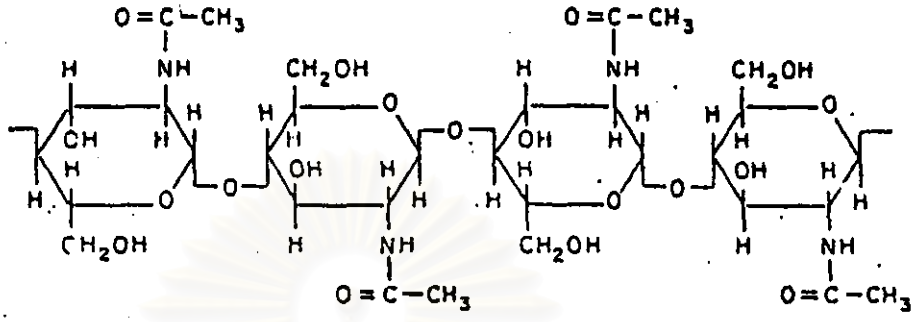
บทที่ 1
บทนำ

1. ลักษณะทั่วไปของไคตินและไคโตแซน

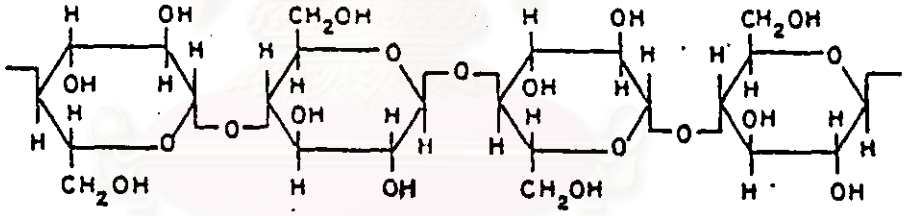
1.1 ไคติน

ไคติน เป็นสารอินทรีย์โพลีเมอร์ จำพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วย อนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแกน (back bone) ที่มีธาตุไนโตรเจน และกลุ่มอะเซทิลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล เรียงต่อกันไปเป็นสายยาวด้วยพันธะ 1,4 บีตาไกลโคซิดิก (1,4 betaglycosidic bond) มีชื่อทางเคมีว่า poly - β -(1,4)-acetamido -2-deoxy -D-glucose แต่ละหน่วยโมเลกุลของกลูโคส ที่มีหมู่อะมิโน กับหมู่อะเซทิลเกาะกัน เป็นกลุ่มของ N-acetylglucosamine หรือเรียกว่า polymer ของ N-acetylglycosamine สูตรทั่วไปคือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ซึ่งมีคาร์บอน 47.29 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 6.45 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 6.89 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 39.37 เปอร์เซ็นต์ (Budavari, 1976) สูตรโครงสร้างของไคตินโดยทั่วไปคล้ายกับเซลลูโลส (cellulose) โดยเปรียบเทียบสูตรโครงสร้าง ดังแสดงในรูปที่ 1 (Cahn และคณะ 1993)

โพลีเมอร์ทั้งสองต่างกันที่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในเซลลูโลส ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง และจะเป็นหมู่ acetamino (-NH-CO-CH_3) ในไคติน สายโพลีเมอร์ของไคตินจะมี N-acetylglucosamine นับพันหน่วยเกาะกันด้วยพันธะ β 1, 4 (Carrod และTom ,1978) แต่ในบางหน่วยของไคตินธรรมชาติ อาจจะไม่มีหมู่ acetyl (-CO-CH_3) เกาะในที่ ๆ ควรจะมี



ไคติน poly - β -D-glucose-(1,4)-acetamido -2-deoxy



เซลลูโลส (poly- β -(1,4) linked - D - glucopyranose)

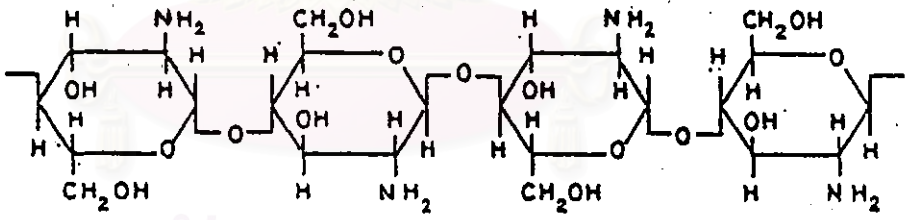
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของไคตินและเซลลูโลส

ไคตินมีสมบัติเป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ กรดเจือจาง ด่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์แก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟุริก และกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิกเข้มข้น 78-79 เปอร์เซ็นต์ และกรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ (Budavari, 1976; Muzzarelli, 1985)

ต่อมา Austin(1981) ได้ค้นพบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับไคติน ได้แก่ N, N-dimethylacetamide และ N-methylpyrolidone ร่วมกับ lithium chloride (LiCl) ในปริมาณเล็กน้อย

1.2 ไคโตแซน

ไคโตแซน เป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ได้จากการไฮโดรไลส์เอาหมู่อะเซทิลออกจากโพลีเมอร์ของไคติน การนำเอากลุ่มอะเซทิลออกมากหรือน้อย จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการดีอะเซทิลเลชั่น (% degree of deacetylation) เราเรียกไคตินที่ถูกไฮโดรไลส์กลุ่มอะเซทิลออกบางส่วนหรือเกือบทั้งหมดว่า ไคโตแซน หรือดีอะเซทิลเลทไคติน (deacetylated chitin) สูตรโครงสร้างของไคโตแซน ดังแสดงในรูปที่ 2 (Cahn และคณะ 1993)



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของไคโตแซน

เนื่องจากหมู่อะเซทิล (-CO-CH_3) ของไคติน ถูกตัดออกเหลือหมู่อะมิโน (-NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง โดยทั่วไปหมู่อะเซทิลถูกไฮโดรไลส์ หรือหลุดไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ไคตินจะถูกเรียกว่า ไคโตแซน ถ้าหมู่อะเซทิลถูกไฮโดรไลส์หรือหลุดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกไคโตแซนชนิดนี้ว่า fully deacetylated chitosan (Muzzarelli, 1985)

ไคโตแซน มีชื่อทางเคมีว่า poly- β -(1,4) -2-amino-2-deoxy-D-glucose สมบัติที่แตกต่างจากโพลีแซคคาไรด์อื่น ๆ คือ ไคโตแซนมีสมบัติเป็นประจุลบ (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่สองดังกล่าว ทำให้ไคโตแซนสามารถละลายได้ดีในกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ตัวทำละลายที่ดีของไคโตแซน คือ กรดฟอร์มิก ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Knorr, 1984) นอกจากนี้ไคโตแซนสามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก ที่เจือจาง และละลายได้เล็กน้อยใน กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยส่วนใหญ่ เมื่อจะนำไคโตแซนไปใช้ประโยชน์มักจะละลายไคโตแซนในกรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก (Muzzarelli, 1977) ไคโตแซนมีสมบัติไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง ได้แก่ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งกรดอนินทรีย์บางอย่าง เช่น กรดซัลฟุริก ไม่ว่าที่ความเข้มข้นใด ๆ ที่อุณหภูมิห้อง (Knorr, 1984) ไคโตแซนไม่สามารถละลายได้ในน้ำที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) สูงกว่า 6.5 แต่ถ้านำไคโตแซนมาบดแห้ง (dry blending) กับกรดอินทรีย์จะได้ไคโตแซนที่สามารถละลายน้ำได้ (water solulde chitosan) (Skaugrud, 1989) จากสมบัติดังกล่าว จึงทำให้ไคโตแซนถูกนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางมากกว่าที่จะใช้ในรูปของไคติน (Muzzarelli, 1977; Goa และคณะ, 1995)

2. แหล่งไคติน และ ไคโตแซน

ไคติน เป็นสารอินทรีย์ทางชีวภาพ ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) ของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ (Knorr, 1984) ไคตินเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใย ยึดสารต่าง ๆ ให้เป็นแผ่น และเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะ และสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ (exoskeleton) พบไคตินได้ทั่วๆ ไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสัตว์จำพวกมีปล้อง (Arthopoda) เช่น กุ้ง ปู กั้ง และแมลงชนิด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่างๆ พบไคตินในหอยเปลือกแข็ง (Mollusca) หอยมุก (Gastropoda) กระดองปลาหมึก (Cephalopoda) รวมไปถึงผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ ทุกชนิด ดังเช่นในรา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Neurospora* sp., *Mortierella* sp., *Phycomyces* sp., *Blastocladiella* spp., และ *Alternalia* sp. เป็นต้น ส่วนยีสต์ที่พบไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ อย่างเช่น *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบไคตินในเห็ด *Lactarius* sp. *Boletus* spp. และ *Agaricus* spp. อีกทั้งพบในสาหร่ายบางชนิด เช่น ในวงศ์ Chlorophyceae อีกด้วย (Knorr, 1984; Muzzarelli, 1977)

พบแหล่งของไคโตแซนในธรรมชาติ โดยเฉพาะในจุลินทรีย์จำพวกเห็ด รา และยีสต์ ในผนังเซลล์ของราในกลุ่ม Zygomycetes ส่วนใหญ่ จะมีองค์ประกอบเป็นไคโตแซนมากกว่าไคติน (Bartinicki - Garcia, 1968) ดังเช่นในรา *Mucor rouxii* *Absidia coerulea* , *Rhizopus delemar* , *Cunninghamella blakesleeana* , *Mortierella isabelina* (Miyoshi และคณะ 1992) , *Absidia repens* (Davoust และ Persson, 1992) , *Rhizopus oryzae* (Hang, 1989), และ *Mucor mucedo* (Datema และคณะ, 1997) เป็นต้น จากธรรมชาติ แหล่งของไคโตแซนจะพบได้น้อยกว่าไคติน ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการผลิตไคโตแซนจากแหล่งไคตินธรรมชาติ ได้แก่เปลือกกุ้ง ปู และกระดองปลาหมึก ซึ่งผลิตโดยผ่านกรรมวิธีทางเคมีมากกว่าการผลิตจากผนังเซลล์ของรา (White และคณะ, 1979)

3. กระบวนการผลิตไคโตแซน

ในปัจจุบันผลิตอยู่ 2 วิธี คือวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ

3.1 วิธีทางเคมี

กรรมวิธีการผลิตไคโตแซนโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีความร้อน (thermochemistry reaction) คือ การไฮโดรไลส์เอากลุ่มอะเซทิลออก ด้วยสารละลายด่างเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูง ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน (Mima และคณะ, 1983; Austin

และคณะ, 1981) การเกิดไคโตแซนจะขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) ซึ่งวัดได้จากค่าระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล ที่แตกต่างกันตามปริมาณกลุ่มของอะเซทิลที่ถูกไฮโดรไลส์ คิดเป็นหน่วยร้อยละ (percentage of degree of deacetylation)

Horton และ Lineback (1965) ได้เปลี่ยนไคตินเป็นไคโตแซน โดยใช้วิธีที่เรียกว่า อัลคาไล ฟิวชั่น (alkali fusion) โดยหลอมไคติน 30 กรัม กับโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 150 กรัมใน nickel crucible ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน พบว่า สามารถกำจัดหมู่อะเซทิลออกได้ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่สายโพลีเมอร์จะถูกตัดขาดไปด้วย ทำให้สั้นลงมาก ซึ่งไม่เหมาะต่อการใช้งานบางประเภท เช่น การนำไคโตแซนมาใช้เป็นตัวตกตะกอน (flocculant)

Wolform และคณะ (1958) ได้ทดลองใช้ ไคติน 50 กรัมใส่ใน 2.4 ลิตร ของ 40 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ บ่มไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน นำมากรองและล้าง พบว่าหมู่อะเซทิลถูกกำจัดออก 82 เปอร์เซ็นต์

เยาวภา ไหวพริบ (2534) ได้ทำการทดลองผลิตไคโตแซนจากเปลือกกุ้งด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เพื่อกำจัดหมู่อะเซทิล ในอัตราส่วนปริมาณไคติน ต่อปริมาณด่างเท่ากับ 1:20 กวนตลอดเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 140±10 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน พบว่าเกิดการดีอะเซทิลเลชั่น โดยเฉลี่ยประมาณ 90-92 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากภาวะที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะเซทิล เป็นภาวะที่รุนแรง ทั้งอุณหภูมิที่สูงและเวลาที่ค่อนข้างนาน ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปในการกำจัดหมู่อะเซทิล จะทำให้ไคโตแซนที่ผลิตได้สูญเสียธรรมชาติและทำให้โมเลกุลของไคโตแซนเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย มวลโมเลกุลของไคโตแซนจะลดลง (Bough, 1978) นอกจากนี้วิธีทางเคมีจำเป็นต้องกระทำภายใต้บรรยากาศก๊าซเฉื่อย ได้แก่ ก๊าซไนโตรเจน และพบว่าถ้าใช้กระบวนการกำจัดหมู่อะเซทิลภายใต้บรรยากาศที่มีไนโตรเจน จะให้ปริมาณไคโตแซนที่

มีความหนืดสูงและให้น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าในบรรยากาศที่มีออกซิเจน ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยา oxidation จากออกซิเจนในอากาศมีผลต่อขนาดของโมเลกุลของไคโตแซน โดยออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายของสายโมเลกุลให้สั้นลง (Lusena และ Rose, 1953)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซน โดยวิธีทางเคมีมีข้อจำกัดหลายอย่าง ทั้งกระบวนการผลิตมีภาวะค่อนข้างรุนแรงและอันตราย ต้องใช้อุณหภูมิที่สูง เป็นเวลานาน สารละลายด่างที่ใช้มีความเข้มข้นสูง และยังเหลือปริมาณของด่างทิ้งในกระบวนการผลิตเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Bemiller และWhister, 1962; Gao และคณะ,1995) ในทางอุตสาหกรรมกระบวนการผลิตไคโตแซน ด้วยวิธีทางเคมี จะได้ผลผลิตไคโตแซนที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในกระบวนการผลิต โดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนจะน้อยลง กระบวนการผลิตค่อนข้างยุ่งยากต้องใช้ต้นทุนสูง และสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physiochemical characteristics) ของไคโตแซนที่ผลิตได้ไม่แน่นอน (Rane และ Hoover, 1993)

3.2 วิธีทางชีวภาพ

จากรายงานการวิจัยของ Araki และIto, 1975 พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งทำหน้าที่ไฮโดรไลส์กลุ่มอะเซทิลออกจากไคติน ทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดหมู่อะเซทิล (% degree of deacetylation) เพิ่มสูงขึ้นโดยไม่ต้องใช้ภาวะการไฮโดรไลส์ที่รุนแรงและอันตรายโดยวิธีทางเคมี ดังกล่าวข้างต้น อีกทั้งวิธีทางชีวภาพเป็นการลดปริมาณด่างที่ใช้ในการผลิตและเหลือทิ้งสู่สิ่งแวดล้อม ในกระบวนการผลิตสามารถควบคุมการไฮโดรไลส์ เอากลุ่มอะเซทิลออกจากไคตินได้ และในการใช้เอนไซม์เป็นไบโอแคตตาลิส (biocatalyst) เป็นทางหนึ่งที่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยลง เพราะเอนไซม์เองก็ถูกย่อยสลาย และถูกทำลายได้ง่ายในกระบวนการในธรรมชาติ หรืออาจมีวิธีการนำเอนไซม์มาใช้ได้อีกในการผลิตครั้งต่อไป ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิตและค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการใช้สารเคมี

4. ไคติน-ดีอะเซทิลเลส (chitin deacetylase)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการไฮโดรไลส์มวลของไคติน-ไคโตแซน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ chitinolytic enzyme เช่น ไคติเนส และ chitosanolytic enzyme เช่น ไคโตซาเนส

ส่วนไคติน-ดีอะเซทิลเลสนั้น เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจากโมเลกุลของ N-acetylglucosamine ในสายโพลีเมอร์ของไคติน ทำให้เกิดไคโตแซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การดีอะเซทิลเลชั่นต่างๆ กัน และได้กรดอะซิติกอิสระ แสดงดังต่อไปนี้

ไคติน - ดีอะเซทิลเลส

$$\underset{\text{ไคติน}}{\text{(1,4) - linked (GlcNAc)}_n} \longrightarrow \underset{\text{ไคโตแซน}}{\text{(1,4) linked (GlcN}_m\text{, GlcNAc}_{n-m}\text{)}} + \underset{\text{กรดอะซิติก}}{m\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}}$$

ได้มีผู้ทำการทดลองเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสในจุลินทรีย์ไว้ดังนี้

ในปี 1975 Araki และ Ito ได้ศึกษาไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อรา *M. rouxii* AHU 6019 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารวายพีจี ที่ประกอบด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ของ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ของ โพลีเปปโตน และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของ สารสกัดจากยีสต์ (Bartnicki - Garcia และNickerson, 1962) ปรับ pH 4.5 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ได้ตรวจพบไคติน-ดีอะเซทิลเลส ภายในเซลล์ เอนไซม์นี้สามารถย่อย glycol chitin และ N-acetylchitooligomers แต่ไม่ย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน และpolymer ของ N-acetylgalactosamine รวมทั้ง monomer และ dimer ของ N-acetylglucosamine

ในปี 1984 Davis และ Bartnicki – Garcia ศึกษาการสร้างไคโตแซนจากเชื้อ *M. rouxii* สายพันธุ์ IM-80 (ATCC 24905) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลววายพีจี (Bartnicki-Garcia และ Nickerson, 1962) และสรุปการสร้างไคโตแซนในหลอดทดลองได้โดยการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ ไคติน-ซินทีเทส (chitin synthetase) และไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งแยกได้จากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และจากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์จะทำงานกันอย่างต่อเนื่อง นั่นคือเมื่อไคติน-ซินทีเทส ได้สร้างไคตินขึ้นมาใหม่ๆ โดยใช้สารตั้งต้นได้แก่ uridine diphosphate-N-acetylglucosamine จากนั้นไคติน-ดีอะเซทิลเลส จึงจะเข้าไปไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจากไคติน จนในที่สุดได้เป็นไคโตแซน ซึ่งเป็นสมบัติของผนังเซลล์ราในกลุ่ม Zygomycetes และพบว่า pH ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ 6.5

Siegrist และKauss (1990) ตรวจพบไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็น extracellular enzyme ของเชื้อก่อโรคที่ใบของต้นแตงกวา ได้แก่ เชื้อรา *Collectotrichum lagenarium* pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 7.5 เมื่อนำเอนไซม์ผ่านความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง 17 เปอร์เซ็นต์ และถ้าใช้เวลานานขึ้นเป็น 30 นาที แอคติวิตี จะลดลง 56 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าไคติน - ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อนี้เป็นเอนไซม์ที่ทนร้อนได้ดี

Christodoulidou และคณะ (1996) ได้รายงานว่า พบไคติน - ดีอะเซทิลเลส ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในช่วงชีวิตที่มีการแตกหน่อ(budding) และช่วงการเกิดสปอร์ (sporulation)

สำหรับในแบคทีเรีย ได้มีรายงานของ Ohishi และคณะ (1997) พบเอนไซม์ไคติน - ดีอะเซทิลเลส ใน *Vibrio alginolyticus* H-8 ซึ่งจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็น dimer ของ N-acetylglucosamine เท่านั้น ไม่สามารถไฮโดรไลส์ หมู่อะเซทิลออกจาก N-acetylglucosamine และ N-acetylchitooligosaccharides หรือ ไคตินได้ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่พบนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ CD_1 และCD_2 ซึ่งมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ 48 KDa และ46 KDa ตามลำดับ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

สำหรับ CD_1 คือ 8.5-9.0 และ45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วน CD_2 พบว่า pH ที่เหมาะสม คือ 8.0-8.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 40 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเอนไซม์ ดีอะเซทิลเลสชนิดอื่น ซึ่งทำหน้าที่ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิล ตัวอย่างเช่น poly (N-acetylgalactosamine) deacetylase จากเชื้อ *Aspergillus parasiticus* AHU 7165 โดย Araki และ Ito (1979) พบว่าเอนไซม์นี้สามารถไฮโดรไลส์ เอาหมู่อะเซทิลออกจาก N-acetylgalactosamine residues ใน poly (N-acetylgalactosamine) โดยทำงานได้ดีกับสับสเตรทที่เป็นโพลีเมอร์ และจะทำงานช้ามากต่อ สับสเตรทที่เป็น โอลิโกเมอร์ (oligomer) เอนไซม์นี้จะไม่ไฮโดรไลส์หมู่อะเซทิลออกจาก monomer และ dimer ของ N-acetylgalactosmine N-acetyl galactosamine-1-phosphate และuridine diphosphate N-acetylglucosamine รวมทั้ง N-acetylglucosamine และไคติน

5. การสังเคราะห์ไคตินและไคโตแซน

การเริ่มต้นกระบวนการสร้างไคติน-ไคโตแซน โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นผ่านเอนไซม์ต่าง ๆ จนได้ fructose-6-phosphate ในกระบวนการ glycolysis และได้ uridine diphosphate -N- acetylglucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ไคติน-ซินทีเทส จนในที่สุดได้ไคตินที่เพิ่งถูกสร้างขึ้นมาใหม่ หรือที่เรียกว่า เนสเซน ไคติน (nascent chitin) และจะเป็นสับสเตรทที่จำเพาะต่อไคติน-ดีอะเซทิลเลส ต่อไป (Araki และ Ito, 1975) ดังได้แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไคติน-ไคโตแซนในภาคผนวก ง และจากรายงานของ Gao และคณะ(1995) พบว่าเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ในเชื้อ *Absidia coerulea* จะอยู่ที่บริเวณช่องว่างเพอริพลาสมิค (periplasmic space) และเมื่อสายของไคตินที่เพิ่งถูกสร้าง เคลื่อนไปที่ผนังเซลล์ของรา มันจะถูกไคติน-ดีอะเซทิลเลส ไฮโดรไลส์เอาหมู่อะเซทิลออกก่อน เพื่อเพิ่มระดับของการดีอะเซทิลเลชั่น (% degree of deacetylation) จนได้ไคโตแซนที่ผนังเซลล์ ดังนั้น จึงปรากฏว่าราบางชนิด โดย

เฉพาะในกลุ่ม Zygomycetes จะมีผนังเซลล์เป็นไคโตแซน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของรา ในกลุ่มนี้ (Bartinicki - Garcia, 1968)

จะเห็นได้ว่าการสร้างผนังเซลล์ของราที่มีไคโตแซน ต้องมีการทำงานของเอนไซม์สองชนิด ได้แก่ ไคติน-ซินทีเทส และไคติน-ดีอะเซทิลเลส ซึ่งทำงานด้วยกันตามลำดับ (tandam) โดยไคตินถูกสร้างขึ้นก่อน จากนั้นจึงถูกไคติน-ดีอะเซทิลเลสไฮโดรไลส์เอาหมู่อะเซทิลออกจนได้ไคโตแซน และเป็นไปได้ว่าเชื้อที่มีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นไคโตแซน จะสามารถผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลสได้ด้วยตัวมันเอง (Davis และ Bartnicki - Garcia, 1984)

6. การแยกไคติน-ดีอะเซทิลเลสให้บริสุทธิ์

ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการทำเอนไซม์ไคติน-ดีอะเซทิลเลสให้บริสุทธิ์ไว้ดังนี้

ในปี ค.ศ.1993 Kafetzopoulos และคณะได้ศึกษา ไคติน-ดีอะเซทิลเลสในรา *Mucor rouxii* ATCC 24905 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลววายพีจี และได้สกัดเอนไซม์จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ให้บริสุทธิ์ โดยขั้นแรกได้บ่มน้ำสกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มี Phenyl - Sepharose บรรจุอยู่ และนำมาผ่านคอลัมน์ Q-Sepharose และ S-Sepharose ตามลำดับ ซึ่งอาศัยการแลกเปลี่ยนประจุในการแยกโปรตีน ทำให้ได้ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่บริสุทธิ์ 11.9 เปอร์เซ็นต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 97.3 เท่า เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีแยกตามขนาดโมเลกุล โดย size - exclusion chromatography และวิธี SDS - PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 80 KDa และ 75 KDa ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (monomer) ไม่มีsubunit นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ที่ได้เป็นพวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein) คือ มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลแมนโนส (mannose) ปน

อยู่เป็นจำนวนหนึ่ง โดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ไคติน-ดีอะเซทิลเสที่ได้ ต้องการสับสเตรทที่มี อย่างน้อย 4 โมเลกุลของ N-acelyl glucosamine residue (chitotetraose) เกาะติดกัน สำหรับการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยกรดคาร์บอกซีลิก และกรดอะซิติก และเอนไซม์ไม่ต้องการ metal ions ร่วมในการทำงาน อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 จะเหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ เมื่อใช้ไกลคอลไคติน (glycol chitin) เป็นสับสเตรท

ต่อมาในปี ค.ศ.1995 Goa และคณะ พบว่าในรา *A. coerulea* ซึ่งจัดอยู่ในคลาส Zygomycetes เช่นเดียวกับ *M. rouxii* สามารถสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส ได้เช่นกัน โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ โพลีเปปโตน 5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากมอลต์ 3 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 ได้ไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ นำมาทำให้บริสุทธิ์ได้เพิ่มขึ้นถึง 516 เท่า โดยผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อิ่มตัว เข้มข้น 65-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้ Butyl Toyopearl - 650 M คอลัมน์ Gigapite และ DEAE Toyopearl - 650 M พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์ 4.1 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีโมเลกุลขนาด ประมาณ 75 KDa จากทั้งสองวิธีที่วิเคราะห์ด้วย SDS - PAGE และวิธีเจลฟิลเตรชั่น และได้ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ พบว่าประกอบไปด้วย Gly - Glu - Tyr - Trp - Gln - Ser - Phe จากด้านปลาย N (amino terminal) เอนไซม์จะสามารถย่อยสับสเตรทที่เป็นโอลิโกเมอร์ของ N- acetylglucosamine ที่มีตั้งแต่ 3 โมเลกุลขึ้นไป อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ได้เป็นเอนไซม์ที่ทนร้อน ถูกยับยั้งโดย Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ และไม่ถูกยับยั้งโดย EDTA , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}, Ca^{2+} Zn^{2+} และ Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.001 และ 0.01 โมลาร์ และได้ทดลองใช้ไคติน-ซินทีเทส สร้างเนสเซน ไคติน ซึ่งเป็นไคติน

ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ ๆ ในหลอดทดลอง และพบว่าไคติน-ดีอะเซทิลเลส ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว สามารถเปลี่ยน เนสเซน ไคติน ให้เป็นไคโตแซนได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาตำแหน่งของ ไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิมมิวโนอิเลกตรอน (immunoelectron microscopy) พบตำแหน่งของเอนไซม์ อยู่ใกล้ผิวชั้นในของผนังเซลล์ หรือที่เรียกว่า ช่องว่างเพอริพลาสมิค (periplasmic space)

ในปี 1996 Tokuyasu และคณะ ได้ศึกษาไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากรา *Collectotrichum lindemuthianum* ซึ่งเป็นราที่จัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบไปด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์ ของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากมอลต์ และ0.4 เปอร์เซ็นต์ ของสารสกัดจากยีสต์ โดยปรับ pH เท่ากับ 5.8 บ่มบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ได้สกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเส้นใยออก ซึ่งเป็นเอนไซม์ส่วนที่ถูกขับออกภายนอกเซลล์ โดยได้ปริมาณเอนไซม์ 4.05 เปอร์เซ็นต์ (% yield) และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 944 เท่า จากขั้นตอนดังนี้ การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วผ่านไฮโดรโฟบิค โครมาโตรกราฟี ด้วยคอลัมน์ Butyl - Toyopearl จากนั้นนำมาผ่านแอนไอออน เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตรกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Q-Sepharose และคอลัมน์ Resource-Q ตามลำดับ ตรวจพบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31.5 KDa โดยวิธี SDS - PAGE และ 33.0 KDa จากการทำเจลฟิลเตรชั่น ส่วนอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส และ 11.5 - 12.0 ตามลำดับ เมื่อใช้ไกลคอลไคติน เป็นสับสเตรท จากการศึกษาสับสเตรทของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จะสามารถไฮโดรไลส์ ไคตินที่ถูกดีอะเซทิลเลทบางส่วน ที่อยู่ในรูปของสารละลาย (partially N-deacetylated water soluble chitin) และไคตินสายสั้น ๆ ซึ่งมี N-acetylglucosamine ต่อกันตั้งแต่ 4 ตัวขึ้นไป เอนไซม์จะไม่ถูกยับยั้งด้วยอะซิเตท โดยในขณะที่มี 0.1 โมลาร์ของโซเดียมอะซิเตท จะยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจากไคติน-ดีอะเซทิลเลส ใน *M. rouxii*

ในการหาแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส นิยมใช้สองวิธีดังนี้

1. วัด Radioactivity ของ [acetyl - ^{3}H] จาก glycol [acetyl - ^{3}H] chitin ซึ่งสารนี้ใช้เป็นสับสเตรทของไคติน-ดีอะเซทิลเลส และติดตามผลของปฏิกิริยา โดยใช้เครื่อง liquid scintillation counter (Araki และIto, 1975) ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากเชื้อ *M. rouxii* โดย Kafetzopoulos และคณะ(1993) และจากเชื้อ *A. coelurea* โดย Goa และคณะ (1995) ได้ทำวิธีเดียวกัน

2. วิธีเปรียบเทียบสี (colorimetric method) เป็นวิธีวัดปริมาณของหมู่ amine ที่ได้จากการไฮโดรไลส์ หมู่อะเซทิลออกจาก N – acetylglucosamine ของสับสเตรท ที่เป็นไคติน ไคโตแซน ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของไคติน-ดีอะเซทิลเลส โดยวิธีเปรียบเทียบสีจากปฏิกิริยาของหมู่ amine กับสาร 3- เมทิล -2- เบนโซไทอะโซลิโนน ไฮดราซีน ดังได้มีรายงานของ Kauss และBauch(1988) ในการวัดแอคติวิตีของไคติน-ดีอะเซทิลเลส จากเชื้อ *C. lindemuthianum*

7. การนำไคโตแซนมาประยุกต์ใช้

7.1 สมบัติทั่วไปของไคโตแซน

ไคโตแซน เป็นสารอินทรีย์ที่เกิดตามธรรมชาติ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ และไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไคติน มีสมบัติไม่ละลายน้ำ และสารอินทรีย์ทั่วๆไป ส่วนไคโตแซนสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิดแล้วเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้ สารละลายไคโตแซน มีความเหนียว(viscous) มีความใสและสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเจล เม็ด และเส้นใยได้ ไคโตแซนมีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งสามารถจะทำปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อที่จะเปลี่ยนให้เป็นสารอนุพันธุ์อื่น ๆ (derivatives) ได้หลายชนิด เช่น N-carboxybutyl chitosan เป็นโพลีเมอร์ ที่สามารถละลายน้ำได้ และใช้ทำเป็นฟิลม์ หรือเป็นแผ่นกรองสารละลาย

ช่วยในการตกตะกอนของโลหะหนัก (Muzzarelli 1977) และไกลคอลไคติน ซึ่งมีสมบัติละลายน้ำได้ดีขึ้น เป็นต้น

7.2. ประโยชน์จากไคโตแซน

ไคโตแซนได้รับการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

7.2.1 ด้านการแพทย์

จากรายงานของ Muzzarelli (1977) ได้กล่าวถึงการนำผลิตภัณฑ์จากไคโตแซนมาใช้ ดังเช่น ใช้เป็นผ้าปิดแผลไฟไหม้ และน้ำร้อนลวก รักษาบาดแผลซึ่งอยู่ในรูปผงโรยบริเวณบาดแผล ทำให้แผลสมานได้เร็วขึ้น และใช้เป็นด้ายเย็บบาดแผล ใช้สะดวก แผลหายเร็ว สลายตัวเมื่อแผลติดกัน และคนไข้ไม่เกิดอาการแพ้ง่าย อีกทั้งนำไคโตแซนทำแคปซูลยา ซึ่งไม่มีพิษ มีประสิทธิภาพในการแตกตัวได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยลดคลอเรสเตอรอลในเลือด และป้องกันความดันโลหิตสูง

7.2.2 ด้านเครื่องสำอางค์

Muzzrelli (1977) ยังได้กล่าวถึงประโยชน์ของไคโตแซนในด้านเครื่องสำอางไว้ด้วย โดยการนำไคโตแซนมาเป็นส่วนผสมในแชมพูสระผม ครีมนวดผม และครีมปรับสภาพผม เนื่องจากสารละลายไคโตแซนมีความหนืด เก็บความชุ่มชื้นได้ดี และมีคุณสมบัติในการเคลือบผมให้เงางาม สามารถใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางที่ใช้แต่งหน้า เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น ความเรียบ ให้กับการแต่งหน้าได้นาน ๆ และใช้ทำโลชั่นรักษาผิว ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ป้องกันไม่ให้ผิวแห้ง เพิ่มความเนียนนุ่ม

7.2.3 ด้านอาหาร

ใช้เป็นอาหารลดน้ำหนัก เพราะไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอิสระซึ่งสามารถที่จะจับกับไขมันได้ดี ทำให้เอนไซม์ในกระเพาะไม่สามารถย่อยไขมันได้ และไคโตแซนเองไม่ถูกละลายด้วย กรดในกระเพาะทำให้สามารถที่จะขับถ่ายออกมาได้ โดยอาจอยู่ในรูปของแคปซูล อาหารเสริมเพื่อสะดวกในการบริโภค (Knorr, 1991)

7.2.4 ด้านการบำบัดน้ำเสีย

นำไคโตแซนมาเป็นตัวสร้างตะกอน (flocculant) สำหรับใช้ในกระบวนการสร้างตะกอนและตกตะกอน (coagulation and flocculation) เพื่อการบำบัดน้ำเสีย ใช้กำจัดสารปรอทในน้ำให้มีระดับต่ำกว่าระดับที่อนุญาตให้มีในน้ำดื่ม และใช้ไคโตแซนเป็นตัวสร้างตะกอน เพื่อกำจัด metal ion เช่น Zn^{2+} Cd^{2+} Cu^{2+} และ Ni^{2+} ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Muzzarelli, 1977)

7.2.5 ด้านการเกษตรกรรม

ใช้ผงไคโตแซนโรยบริเวณรากของพืช ทำให้เกิดการแพร่กระจายอากาศได้ดี ทำให้รากสามารถเจริญเติบโต ชอนไชได้ดีขึ้น และใช้เป็นปุ๋ยซึ่งทำให้ Actinomyces มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่มีผลยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช เช่น *Fusarium oxysporum* และ *F. solani* อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ เช่น alfarfa mosaic virus เป็นต้น (Madhavan และคณะ ,1986)

7.2.6 ด้านอุตสาหกรรม

ไคโตแซนที่ขึ้นรูปเป็นเม็ด สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับถังหมักได้ เช่น เป็นตัวห่อหุ้มและยึดเกาะสำหรับเอนไซม์และโปรตีน (immobilize) และยังสามารถใช้เป็นตัวกลางในการจับโลหะโดยปฏิกิริยาการเกิดคีเลต (chelating agents reaction) นอกจากนี้ยังนำไปใช้เพิ่มคุณภาพของวัสดุทำภาชนะบรรจุกุ้งแช่แข็งได้ (Muzzarelli, 1977)

7.2.7 ประโยชน์ด้านอื่น ๆ

ในทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ใช้ไคโตแซนเป็นเยื่อเมมเบรนเพื่อใช้ในการกรองน้ำผลไม้และใช้เป็นตัวตกตะกอนโปรตีนที่ต้องการได้ดี (Muzzarelli, 1977)

สำหรับการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อแยกสายพันธุ์ราจากแหล่งเชื้อต่างๆ และคัดเทียบ ความสามารถในการสร้างไคติน-ดีอะเซทิลเลส เพื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหาร และภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไคติน-ดีอะเซทิลเลส และสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี หาสมบัติบางประการ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ รวมทั้งศึกษาการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทในรูปผงและสารละลาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย