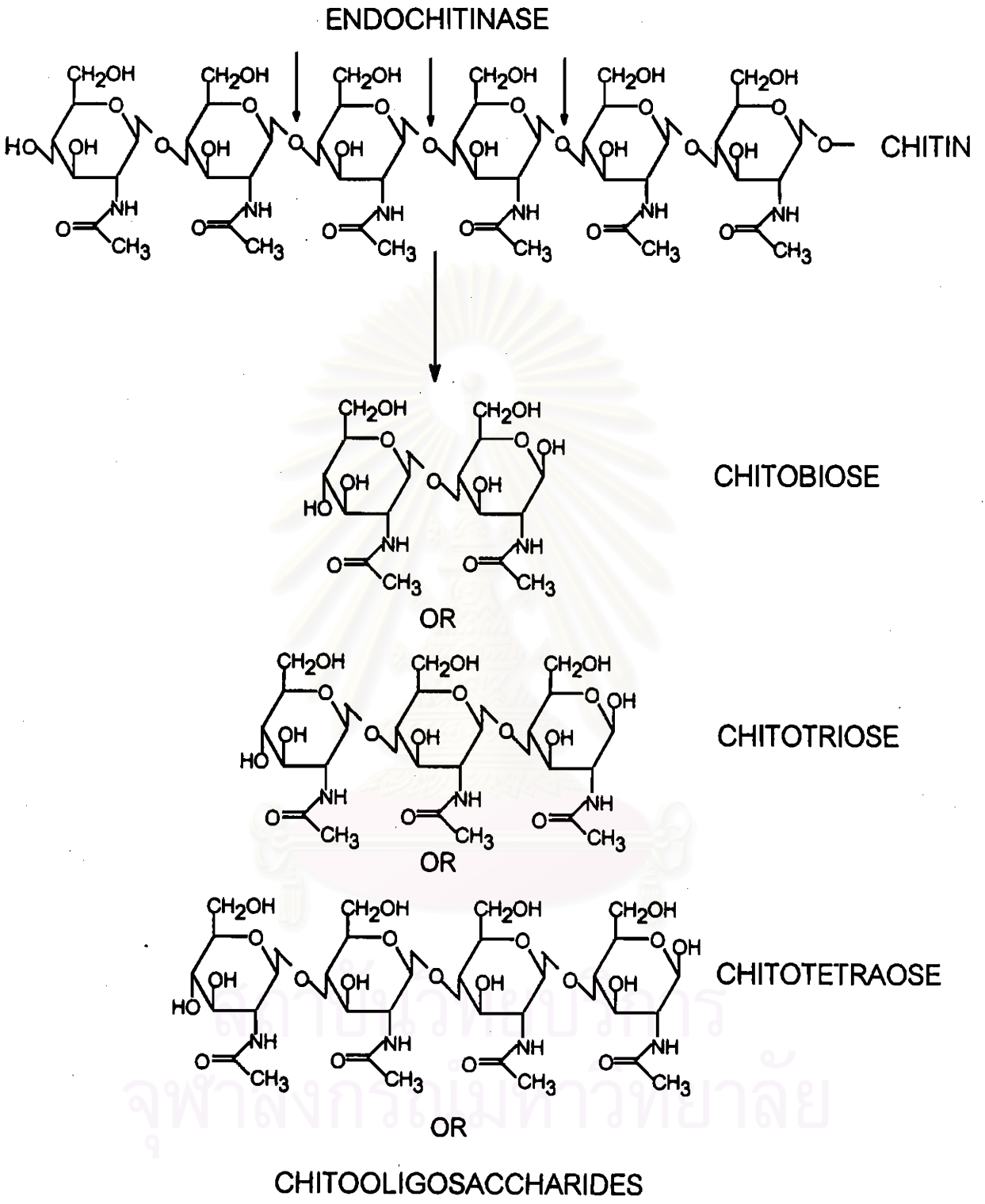
ไคทิเนส (Chitinase)

Bernard ได้ให้คำอธิบายเกี่ยวกับไคทิเนสไว้เป็นครั้งแรก เมื่อปีค.ศ.1911 เขาเป็นผู้ค้นพบไคทิเนสที่มีคุณสมบัติที่ไวต่อความร้อน (thermosensitive) และสามารถต้านทานการแพร่กระจายของราในกระเปาะของกล้วยไม้ (orchid bulbs) ได้ และในปีค.ศ.1929 Karrer และ Hofman ได้ค้นพบไคทิเนสในทาก ต่อมาผลการวิจัยของ Jeuniaux ก็ได้นำมาซึ่งความรู้ใหม่ๆ ที่น่าสนใจเกี่ยวกับไคทิเนสมากขึ้น (Flach และคณะ, 1992)

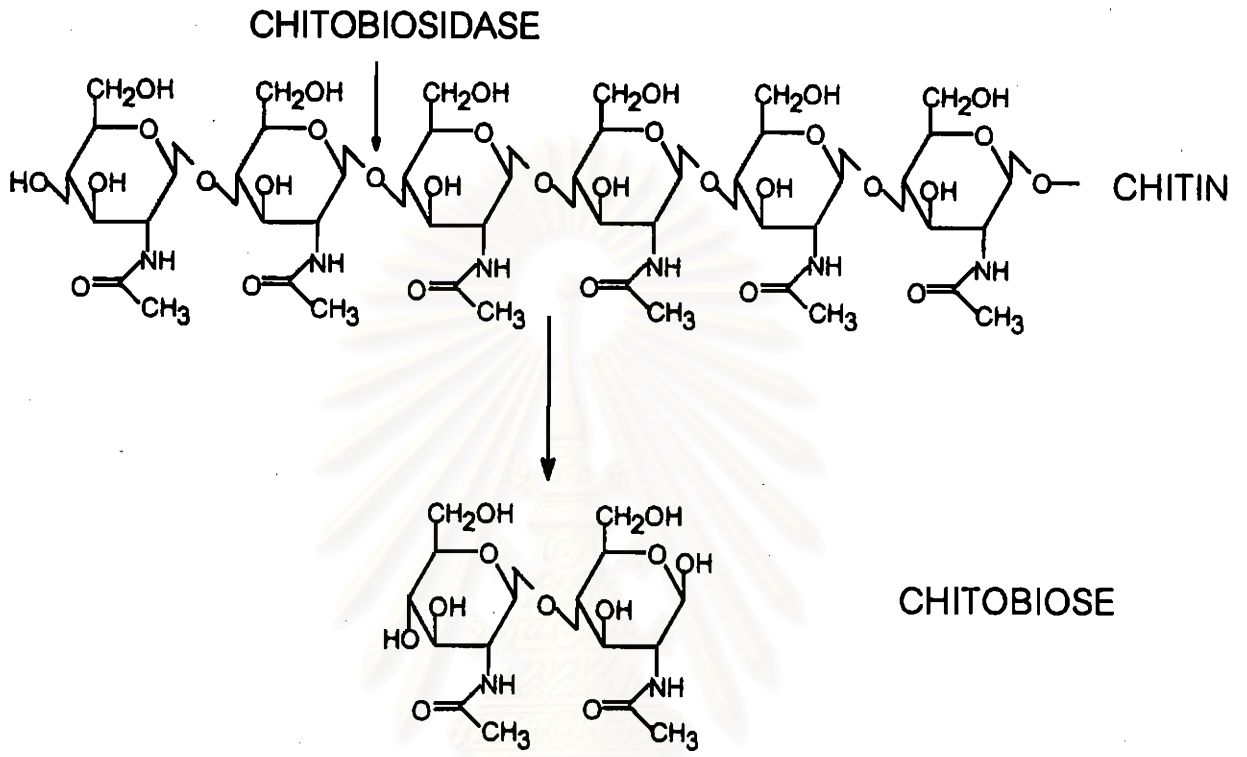
ไคทิเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของน้ำตาล N-acetylglucosamine 2 หน่วย ที่อยู่ติดกันในสายไคทิน (Flach และคณะ, 1992) พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ รา จุลินทรีย์ แมลง สัตว์และพืชชั้นสูงบางชนิด ไคทิเนสที่พบในปัจจุบันมีความหลากหลายและมีความสามารถในการย่อยสลายไคทินแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม Sahai และ Manocha (1993) ได้จัดกลุ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เป็น 3 ชนิดคือ เอ็นโดไคทิเนส (endochitinase,EC 3.2.1.14) (รูปที่ 5ก.) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของ NAGแบบสุ่มภายในของสายไคทินจากปลาย nonreducing ได้ผลิตภัณฑ์เป็น multimer ของ NAG ที่สามารถละลายน้ำได้ ได้แก่ ไคโทเตตระโอส (chitotetraose) ไคโทไตรโอส (chitotriose) และ ไดอะซีทิลไคโทไบโอส (diacetylchitobiose) เอ็กโซไคทิเนส (exochitinase) หรือไคโทไบโอซิเดส (chitobiosidase) หรือไคทิน-1,4-เบต้า-ไคโทไบโอซิเดส

(chitin-1,4-β-chitobiosidase) (รูปที่ 5ข.) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของสายไคทินจากปลาย nonreducing เข้ามาทีละ 2 โมเลกุล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดอะซีทิลไคโทไบโอส (diacetylchitobiose) เพียงอย่างเดียวเท่านั้น และเอ็น-อะซีทิล-เบต้า-1,4-ดี-กลูโคซามินิเดส (N-acetyl-β-1,4-D-glucosaminidase,EC 3.2.1.30) เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของ diacetylchitobiose และ ไคทินเชิงอุปมาน (analogs of chitin) ซึ่งได้แก่ chitotriose และ chitotetraose จากปลาย nonreducing ได้ผลิตภัณฑ์เป็น NAG โดยเอ็นไซม์ชนิดที่ 3 นี้จะรวมถึงไคโทไบเอส (chitobiase,EC 3.2.1.29) ซึ่งจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของ diacetylchitobiose เท่านั้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็น NAG (Sahai และ Manocha, 1993) (รูปที่ 5ค.)

สิ่งมีชีวิตที่มีไคทินเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตไคทิเนสได้ แต่ก็มีสิ่งมีชีวิตบางชนิดที่ไม่มีไคทินเป็นองค์ประกอบแต่สามารถผลิตไคทิเนสได้เช่นกัน ได้แก่ แบคทีเรีย พืชชั้นสูง และสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังบางชนิด (Flach และคณะ, 1992) หน้าที่ของไคทิเนสแบ่งออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ หน้าที่สำคัญของไคทิเนสที่พบในรา ครัสเตเซียน และ แมลง ช่วยในการย่อยไคทินเพื่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ มีการทดลองพบว่าในช่วงเวลาของการลอกคราบของแมลงจะมีการขับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไคทิน 2 ชนิดประกอบด้วย endochitinase และ β-N-acetylglucosaminidase เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันไฮโดรไลซ์ไคทินโดยเริ่มจาก endochitinase เข้าตัดไคทินแบบสุ่มได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ละลายน้ำได้ ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ต่อด้วย β-N-acetylglucosaminidase ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ NAG เรียกระบบการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดดังกล่าวว่า binary chitinase system (Fukamizo และคณะ, 1986) นอกจากนี้ *Metarhizium anisopliae* เป็นราที่ทำให้เกิดโรคในแมลงหลายชนิด (entomopathogenic fungus) สามารถผลิตไคทิเนสเข้าสู่เคลือบผิว (cuticle) ของแมลงได้ จึงเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) วิธีหนึ่ง (Siqueira Pinto และคณะ, 1997) พืชผลิตไคทิเนสเพื่อต่อต้านรา สำหรับแบคทีเรียผลิตไคทิเนสเพื่อย่อยไคทินเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Roberts และ Selitrennikoff, 1988)

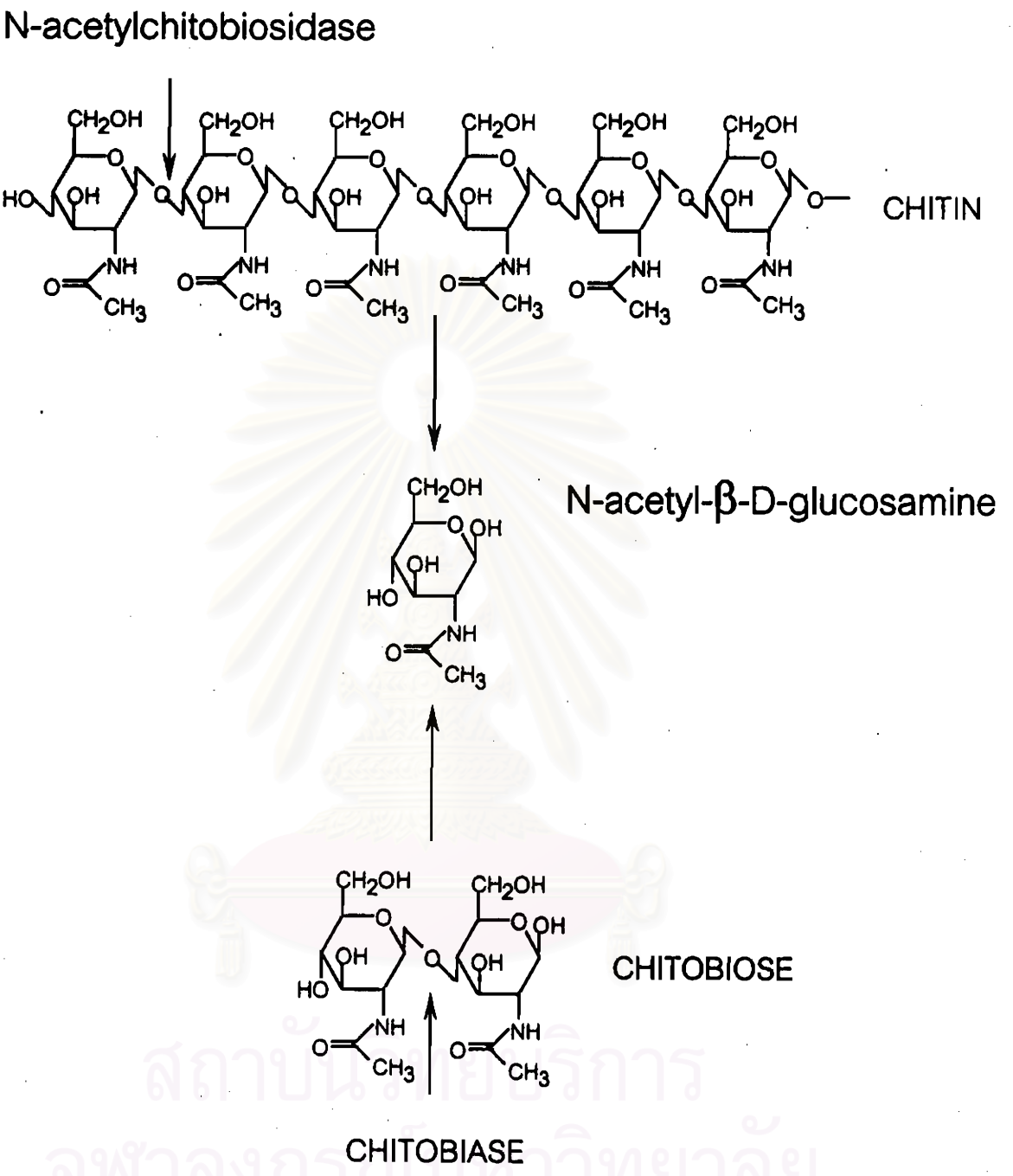


รูปที่ 5ก. รูปแบบของ endochitinase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 5ข. รูปแบบของ chitobiosidase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5ค. รูปแบบของ N-acetylglucosaminidase และ chitobiase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและไคโทไบโอส ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งของไคทิเนส (ตารางที่1)

ไคทิเนสจากพืช (Plant chitinase) มีการศึกษาเกี่ยวกับไคทิเนสจากพืชอย่างกว้างขวางที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไคทิเนสจากแหล่งอื่น ไคทิเนสจากพืชมีทั้งที่ผลิตขึ้นโดยมิได้มีการเหนี่ยวนำ (constitutive chitinase) และผลิตขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำ (Flach, 1992) พืชที่ผลิตไคทิเนสโดยมิได้การเหนี่ยวนำได้แก่ ต้นยาง (*Hevea brasiliensis)* ซึ่งพบว่ามีไคทิเนสอยู่ในน้ำยาง (latex) เป็นจำนวนมาก (Martin, 1991) สำหรับปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้พืชผลิตไคทิเนสมีอยู่หลายปัจจัยได้แก่ การให้เอทธิลีน (Abeles และคณะ, 1970) มีการทดลองหลายการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าเอทธิลีนสามารถเหนี่ยวนำให้พืชผลิตไคทิเนสได้ เช่น การทดลองของ Boller และคณะ (1983) พบว่าแอคติวิตีของไคทิเนสเพิ่มขึ้นถึง 30 เท่า หลังการให้เอทธิลีนกับต้นอ่อนถั่ว (Boller และคณะ, 1983) การติดเชื้อ เช่น การติดเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) ในใบยาสูบและแตงกวา (Matraux และคณะ, 1988) Hedrick และคณะ (1988) ได้แสดงให้เห็นว่า elicitors จากราเป็นสาเหตุให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของไคทิเนสเพิ่มขึ้น 10 เท่า หลังเวลาผ่านไป 5 นาที และมีการสะสมเอนไซม์อยู่ในปริมาณมากที่บริเวณบาดแผลและบริเวณที่ติดเชื้อ (Hedrick และคณะ, 1988) และการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี เช่น salicylate หรือ mercuric chloride สามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไคทิเนสได้ แต่ผลของการใช้สารเคมีในการเหนี่ยวนำไม่มีความจำเพาะ เนื่องจากกลไกการต้านทานอื่นถูกเหนี่ยวนำในเวลาเดียวกันด้วย ไคทิเนสจากพืชเป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25-40 กิโลดาลตัน แบ่งออกได้ 3 กลุ่ม (class) โดยใช้ลำดับของกรดอะมิโนเป็นเกณฑ์ในการแบ่งดังนี้ (Flach และคณะ, 1992)

Class I ไคทิเนสใน class นี้ประกอบด้วย N-terminal cysteine-rich domain ประมาณ 40 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับไคทิน มี glycine และ proline-rich region แยก cysteine-rich domain ออกจาก catalytic domain มี leucine-rich หรือ valine-rich เป็น signal peptide ไคทิเนสใน class นี้ส่วนใหญ่มี pI เป็นเบส พบที่บริเวณแวคิวโอล แบ่งเป็น 2 subclasses ได้แก่ class Ia สำหรับไคทิเนสที่เป็นเบส (basic chitinases) และ class Ib สำหรับไคทิเนสที่เป็นกรด (acidic chitinases) ไคทิเนสใน class นี้พบได้ในต้นยาสูบ มะเขือเทศ ถั่ว (*Arabidopsis*) เป็นต้น

Class II ไคทิเนสใน class นี้จะเหมือนกับ class I แต่ส่วนของ cysteine-rich domain และ proline-rich small region ที่ต่อมานั้นหายไป นอกจากนี้บริเวณ signal peptide ยังแตกต่างจาก class I ด้วย มักพบว่าเป็น acidic chitinase และอยู่นอกเซลล์

Class III ไคทิเนสใน class นี้มีลำดับกรดอะมิโนไม่เหมือนกับ class I และ class II พบทั้งที่เป็น acidic chitinase และ basic chitinase

ไคทิเนสจากรา (Fungal chitinase) ราสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไคตินได้ทุกชนิด เช่น *Aspergillus nidulans* ผลิต endochitinase และ β-N-acetylglucosaminidase (Bernasconi และคณะ, 1986) *Penicillium oxalicum* ผลิต endochitinase (Rodriguez และคณะ, 1995) *Mucor rouxii* ผลิต exochitinase (Pedraza-Reyes และLopez-Romero, 1989) และ *Verticillium albo-atrum* ผลิต constitutive chitinase ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pegg, 1988) เป็นต้น

ไคทิเนสจากแมลง (Insect chitinase) ส่วนใหญ่จะพบที่บริเวณสิ่งห่อหุ้ม (integument) moulting fluid haemolymph และ ทางเดินอาหาร (alimentary canal) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 40-75 กิโลดาลตัน ไคทิเนสจากแมลงส่วนใหญ่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) แมลงที่ผลิตไคทิเนสได้แก่ *Bombyx mori* แมลงสาป (*Periplaneta americana*) (Leadbetter, 1962) นอกจากนี้มีการทดลองพบว่า allosamidin และ demetylallosamidin เป็นสารสำคัญในการยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้างไคทิเนสขึ้นในแมลงและ *Saccharomyces* sp.อีกด้วย (Flach และคณะ, 1992 ; Yamanaka และคณะ, 1994)

ไคทิเนสจากสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล (Marine invertibrate chitinase) ได้แก่ มอลลัส (mollus) ครัสเตเชียน (crustacean) เป็นต้น มีการทดลองพบ chitinase และ β-N-acetylglucosaminidase ใน *Euphasia superba* และ *Meganyctiphanes norvegica* ซึ่งมี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 5.0 และ 40-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และยังคงมีแอคติวิตีสูงในที่อุณหภูมิต่ำ แสดงให้เห็นถึงการปรับตัวเพื่อทำหน้าที่ได้ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำ (Flach และคณะ, 1992)

ไคทิเนสจากแบคทีเรีย (Bacteria chitinase) แบคทีเรียที่สามารถผลิตไคทิเนสได้มีทั้งแบคทีเรียกรัมลบได้แก่ *Psuedomonas Serratia Vibrio Photobactrium Aeromonas* และ *Chromobacterium* เป็นต้น และแบคทีเรียกรัมบวกได้แก่ *Streptomyces Arthrobacter Nocardia Bacillus* และ *Clostridium* เป็นต้น แบคทีเรียผลิตไคทิเนสออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ยืนยันโดยไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลล์ที่ผ่านการ

ล้าง และเซลล์ที่ทำให้แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) นอกจากนี้ Kless และคณะยังพบว่า chitobiase จาก *Serratia marcescens* ที่โคลน (clone) เข้า *E.coli* ถูกขับออกสู่เพริพลาสซึม (periplasm) อีกด้วย ไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity)สูง มีความเสถียรต่อ pH และมีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานกว้าง และจลนพลศาสตร์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงกว้างกว่าไคทิเนสจากแหล่งอื่น จึงเหมาะสมในการนำมาใช้ในการวิเคราะห์และใช้ในการย่อยสลายไคทินในระดับสเกลใหญ่ เพื่อจุดประสงค์ในทางอุตสาหกรรม (Cabib, 1988) Cody (1989) ได้ทำการจัดแบ่ง *Bacillus* ที่ผลิต chitinase และ chitobiase พบว่า *Bacillus* 10 ชนิด (species) จาก 29 ชนิดที่ผลิต chitinase ได้แก่ *B.chitinosporus* *B. pulvifaciens* *B. alvei* และ *B. licheniformis* เป็นต้น และ *Bacillus* อีก 15 ชนิดที่ผลิต chitobiase (Cody, 1989) ไคทิเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อยู่ในทะเลจะมีสมบัติที่แตกต่างไปจากไคทิเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อยู่บนพื้นโลกเนื่องจากสิ่งแวดล้อมในทะเลมีความแตกต่างจากสิ่งแวดล้อมบนพื้นโลกในด้านความเค็ม แรงดันน้ำ อุณหภูมิ และ สารอาหาร แบคทีเรียในทะเลที่ผลิตไคทิเนส ได้แก่ *Vibrio harveyi* (Svitil และคณะ, 1997) ไคทิเนสจากแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ A B และ C โดยแบ่งตามลำดับความเหมือนของกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนส A1 หรือ D จาก *Bacillus circulans* ซึ่งตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนส A1มีกรดอะมิโนที่สำคัญคือ Asp 200 และ Glu 204

กลุ่ม A ไคทิเนสในกลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่เหมือนกับไคทิเนส A1 ของ *Bacillus circulans* ได้แก่ chitinase A1 จาก *Bacillus circulans* chitinase A จาก *Serratia marcescens* chitinase C จาก *Streptomyces lividans* และ chitinase 85 จาก *Alteromonas* sp. เป็นต้น

กลุ่ม B ไคทิเนสในกลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่เหมือนกับไคทิเนส D ของ *Bacillus circulans* ได้แก่ chitinase D จาก *Bacillus circulans* chitinase Aและ B จาก *Streptomyces lividans* เป็นต้น

กลุ่ม C ไคทิเนสในกลุ่มนี้มีลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่ไม่เหมือนไคทิเนสในกลุ่ม A และ B ได้แก่ chitinase จาก *Streptomyces erythraeus* เป็นต้น

ลำดับของกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไคทิเนสในกลุ่มเดียวกันจะต้องมีความเหมือนกันมากกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดกลูตามิกและกรดแอสพาติกตรงตำแหน่ง 204 และ 200 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ไคทิเนสจากแหล่งต่างๆ

Source of chitinase (Reference)	Methods of purification	MW (kDa)	pH (optimum)	Temp. (optimum) (°C)	pI
Gladiolus gandavensis (Yamagami และคณะ, 1997)	-CM-cellulose column -Butyl Toyopearl 650M column -Sephadex G-75 column	30	5.0	-	6.0
-GBC-a	-Mono-S column	30	5.0	-	7.5
-GBC-b					
Japanese radish seeds (Kondo และคณะ, 1997)	-0-70% amm.sulfate precipitation	30.4	6.0	55-65	-
	-CM-Sephadex C-50 column	25.5			
	-Sephadex G-100 column				
Phaseolus vulgaris leaves (Boller และคณะ, 1983)	-Heat treatment -0-60% amm.sulfate precipitation -Regenerated chitin column	32.5	6.5	-	9.4
Allium porrum (Vergauwen และคณะ, 1998)	-Chitin column -Mono-Q column				
-Chitinase B		34	5	40	4.1
-Chitinase C		35	5	40	6.6
-Chitinase D_r		35	-	50	6.3
-Chitinase D		35	6	60	6.3
-Chitinase E		33	-	60	7.5
-Chitinase F		33	6	50	8.0
Metarhizium anisopliae (Pinto และคณะ, 1997)	-0-85% amm.sulfate precipitation -DEAE-Sephacel column	30	4.5-5.0	40-45	-

(ต่อ)

Source of chitinase (Reference)	Methods of purification	MW (kDa)	pH (optimum)	Temp. (optimum) (°C)	pI
Tricoderma hazianum (Ulhoa และ Peberdy, 1992)	-0-75% amm.sulfate precipitation -Q-Sepharose column -Sephadex G-100 column -Phenyl Sepharose CL-4B column	40	4.0-4.5	40	-
Rhizopus oligosporus (Yanai และคณะ, 1992)	-0-90% amm.sulfate precipitation -Regenerated chitin column				
-Chitinase I	-Sephadex G-75 column	50	4.0	-	-
-Chitinase II	-DEAE-Toyopearl column	52	3.5	-	-
Penicillium oxalicum (Rodriguez และคณะ, 1995)	-0-70% amm.sulfate precipitation -Anion and cation exchanger -Sephacry S-200 column	54.9	5.0	35	4.5
Mucor rouxii (Pedraza-Reyes และ lopez-Romero, 1988)	-0-60% amm.sulfate precipitation -Bio-Gel P-100 column -DEAE Bio-Gel A column				
-Chitinase I		30.7	6.5	30	-
-Chitinase II		24.2	6.5	30	-
Stomoxys calcitrans stable fly (Chen และคณะ, 1982)	-30-50% amm.sulfate precipitation -Sephadex IEF -Sephadex G-100 column -PAGE	48	5.0	-	4.9

(ต่อ)

Source of chitinase (Reference)	Methods of purification	MW (kDa)	pH (optimum)	Temp. (optimum) (°C)	pI
Bacillus sp. strain MH-1	-Chitin column				
(Sakai และคณะ, 1998)	-Chromatofocusing				
-Chitinase L		71	6.5	75	5.3
-Chitinase M		62	5.5	65	4.8
-Chitinase S		53	5.5	75	4.7
Enterobacter sp. G-1	-0-75% amm.sulfate precipitation				
(Park และคณะ, 1997)	-DEAE-Sephadex A-50 column				
-Chitinase A	-Sephadex G-100 column	60	7.0	40	6.6
Pseudomonas	-0-80% amm.sulfate precipitation				
aeruginosa K-187	-DEAE-Sepharose CL-6B column				
(Wang และ Chang, 1997)	-0-80% amm.sulfate precipitation				
	-Econo-Pac q column				
-F I		30	8	50	5.2
-F II		32	7	40	4.8
Streptomyces sp.	-0-70% amm.sulfate precipitation	29	-	-	-
(Skujins และคณะ, 1970)	-DEAE-cellulase column				
	-Hydroxylapatite column				
	-Bio-Gel P-150 column				
Bacillus sp. BG-11	-50-80% amm.sulfate precipitation	-	7.5-9.0	45-55	-
(Bhushan และ Hoondal,	-Affinity binding to chitin				
1998)	-Sephadex G-100 column				

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ต่อ)

Source of chitinase (Reference)	Methods of purification	MW (kDa)	pH (optimum)	Temp. (optimum) (°C)	pI
Bacillus circulans WL-12 (Watanabe และคณะ, 1990)	-0-40% amm.sulfate precipitation -Chitin adsorption -Sephadex G-100 column				
-Chitinase A1		74	-	-	4.7
-Chitinase A2		69	-	-	4.5
-Chitinase B1		38	-	-	6.6
-Chitinase B2		38	-	-	5.9
-Chitinase C		39	-	-	8.5
-Chitinase D		52	-	-	5.2
Bacillus stearothermophilus CH-4 (Sakai และคณะ, 1994)	-0-80% amm.sulfate precipitation -DEAE-cellulose -Butyl-Toyopearl -Sephadex G-100 -Mono-Q	74	6.5	75	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวัดแอคติวิตีของไคทิเนส

วิธีการวัดแอคติวิตีของไคทิเนสมีอยู่หลายวิธีด้วยกันซึ่งอาศัยหลักการคือ การวัดการเปลี่ยนแปลงของขนาดของอนุภาคของสับสเตรท และ การวัดปริมาณไคโทโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide) หรือ NAG ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา วิธีการวัดแอคติวิตีของไคทิเนสมีดังต่อไปนี้

การวัดความหนืด (Viscosimetric assay) เป็นวิธีการวัดความหนืดของสารละลายที่ลดลง สับสเตรทที่ใช้สำหรับการวัดโดยวิธีนี้ได้แก่ chitosan acetate glycol chitin และ carboxymethylchitin ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ละลายน้ำได้ อย่างไรก็ตามการใช้ chitosan acetate และ carboxymethylchitin เป็นสับสเตรทมีข้อเสียคือ ความเข้มข้นของไอออนและความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อความหนืด ส่วน glycol chitin ไม่มีข้อเสียดังกล่าวและมีความเหมาะสมในการวัดแอคติวิตีโดยวิธีนี้ (Ohtakara, 1988) อัตราการลดลงของความหนืดสุทธิขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ การเตรียมสับสเตรทซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละ batch วิธีนี้สามารถวัดแอคติวิตีน้อยๆ ได้ แต่เป็นวิธีที่ใช้เวลานานและต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณมาก (Jeuniaux, 1966 ; Cabib และ Bower, 1971)

การวัดความขุ่น (Nephelometric หรือ Turbidimetric method) เป็นวิธีการวัดความขุ่นของ colloidal chitin ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมในระหว่างที่มีการย่อย colloidal chitin เป็นวิธีที่รวดเร็ว แม่นยำ แต่เหมาะที่จะใช้วัดแอคติวิตีสูงๆ เท่านั้นและสารละลายไม่ควรมีสี (Jeuniaux, 1966)

การวัดสี (Colorimetric assay) เป็นการวัดสมบัติรีดิวซ์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยไคทิน โดยการวัดสีที่เกิดขึ้นเมื่อผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำปฏิกิริยากับ potassium ferricyanide (Schales, 1945 ; Imoto และ Yagishita, 1971) หรือ dinitrosalicylic acid (DNS) (Sumner และ Somers, 1944) หรือ p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) (Boller และ Mauch, 1988) เปรียบเทียบกับ NAG มาตรฐาน มีการใช้วิธีนี้อย่างแพร่หลายในการวัดแอคติวิตีทั้งใน จุลินทรีย์ สัตว์ และ พืช

การใช้สับสเตรทที่มีสี (Chromogenic assay) เป็นวิธีการวัดที่มีความจำเพาะสูงเนื่องจากใช้สับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้นให้มีขนาดโมเลกุลต่างๆ เพื่อตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยไคทิน โดยสับสเตรทที่ใช้คือ p-nitrophenyl-chitooligosaccharides และวัดปริมาณ p-nitrophenol (pNP) ที่เกิดขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง

สามารถวัดได้ทั้งปริมาณและคุณภาพ แต่มีข้อเสียคือสับสเตรทที่ใช้มีราคาแพงจึงไม่เหมาะกับงานที่ต้องทำเป็นประจำ (Roberts และ Selitrennikoff, 1988 ; Tronsmo และ Harman, 1993)

การใช้สารฟลูออเรสเซนซ์เป็นสับสเตรท (Fluorogenic assay) วิธีนี้คล้ายกับวิธีการใช้สับสเตรทที่มีสี แต่สับสเตรทที่ใช้กับวิธีนี้คือ 4-methylumbelliferyl-chitooligosaccharides และวัด 4-methylumbelliferone (4-MU) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำสับสเตรทนี้ไปใช้ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์หลังการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซีสได้ด้วยการเททับเจลด้วยอะกาโรสที่มีสับสเตรทชนิดนี้ที่เหมาะสำหรับการตรวจสอบเอนไซม์แต่ละชนิดผสมอยู่ด้วย แล้วส่องดูแถบแอคติวิตีภายใต้แสงอัลทราไวโอเลท (O'Brien และ Colwell, 1987 ; Tronsmo และ Harman, 1992)

การใช้สารรังสี (Radiometric method) เป็นวิธีการวัด diacetylchitobiose ที่เกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องย่อยให้เป็น NAG ก่อน จึงเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้วัดแอคติวิตีได้สะดวกรวดเร็ว มีความไวสูง สามารถวัดได้ทั้ง endochitinase และ exochitinase ด้วยการใช้ [acetyl-^{3}H]chitin เป็นสับสเตรท (Molano และคณะ, 1977 ; Cabib, 1988)

การตรวจสอบวงใส เป็นการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์จากวงใสที่เกิดขึ้นในอาหารแข็งที่มี colloidal chitin เป็นองค์ประกอบ เนื่องจาก colloidal chitin ถูกย่อยเป็น oligosaccharides สายสั้นๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้เกิดเป็นวงใส (Frandberg และ Schnurer, 1994)

การตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสหลังการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซีส เป็นวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจลที่มี glycol chitin เป็นสับสเตรท โดยย้อมด้วยสารละลายของ Calcofluor White M2R ซึ่งเป็นสารฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความจำเพาะกับ glycol chitin สูง (Maeda และ Ishida, 1967) ดังนั้นหากบริเวณใดที่ glycol chitin ถูกย่อยไปก็จะไม่ปรากฏสารฟลูออเรสเซนซ์ทำให้เมื่อนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงอัลทราไวโอเลทจะเห็นเป็นแถบสีดำบนพื้นสีขาว (Trudel และ Asselin, 1988)

การตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) **หรือ** High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นวิธีการวิเคราะห์ chitooligosaccharides ขนาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นหลังการย่อยไคทินในระยะเวลาหนึ่ง โดยเปรียบเทียบกับ chitooligosaccharides มาตรฐานขนาดต่างๆ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงรูปแบบ (mode) ในการเข้าตัดของเอนไซม์ ใช้วิเคราะห์ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณ โดย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เฉพาะวิธี HPLC เป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความไวสูง (Ohtakara และ Mitsutomi, 1988 ; Pinto และคณะ, 1997)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เนื่องจากไคทินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ที่มีอยู่ในธรรมชาติเป็นจำนวนมาก มีการประมาณกันว่าในปีหนึ่งๆมีไคทินจำนวนหลายล้านตันเกิดขึ้นจากพวกครัสเตเชียนและแพลงก์ตอน (plankton) ใต้ทะเล และยังมีส่วนน้อยที่มาจากแหล่งอื่นได้แก่ รา โปรโตซัว และ แมลง การนำไคทิเนสมาช่วยย่อยสลายไคทินในการกำจัดของเสียจำพวกเปลือกกุ้ง ปู นอกจากจะเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมแล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์จากทะเลได้อีกด้วย ปัจจุบันมีการนำไคทิเนสมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางได้แก่ ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ใช้เป็นยากำจัดเชื้อรา นำ chitooligosaccharides ไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมี อาหาร และยา เป็นต้น สำหรับแหล่งของไคทิเนสที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันได้แก่ *Streptomyces griseus* *Streptomyces antibioticus* และ *Serratia marcescens* เป็นต้น ซึ่งนำเข้ามาจากต่างประเทศและมีราคาแพง จึงมีการศึกษาเพื่อหาแหล่งผลิตไคทิเนสภายในประเทศที่เชื่อถือได้และมีราคาถูกซึ่งจะช่วยลดภาระการนำเข้าได้ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ค้นพบ *Bacillus* sp. ซึ่งแยกได้จากดินภายในประเทศที่สามารถผลิตไคทิเนสได้ และด้วยเหตุที่แบคทีเรียเลี้ยงง่าย เจริญเร็ว และขับไคทิเนสออกนอกเซลล์จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเพื่อเป็นแหล่งสำหรับผลิตไคทิเนสจำนวนมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำ *Bacillus* sp. ดังกล่าวมาผลิตไคทิเนส ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพบางประการของเอนไซม์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งนี้ขั้นตอนในการวิจัยประกอบด้วย

1. แยกไคทิเนสจาก *Bacillus* sp. ให้บริสุทธิ์บางส่วน
2. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์