บทที่ 1
บทนำ

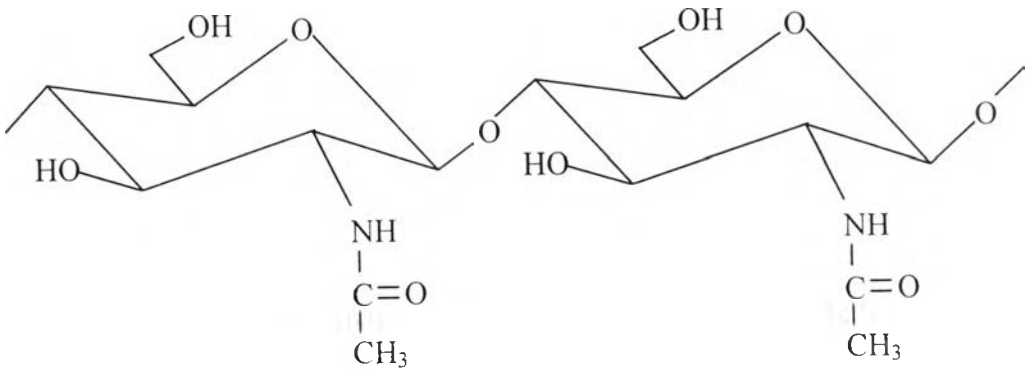
1. ไคตินและไคโตซาน

1.1 โครงสร้างทางเคมี

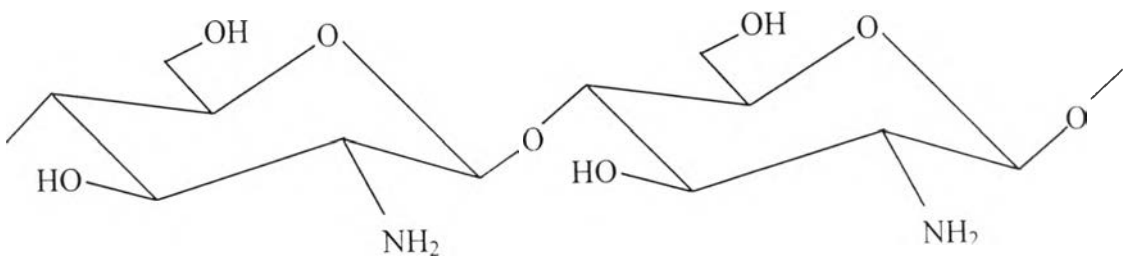
ไคติน เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูแคน (polymer of glucan) จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งมีโครงสร้างเคมีคล้ายเซลลูโลส ต่างกันตรงที่หน่วยย่อย (monomer) ของเซลลูโลสเป็น D-glucose ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ส่วนหน่วยย่อยของไคตินคือ N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) ซึ่งมีหมู่อะเซตามิโด ($-NHCOCH_3$) เกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง โดยหน่วยย่อยนี้จะเรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ 1, 4 บีตาไกลโคซิดิก (1 ,4 betaglycosidic bond) ชื่อทางเคมีของไคติน คือ Poly-β-(1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose มีสูตรทั่วไปเป็น $(C_6H_{13}NO_5)_n$

ไคโตซาน คือ อนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคติน (chitin derivative) ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไคติน โดยการกำจัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) ออกจากไคติน ทำให้หมู่อะเซตามิโดที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ของหน่วยย่อยของไคติน ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ดังนั้นหน่วยย่อยของไคโตซานคือ D- glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose) และมีชื่อทางเคมีว่า Poly-β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose ซึ่งการกำจัดหมู่อะเซทิลมากหรือน้อย จะมีผลต่อโครงสร้างและสมบัติของไคโตซานที่ได้ การกำจัดหมู่อะเซทิลปกติจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่ (% degree of deacetylation , %DD) กล่าวคือ ถ้าไคตินที่มีเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 50 หมายความว่า มีระดับของการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 50 %DD แสดงว่าโครงสร้างของไคตินนี้ จะมีหน่วยย่อย D-glucosamine เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือพอลิเมอร์นี้จะเกิดสภาพการเป็นไคโตซาน ($-NH_2$) เพิ่มขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปไคตินจะถูกเรียกว่าไคโตซาน เมื่อหมู่อะเซทิลถูกกำจัดออกไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60 %DD และถ้าไคตินถูกกำจัดหมู่อะเซทิลออกไป 90 - 100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกไคตินนี้ว่า fully deacetylated chitosan (Muzzarelli, 1985) ดังนั้นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน - ไคโตซาน คือ เปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะเซทิลออก คือ ยิ่งมีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะเซทิลออก

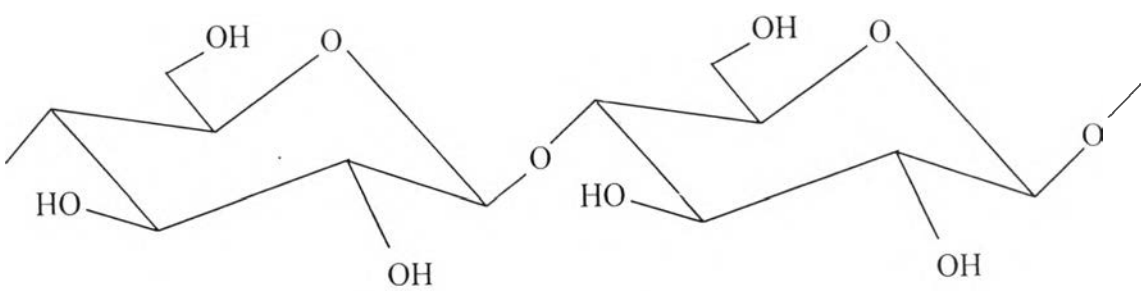
มากเท่าไรหรือเป็นจำนวนมาก จะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซานเด่นชัด การเปรียบเทียบสูตรโครงสร้างทางเคมีของ ไคตินและไคโตซาน และเซลลูโลส สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 1



ไคติน



ไคโตซาน



เซลลูโลส

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน ไคโตซาน และ เซลลูโลส

1.2 สมบัติที่สำคัญบางประการของไคตินและไคโตซาน

1.2.1 สมบัติในการละลาย (Solubility)

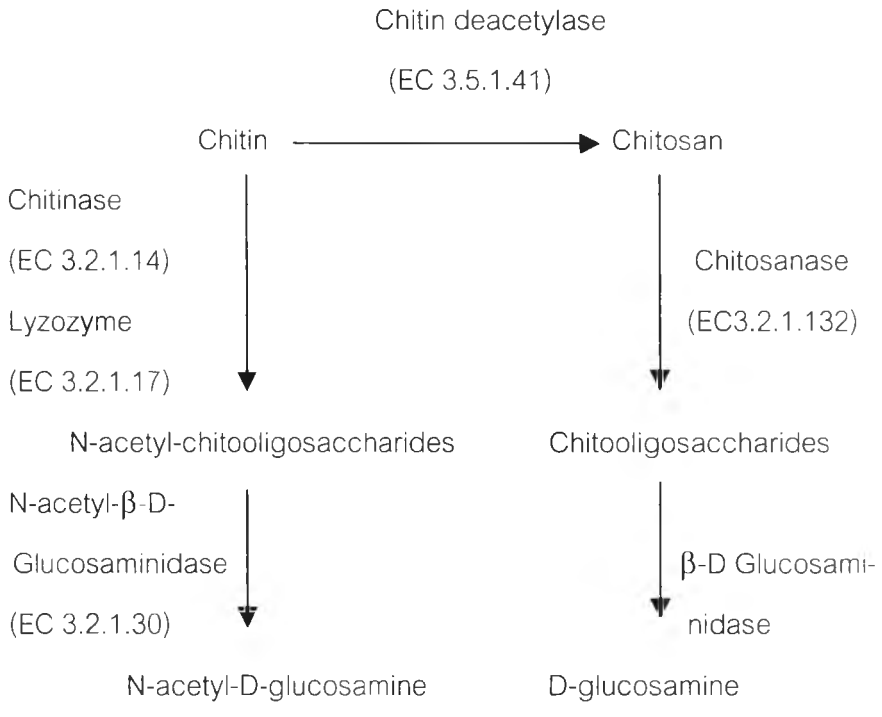
ไคติน มีสมบัติเป็นของแข็ง ไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างที่เจือจาง แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น แต่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น กรดซัลฟูริกเข้มข้น กรดฟอสฟอริก 78 - 79 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ และ DMAc-LiCl (N,N-Dimethylacetamide ที่มี Lithium Chloride) ไคตินมีสมบัติในการละลายค่อนข้างต่ำ เนื่องจากโมเลกุลเป็นสายโซ่ที่เกาะกันอยู่อย่างหนาแน่น การที่ไคตินไม่ละลายในกรดเจือจางและด่าง จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้

สมบัติของไคโตซานนั้น ไม่ละลายในน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่ไคโตซานมีสมบัติเป็น cationic polyelectrolyte เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ดังนั้นไคโตซานจึงสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิด ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6 เช่น กรดฟอร์มิกที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 - 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Knorr, 1984) และกรดอะซิติก ซึ่งนิยมใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ในการละลายไคโตซาน (Muzzarelli, 1977) นอกจากนี้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก และเมื่อนำไคโตซานมาบดแห้งในกรดอินทรีย์ (dry blending) จะได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble chitosan) (Skaugrud , 1989) จากสมบัติการละลายดังกล่าว ทำให้สามารถนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางมากกว่าใช้ในรูปของไคติน

1.2.2 การย่อยสลาย (Degradation)

ไคตินและไคโตซานจัดเป็น พอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้นเมื่อเกิดการย่อยสลาย จะให้สายโมเลกุลที่สั้นลง เป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด ที่เรียกว่า โมโนเมอร์ (monomer) หรือ โมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) โอลิโกเมอร์หรือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ของไคติน และไคโตซาน คือ N-acetyl-chitooligosaccharide และ chitooligosaccharide ส่วนโมโนเมอร์ หรือโมโนแซ็กคาไรด์ของไคตินและไคโตซาน คือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ ซึ่งการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานมีได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้กรด, ด่าง, คลื่นเสียง, ความร้อน และเอนไซม์

โดยที่การใช้เอนไซม์จะมีข้อดีกว่าคือ มีความความจำเพาะมากกว่า กระบวนการในการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานด้วยเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานด้วยเอนไซม์

1.3 แหล่งของไคตินและไคโตซาน

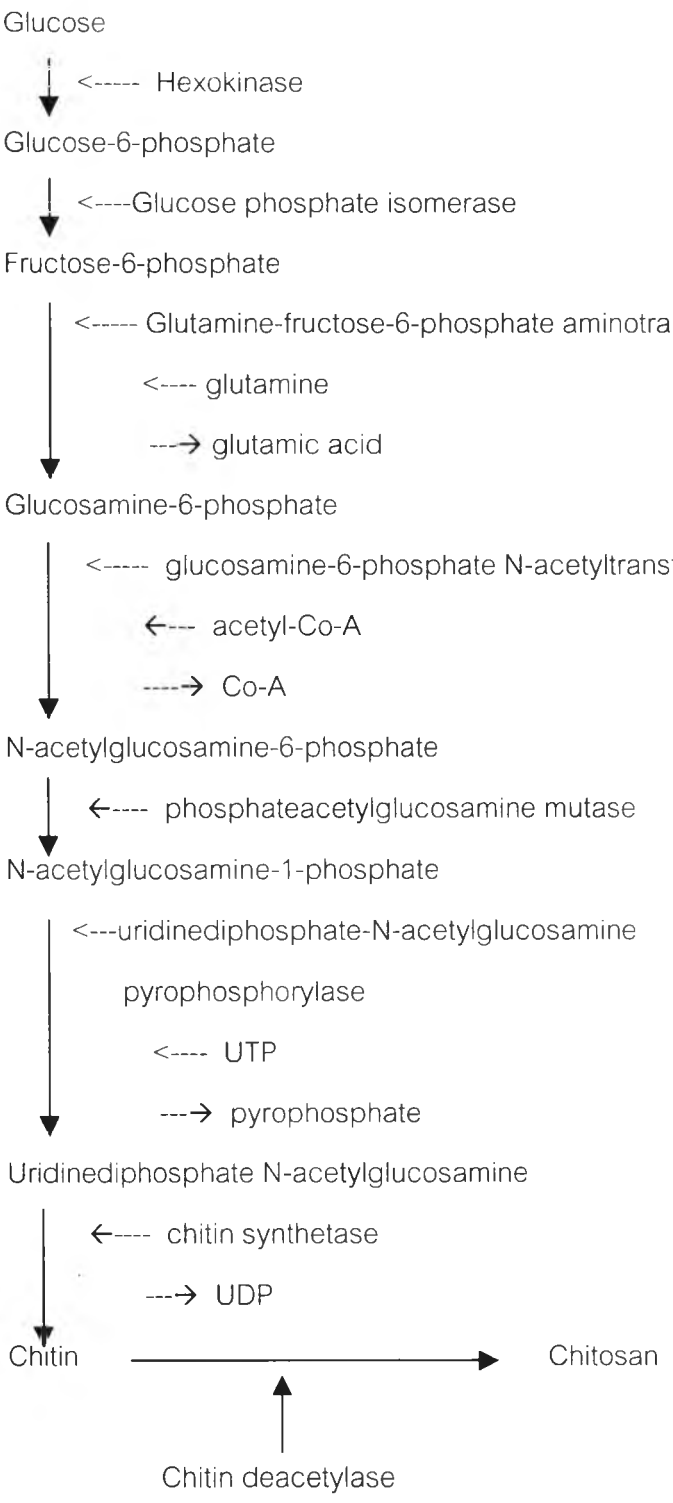
ไคติน เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ได้สกัดแยกไคตินจากเห็ด *Agaricus volvaceus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1832 Odier พบว่าโครงสร้างภายนอกของแมลง มีสารชนิดเดียวกันกับที่พบในโครงสร้างเห็ด และเรียกสารที่พบนี้ว่า "chitin" ซึ่งหมายถึง เกราะหุ้ม และในปี ค.ศ. 1843 Lassaige พบไคตินบริเวณปีก และส่วนภายในของตัวไหม *Bombyx mori* ส่วนสัตว์จำพวกกุ้ง ได้มีการสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งหิน (rock lobster) โดย Blumberg และคณะในปี ค.ศ.1951 สรุปแล้วโดยทั่วไปจะพบไคตินในโครงสร้างเปลือกนอก (exoskeleton) ซึ่งทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงและห่อหุ้มอวัยวะของสิ่งมีชีวิต จำพวกกุ้ง ปู กั้ง แกนปลาหมึก เปลือกรังไหม หอยเปลือกแข็ง (Mollusca) หอยมุก (Gastropoda) และแมลงบางชนิด นอกจากนี้ยังพบไคตินในผนังเซลล์ เส้นใย และสปอร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของราหลายสายพันธุ์ เช่น รา *Aspergillus niger, Aspergillus phoenicis, Penicillium notatum, Mortierella vinacea, Histoplasma eapsulatum* (Muzzarelli, 1977) เป็นต้น ส่วนในยีสต์พบไคตินในส่วนของผนังเซลล์ และในช่วงที่มีการแตกหน่อ โดย Bacon และคณะ (1966) ได้ตรวจ bud scars ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีไคติน เป็นองค์ประกอบ 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบไคตินในยีสต์ที่สร้างเส้นใยด้วย นอกจากราและยีสต์แล้ว ยังพบไคตินในเห็ด *Lactarius* sp., *Boletus* sp. และ *Agaricus* spp. และในสาหร่ายวงศ์ Chlorophyceae

ไคโตซานพบครั้งแรกโดย Rouget ในปี ค.ศ.1859 โดยการนำเอาไคตินมาต้มกับ สารละลายด่างโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้นสูง และพบว่าไคตินที่นำมาต้มนั้นสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ และเมื่อนำมาทดสอบสีโดยการผสมด้วยสารละลายไอโอดีนและกรด จะให้สีม่วงในขณะที่ไคตินจะให้สีน้ำตาล ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1894 Hoppe-Seyler ได้ให้คำนิยามของไคตินนี้ว่า "chitosan" นอกจากการไฮโดรไลส์ไคตินด้วยด่างแล้ว ยังพบไคโตซานได้ในจุลินทรีย์จำพวก เห็ด รา และยีสต์ โดย Bartinicki-Garcia (1968) พบว่าในผนังเซลล์ของรากลุ่ม Zygomycetes ประกอบด้วยไคโตซานมากกว่าไคติน ตัวอย่างราในกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhizopus oryzae* (Hang , 1989) , *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus delemar*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Mortierella isabelina* (Miyoshi และคณะ , 1992), *Absidia repens* (Davoust และ Pensson , 1992) และ *Mucor mucedo* (Datema และคณะ , 1997) เป็นต้น ส่วนยีสต์พบไคโตซานในผนังเซลล์ และในช่วงการเกิดสปอร์ (sporulation)

แหล่งของไคตินและไคโตซาน จะพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่กล่าวมาแล้ว โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีกระบวนการในการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน สรุปได้ดังรูปที่ 3 (Muzzarelli , 1977)



รูปที่ 3 แสดงการสังเคราะห์ไคติน และไคโตซานในสิ่งมีชีวิต

2. <u>กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน</u>

การผลิตไคตินและไคโตซาน สามารถทำได้ทั้งทางเคมี และทางชีวภาพ แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจะใช้กระบวนการทางเคมีมากกว่า เนื่องจากงานทางเอนไซม์ยังมีน้อย โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 **วิธีทางเคมี** นำวัตถุดิบ ซึ่งได้แก่ เปลือกกุ้ง กระดองปู หรือแกนปลาหมึก ล้างให้สะอาด ทำให้แห้งแล้วบดให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1.1 การกำจัดโปรตีน (deproteination) โดยนำวัตถุดิบที่เตรียมได้ข้างต้นมาทำปฏิกิริยากับสารละลายด่าง โดยส่วนใหญ่จะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง

2.2.2 การกำจัดเกลือแร่ (demineralization) โดยนำวัตถุดิบที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้ว มาเติมกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 – 5 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือแร่ ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ หินปูน ($CaCO_3$) เมื่อผ่านขั้นตอนนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ไคติน

2.2.3 การกำจัดหรือลดหมู่อะเซทิล (deacetylation) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยนำไคตินที่ได้มาไฮโดรไลส์ด้วย สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 - 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิสูง 90 - 130 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดหรือลดหมู่อะเซทิล เมื่อผ่านขั้นตอนนี้จะได้ไคโตซาน แต่หากต้องการผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะต้องผ่านการไฮโดรไลส์ด้วยด่างซ้ำอีกครั้ง ภายใต้การควบคุมสภาพเฉพาะ

นอกจากวิธีการกำจัดหมู่อะเซทิลดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีวิธีการในภาวะต่างๆ ซึ่งแต่ละวิธีจะให้ไคโตซานที่มีสมบัติต่าง ๆ กันไป เช่น Horton และ Lineback (1965) ได้ไฮโดรไลส์ไคตินด้วยสารละลายด่าง โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน พบว่าสามารถกำจัดหมู่อะเซทิลได้ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่สายพอลิเมอร์ที่ได้ถูกตัดสั้นมาก จึงไม่เหมาะกับการใช้งานบางประเภท เช่น การใช้เป็นตัวตกตะกอน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wolform และ คณะใน ปี ค.ศ. 1958 ที่ใช้ภาวะในการไฮโดรไลส์ภายใต้บรรยากาศ ไนโตรเจน ได้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ และเยาวภา ไหวพริบ (พ.ศ. 2543) ได้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล เท่ากับ 90 - 92 เปอร์เซ็นต์

แต่เนื่องจากวิธีทางเคมีในการผลิตไคตินและไคโตซาน มีข้อจำกัด คือ ถ้าใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้นสูง หรืออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงเกินไป จะทำให้ไคโตซานที่ได้สูญเสียสภาพธรรมชาติ และ มีมวลโมเลกุลลดลง (Bough และคณะ , 1978) และหากใช้สารละลายด่างที่เจือจางเกินไป หรืออุณหภูมิที่ต่ำเกินไป จะทำให้ได้ไคตินและไคโตซานที่มีคุณภาพต่ำ คือ มีโปรตีนและ เกลือแร่ปนเปื้อน และไคโตซานที่ผลิตได้จากวิธีทางเคมีจะมีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลที่ไม่แน่นอน ซึ่งขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการผลิต นอกจากนี้ วิธีทางเคมียังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากใช้ด่างความเข้มข้นสูง และเหลือปริมาณด่างทิ้งจากกระบวนการผลิตมาก และยังเป็นอันตราย เนื่องจากภาวะการผลิตค่อนข้างรุนแรง

2.2 **วิธีทางชีวภาพ** แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.2.1 การกำจัดโปรตีนและเกลือแร่ โดยนำวัตถุดิบที่ผ่านการทำความสะอาด ทำให้แห้งและบดแล้ว มาหมักกับแบคทีเรียที่มี เอนไซม์โปรตีเอส (protease) เพื่อย่อยโปรตีนที่ติดอยู่ตามส่วนต่างๆ ออก ในขั้นตอนนี้สามารถแยกโปรตีนออกจากไคตินเพื่อนำไปใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์ และสามารถสกัดรงควัตถุสีส้มที่มีอยู่ จำพวก Astaxanthin และสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์คือ ไคติน

2.2.2 การกำจัดหรือลดหมู่อะเซทิล โดยใช้เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส ไฮโดรไลส์ไคติน ที่ได้จากขั้นตอนแรก (Hirano , 1996)

จะเห็นได้ว่าการผลิตไคตินและไคโตซาน โดยวิธีทางชีวภาพมีข้อดีกว่าวิธีทางเคมี คือ ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน ไม่ก่อปัญหาด่างเหลือทิ้งที่เป็นอันตราย และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังได้ผลผลิตพลอยได้ (by product) จากกระบวนการ คือ สารรงควัตถุสีส้มและโปรตีน ซึ่งจะสูญเสียไปเมื่อใช้วิธีทางเคมี อีกทั้งยังควบคุมกระบวนการผลิตได้ดีกว่า และได้ไคติน ไคโตซานที่มีคุณภาพคงที่ และมีคุณภาพดีขึ้น

นอกจากกระบวนการผลิตไคตินและไคโตซานทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์แล้ว ยังได้มีการศึกษาการผลิต ไคตินและไคโตซาน จากจุลินทรีย์โดยตรง เช่น การผลิตไคตินจากรา *Aspergillus niger* (ฉัตรฤดี , พ.ศ. 2541) โดยผู้ทดลองได้ทำการเลี้ยงราและ สกัดไคตินออกจากผนังเซลล์ของรา แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่สกัดได้ พบว่าให้หมู่ที่ทำหน้าที่ที่สำคัญ เหมือนกันกับไคตินจากเปลือกกุ้ง และการผลิตไคโตซานจากรา *Mucor rouxii* โดย Arcidiacono และ Kaplan ในปี ค.ศ. 1991 ซึ่งพบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการ

เลี้ยงเชื้อ รวมทั้งวิธีการสกัดไคโตซานออกจากผนังเซลล์ของรามีผล ต่อปริมาณ และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ผลิตได้

3. การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน

เนื่องจากไคโตซานมีสมบัติในการละลายได้ดีกว่าไคติน คือ สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด แล้วเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้ โดยที่สารละลายไคโตซานจะมีความเหนียว (viscous) มีความใส (clear solution) และมีลักษณะของพลาสติกใสที่ยืดหยุ่นได้ จึงสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เจล (gel) เม็ด (tablet) เยื่อแผ่นบาง (membrane) เส้นใย (fibril) คอลลอยด์ (colloid) และสารเคลือบ (coating) เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำไคโตซานไปเตรียมเป็นอนุพันธ์ได้อีกมากมาย เนื่องจากไคโตซานประกอบด้วยหมู่อะมิโนอิสระ และ หมู่ไฮดรอกซี ตัวอย่างอนุพันธ์ของไคโตซาน ได้แก่ N-acyl chitosan , NIO-carboxylacyl chitosan , N-carboxybutyl chitosan และ chitosan xanthate เป็นต้น นอกจากนี้ไคโตซานยังไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (non-toxic material) เป็นสารที่มีส่วนร่วมได้ในกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity) และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) จึงทำให้นำมาใช้กับมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมได้อย่างปลอดภัย

ประโยชน์ของไคโตซาน (Mattheus, 1997 ; Muzzarelli, 1977)

1. ด้านการแพทย์และยา

พบว่าไคโตซาน เป็นตัวเร่งกระบวนการรักษาแผล ไม่ให้แผลติดเชื้อ และยังสามารถดูดซับน้ำเหลืองจากแผลได้ดี จึงนำไคโตซานมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาแผล เช่น ผ้าปิดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด ใช้ในรูปผงเพื่อสมานแผล นอกจากนี้ยังผลิตไหมละลาย ใช้ในการเย็บแผลผ่าตัด ซึ่งช่วยให้แผลแห้งเร็วและสลายตัวเมื่อแผลติดกัน และไม่เกิดการแพ้ ผลิตผิวหนังเทียมที่ทำจาก ไคโตซาน-คอลลาเจน (Hirano , 1989 และ Collumbel และคณะ , 1988) คอนแทค-เลนส์ จากการทำ partially depolymerization ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ของไคโตซานบริสุทธิ์จากแกนปลาหมึก (Markey และคณะ , 1989) หลอดเลือดเทียม (artificial blood vessels) ผลิตสารยับยั้งการเกิดคราบพลัคบนฟัน (plaque inhibition) สารยับยั้งการเกิดเนื้องอก (tumor inhibition) ผลิตเปลือกแคปซูลยา เนื่องจากไคโตซานมีสมบัติในการเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อย (controlled-release systems) นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวทำละลายตัวยาบางชนิด

ในการผลิตยา และหลายงานวิจัยพบว่าไคโตซานสามารถลดระดับปริมาณคอเลสเตอรอล และ กรดไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้

2. ด้านอาหาร

ไคโตซานเป็นสารที่ไม่ให้พลังงาน และไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งสามารถจับกับกรดไขมันได้ จึงมีการนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนัก และอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ไคโตซานถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร และเครื่องดื่ม โดยใช้ในรูปของสารกันบูด (preservative) เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ใช้ผสมในเครื่องดื่มเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่ตกตะกอน เป็นตัวช่วยให้อาหารมีสีคงตัว (color stabilization) และใช้แยกสารที่ไม่ต้องการบางชนิดออกจากผลิตภัณฑ์ เช่น การแยกสี และของแข็งบางชนิดออกจากน้ำผัก และ ผลไม้ ใช้ทำบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร เป็นต้น

3. เครื่องสำอาง

ปัจจุบันมีการนำไคโตซานไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลาย โดยนำไปใช้เป็นส่วนผสมใน แชมพู ครีมนวดผม และครีมปรับสภาพผม เพื่อเพิ่มความหนืดให้ผลิตภัณฑ์ และยังทำให้เส้นผมเป็นเงางาม ชุ่มชื้น ไม่ขาดง่าย ผสมในสบู่ ครีม และ โลชั่นทาผิว เพื่อเป็นตัวให้ความชุ่มชื้น และ เก็บความชื้นได้ดี ทำให้ผิวไม่แห้ง นอกจากนี้ยังเป็นส่วนผสมใน แป้งแต่งหน้า และเครื่องสำอางสำหรับแต่งหน้า ทำให้ติดผิวหน้าได้นาน และเพิ่มความเนียน เรียบ

4. การบำบัดน้ำ

ไคโตซานมีสมบัติเป็น chelating polymers สามารถ chelate โลหะหนัก เช่น ทองแดง (copper) , ตะกั่ว (lead) , ปรอท (mercury) และ ยูเรเนียม (uranium) ในน้ำที่มีการปนเปื้อน นอกจากนี้ไคโตซานยังเป็นตัวจับและ ตกตะกอน (coagulating and flocculant agent) เนื่องจากมีหมู่อะมิโน ซึ่งสามารถจับกับสารประจุลบต่าง ๆ เช่น โปรตีน ของแข็ง และ สี ปัจจุบันได้มีการนำไคโตซานมาผลิตเป็นเยื่อกรอง (chitosan membrane) เพื่อใช้ในการกรองและบำบัดน้ำ เช่น ในอุตสาหกรรมน้ำดื่ม การบำบัดน้ำในสระว่ายน้ำ ในโรงงานอุตสาหกรรม

5. ด้านการเกษตร

ใช้ไคโตซานเป็นสารเคลือบเมล็ดพืช ช่วยลดปริมาณราก่อโรค รวมทั้งเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่พืช ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น (Hadwiger และคณะ,1984) ช่วยเร่งการงอก (germination) ให้เร็วขึ้น ใช้เคลือบใบและรากของพืชตระกูลถั่ว เพื่อเพิ่ม

จำนวนฝัก และ ผลผลิต โดยสารละลายไคโตซานจะลดจำนวน local lesions ที่เกิดจากไวรัส alfalfa mosaic virus (Pospieszny และ Atabekov , 1989) ใช้เคลือบผัก และผลไม้ เพื่อยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวให้นานขึ้น นอกจากนี้ยังใช้ เป็นส่วนผสมในปุ๋ย (Nowosielski และคณะ , 1988) ช่วยเร่งการเจริญของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยยาฆ่าแมลง และยาฆ่าวัชพืช

6. ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

ใช้เป็นตัวตรึงเอนไซม์ และเซลล์สิ่งมีชีวิต ใช้ทำแผ่นกรอง (membrane) ทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (chromatographic columns) มีชื่อว่า Chito Pearl ใช้เป็นตัวแยกโปรตีน (protein separation) เป็นต้น

4. **<u>ไคตินดีอะเซทิเลส</u>**

ไคตินดีอะเซทิเลส (EC 3.5.1.41) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจาก คาร์บอนตำแหน่งที่สองของ N - acetylglucosamine ในสายพอลิเมอร์ของไคติน ทำให้เกิดไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิเลชั่นต่าง ๆ กัน และได้กรดอะซิติกอิสระ

$$\underset{\text{ไคติน}}{(1,4)\text{ - linked }(GlcNAc)_n} \longrightarrow \underset{\text{ไคโตซาน}}{(1,4)\text{ - linked }(GlcN_m, GlcNAc_{n-m})} + \underset{\text{กรดอะซิติก}}{mCH_3CO_2H}$$

สับสเตรทในธรรมชาติของไคตินดีอะเซทิเลส ได้แก่ ไคตินที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (nascent chitin) โดยเอนไซม์ไคตินซินทีเทส (chitin synthetase) ดังรูปที่ 3 นอกจากนี้ยังได้แก่ โอลิโกเมอร์ และ โมโนเมอร์ของไคติน ไกลคอลไคติน (glycol chitin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคตินที่สามารถละลายน้ำได้ เป็นต้น

พบจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิต ไคตินดีอะเซทิเลส ซึ่งแหล่งและบทบาทที่มีในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ซึ่งมีรายงานดังนี้

Araki และ Ito (1974) ได้ศึกษาไคตินดีอะเซทิเลสใน *Mucor rouxii* AHU6019 โดยเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสายใย ในอาหารที่ประกอบด้วย 2 เปอร์เซ็นต์กลูโคส , 1 เปอร์เซ็นต์พอลิเปปโตน และ 0.3 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 (Bartinicki-Garcia และ Nickerson , 1962) ที่อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสร้างไคตินดีอะเซทิเลสได้ภายในเซลล์ เอนไซม์นี้สามารถย่อยไกลคอลไคติน และโอลิโกเมอร์ของไคติน และในปี 1984 Davis และ Bartinicki-Garcia ศึกษาการสร้างไคโตซาน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* IM-80 (ATCC 24905) โดยเลี้ยงในอาหารและภาวะเดียวกับ Araki และ Ito (1974) พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไคโตซาน 2 ชนิด คือ ไคตินซินทีเทส และไคตินดีอะเซทิเลส ซึ่งแยกได้จากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และภายในเซลล์ ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ 2 ชนิดนี้จะทำงานต่อเนื่องกัน โดย เมื่อเอนไซม์ไคตินซินทีเทส สร้างไคตินใหม่ ๆ ขึ้นมา จากนั้นไคตินดีอะเซทิเลสจะเข้าไปไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจากไคตินที่สร้างใหม่นั้น และได้ไคโตซานในที่สุด ซึ่งไคโตซานเป็นสมบัติเด่นของผนังเซลล์ราในกลุ่ม Zygomycetes ดังนั้นไคตินดีอะเซทิเลสในรากลุ่มนี้ จึงมีบทบาทในการสังเคราะห์องค์-ประกอบของเซลล์ (cell biosynthesis) นั่นเอง

ในปี 1982 Kauss และคณะ ได้ศึกษา ไคตินดีอะเซทิเลสในราก่อโรคที่อยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes คือ *Colletotrichum lindemuthianum* โดยเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์กลูโคส , 0.4 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์สารสกัดมอลท์ เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิตไคตินดีอะเซทิเลสภายในเซลล์ เพื่อสร้างองค์ประกอบของผนังเซลล์ คือ ไคโตซาน เช่นเดียวกับรากลุ่ม Zygomycetes แต่จะมีบทบาทต่อจุลินทรีย์ต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าไคโตซานที่สร้างขึ้นนี้ มีบทบาทสำคัญในช่วงการติดเชื้อแทรกตัวเข้าไปในเซลล์พืช เนื่องจากไคโตซานมีสมบัติเป็น polycationic ซึ่งจับกับผนังเซลล์และนิวเคลียสของพืชได้ดี

ต่อมาในปี 1996 Tokuyasu และคณะได้ศึกษา เชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* โดยเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบเดียวกับที่ Kauss ใช้ในปี 1982 แต่เลี้ยงในภาวะต่างกัน คือ เลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน พบว่าเชื้อจะขับไคตินดีอะ-เซทิเลส ออกนอกเซลล์ตั้งแต่วันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ และเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยเอนไซม์จะถูกขับออกหลังจากหยุดการเจริญของเส้นใย ต่างจากรา *Absidia glauca* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม Zygomycetes ที่พบกิจกรรมของเอนไซม์หลังการเลี้ยงเชื้อเพียง 16 ชั่วโมง บทบาทของไคตินดีอะเซทิเลสใน *C. lindemuthianum* มีเช่นเดียวกันกับในรา *C. lagenarium* ซึ่งเป็นราก่อโรคในพืชตระกูลแตง (cucumber pathogen) เชื้อจะปล่อย ไคตินดีอะเซทิเลสระหว่างการแทรกตัวเข้าในเซลล์พืช โดยเอนไซม์จะโจมตีเซลล์ของราเองบริเวณที่เป็นไคตินที่เกิดใหม่ ๆ ที่ส่วนปลายของเส้นใยรา ที่จะสัมผัสกับเซลล์พืช เพื่อเปลี่ยน ไคตินที่เกิดใหม่ ๆ บริเวณดังกล่าวให้เป็นไคโตซาน

เพื่อป้องกันการถูกย่อยเส้นใยจากเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยเซลล์พืช ที่สร้างขึ้นเพื่อป้องกันราก่อโรค และช่วยทำให้ราสามารถเข้าแทรกตัวเข้าในพืชนั้นได้ทำให้พืชติดเชื้อ นอกจากนี้ในปี 1995 Deising และ Siegrist ได้รายงานบทบาทของไคตินดีอะเซทิเลสในราก่อโรคที่สอดคล้องกัน โดยพบว่าขณะที่ราจำพวกยูโรมัยซีส หรือ ราทำให้เกิดโรคสนิม (Rust Fungus Uromyces) เจริญผ่านปากใบพืชนั้น สามารถตรวจพบกิจกรรมของไคตินดีอะเซทิเลสในปริมาณที่สูงมาก โดยสรุปแล้ว บทบาทของไคตินดีอะเซทิเลสในราก่อโรค คือ การใช้เอนไซม์เปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์ ที่เป็นไคตินของราเองให้เป็นไคโตซาน เพื่อป้องกันเอนไซม์ไคตินเนสที่พืชสร้างขึ้น

Alfonso และคณะ (1995) ได้ศึกษาไคตินดีอะเซทิเลสจากรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งเป็นราที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ โดยเลี้ยงราในอาหารที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคส , 0.1 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ และเติมแร่ธาตุบางชนิด คือ K_2HPO_4 , $MgSO_4$ และ KCl เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส คณะผู้วิจัยตรวจพบ ไคตินดีอะเซทิเลส ระหว่างการย่อยสลายตัวเองตามธรรมชาติ (natural autolysis) ของเชื้อ โดยเอนไซม์จะถูกขับออกนอกเซลล์นี้ มีส่วนร่วมในการย่อยสลายผนังเซลล์ที่เป็นไคติน จะเห็นได้ว่าไคตินดีอะเซทิเลสนอกจากจะมีบทบาทในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เพื่อการเจริญแล้ว ยังมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ด้วย

นอกจากราสายใยชนิดต่างๆ ดังกล่าวแล้ว มีผู้รายงานในราชนิดอื่น ๆ อีกมาก ตัวอย่างเช่น *Mucor rouxii* และ *Rhizopus nigricans* (Trudel และ Asselin , 1990) , *Absidia coerulea* (Gao และคณะ , 1995) , *Rhizopus oligosporus* NS_1 (นันทนา , พ.ศ. 2542) ที่พบว่าราสามารถสร้าง ไคตินดีอะเซทิเลสได้ เป็นต้น

สำหรับไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ผู้วิจัยกลุ่มแรกที่รายงาน คือ Christodoulidou และคณะ (1996) โดยศึกษาใน *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีไคตินดีอะเซทิเลสยีน *CDA1* และ *CDA2* ที่ผลิตไคตินดีอะเซทิเลสทั้งหมด (Total chitin deacetylase) ซึ่งพบเอนไซม์ในปริมาณที่สูงในช่วงการสร้างสปอร์ ผู้วิจัยสรุปว่าไคตินดีอะเซทิเลสมีบทบาทในการสร้างไคโตซาน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังสปอร์ชั้นนอก (outer - layer) ช่วยทำให้ผนังสปอร์มีความแข็งตัวมากขึ้น

สำหรับในแบคทีเรีย ได้มีการรายงานไคตินดีอะเซทิเลสใน *Vibrio cholerae* Non-01 โดย Yamano และคณะในปี 1994 โดยใช้ชื่อว่า N-acetylglucosamine deacetylase เนื่องจากเอนไซม์นี้สามารถ ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลได้เฉพาะ โมโนเมอร์ ของไคตินเท่านั้น โดยเอนไซม์นี้จะอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย ต่อมา Ohishi และคณะ

(1997) พบไคตินดีอะเซทิเลสใน *Vibrio alginolyticus* H-8 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์ไคตินจากปลาหมึก พบว่าเชื้อขับเอนไซม์ออกนอกเซลล์ ตั้งแต่ระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (log phase) และตรวจพบเอนไซม์ในปริมาณสูงสุด เมื่อเชื้อเริ่มมีการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยไคตินดีอะเซทิเลสที่พบนี้มี 2 ชนิด คือ DA1 และ DA2

ได้มีผู้วิจัยหลายคณะรายงานการทำไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ ซึ่งสรุปได้ดังนี้

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการศึกษาสมบัติของไคติน ดีอะเซทิเลสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	แหล่งของเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุล (K Dalton)	pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน	ความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ	ที่มา
M. rouxii ATCC 24905	Intracellular	80[a] 75[b]	pH 4.5, 50 ^{0}C	-	Kafetzopoulos และคณะ , 1993
A.[1] coerulea	Intracellular	75[a,b]	pH 5.0 , 50 ^{0}C	-	Goa และคณะ , 1995
V. alginolyticus	Extracellular	DA1 48[b] DA2 46[b]	pH 8.5-9 ,45 ^{0}C pH 8-8.5 ,40 ^{0}C	pH 7 และ 11 ต่ำกว่า 40 ^{0}C	Ohishi และคณะ,1997
C.lindemuthianum	Extracellular	33.0[a] 31.5[b]	pH 11.5-12.0 , 60 ^{0}C	pH 5-10.5 , 45 ^{0}C	Tokuyasu และคณะ , 1996
R. oligosporus NS_1	Extracellular	29.0[a] 28.0[b]	pH 6.5 , 55 ^{0}C	pH 4.5-9.0 , 20-50 ^{0}C	นันทนา พ.ศ. 2542
A.[2] nidulans	Extracellular	27.3[a] 27.5[b]	pH 7.0 , 50 ^{0}C	pH 4-10 , 30-100 ^{0}C	Alfonso และคณะ , 1995

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้รายงาน, a หมายถึง ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชั่น, b หมายถึง ด้วยวิธี SDS-PAGE,
M. = *Mucor* , *A*[1]. = *Absidia* , *V.* = *Vibrio* , *C.* = *Colletotrichum* ,
R. = *Rhizopus* และ *A.*[2] = *Aspergillus*

จะเห็นได้ว่าการศึกษาเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ ยังมีค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับในรา ทั้งที่ยีสต์ก็มีความสามารถในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลสเช่นกัน ดั้งนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาไคตินดีอะเซทิเลสในยีสต์ โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อแยกและ คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ ที่มีความสามารถในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส และสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีโครมาโทกราฟี รวมทั้งหาสมบัติบางประการของเอนไซม์ โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

1. แยกและคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ผลิตไคตินดีอะเซทิลเลสที่ให้แอคติวิตีสูง
2. จำแนกยีสต์ที่คัดเลือกได้
3. หาองค์ประกอบของอาหาร ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส
4. หาภาวะการเลี้ยงยีสต์ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไคตินดีอะเซทิเลส
5. สกัดไคตินดีอะเซทิเลสให้บริสุทธิ์บางส่วน
6. หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์
7. ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว