บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หัวข้อสำคัญ

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา แบ่งเป็นหัวข้อดังนี้

1. ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน
2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน
   - 2.1 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน
   - 2.2 สมบัติที่สำคัญบางประการของไคตินและไคโตซาน
   - 2.3 แหล่งของไคตินและไคโตซาน
   - 2.4 ไคตินและไคโตซานจากรา
     - 2.4.1 เปรียบเทียบปริมาณไคตินจากราและไคตินจากแหล่งต่างๆ
     - 2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไคตินและไคโตซานของรา
     - 2.4.3 ข้อได้เปรียบของการใช้ราเป็นแหล่งไคตินสำหรับผลิตไคโตซาน
   - 2.5 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน
3. การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานโดยรา
4. การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน

ไคติน

ไคตินเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะซิติลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล

ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคติน (Muzzarelli, 1977)

ปี 1811 มีการศึกษาเกี่ยวกับไคตินครั้งแรกโดย Braconnot โดยนำเอาเห็ด *Agaricus volvaceus* และเห็ดชนิดอื่น ๆ มาละลายในสารละลายด่าง แล้วทำการแยกไคตินซึ่งสารที่กลั่นได้เมื่อทำให้แห้งแล้วเรียกว่า "Fungine"

ปี 1823 Odier พบว่าโครงสร้างภายนอกของแมลงมีสารชนิดเดียวกันกับที่พบในโครงสร้างของพืชจึงเรียกสารที่พบเป็นภาษากรีกว่า "Chiton" และได้ชื่อว่าเป็นคนแรกที่ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างภายนอกของแมลงกับเนื้อเยื่อของพืช

ปี 1843 Lassaigne พบไคตินบริเวณปีกและส่วนภายนอกของตัวไหม *Bombyx mori*

ปี 1878 Ladderhorse พบว่าไคตินนั้นประกอบไปด้วยหน่วยของกลูโคซามีนและกรดอะซิติก

ปี 1951 Blumberg et al. ทดลองสกัดไคตินในสัตว์น้ำ เช่น กุ้งและปู

ปี 1978 Bough ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง พบว่าปัจจัยที่ผลต่อไคตินมีหลายปัจจัยด้วยกัน แต่ที่สำคัญคือระยะเวลาในการสกัด ความเข้มข้นของสารละลายด่าง รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วย ส่วนในหมึกพบว่ามีไคตินอยู่ปริมาณน้อยที่บริเวณเปลือกนอกและส่วนใหญ่จะอยู่รวมกับกลุ่มของไฟบรัสโปรตีน (Fibrous protein) แต่จะพบไคตินมากในส่วนที่เป็นแกนแข็ง

ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ออกจากสายของไคติน เหลือเป็นหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคโตซาน (Muzzarelli, 1977)

ปี 1859 ไคโตซานนั้นพบครั้งแรกโดย Rouget โดยการนำเอาไคตินมาต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงและพบว่าไคตินที่นำมาต้มนั้นสามารถละลายในกรดอินทรีย์ได้ ซึ่งเรียกว่า Modified chitin และเมื่อนำมาทดสอบสีโดยการผสมด้วยสารละลายไอโอดีนและกรด พบว่าให้สีม่วงในขณะที่ไคตินให้สีน้ำตาล

ปี 1894 Hoppe-Seyler ให้คำเฉพาะของ Modified chitin ว่า Chitosan

ปี 1931 Rammelberg พบว่ามีไคตินจากราและเปลือกปู

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในช่วงปลายปี 1930 ถึง 1940 มีการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ของไคตินและอนุพันธ์ของไคตินกันมาก แต่เนื่องมาจากกระบวนการสกัดที่ซับซ้อน รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษาวัตถุดิบนั้นสั้นเพราะอาจเกิดการเน่าเสียได้ จึงทำให้มีความสนใจน้อยลง

ปี 1970 มีการพัฒนาเทคโนโลยีขึ้น รวมทั้งมีปริมาณของวัตถุดิบจากแหล่งต่าง ๆ กันมากขึ้น จึงเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับไคตินและไคโตซานเพื่อนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้นเรื่อย ๆ

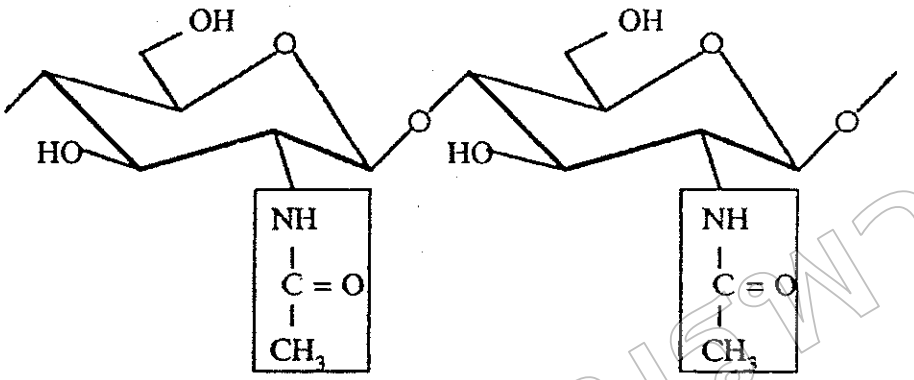
ปี 1991 Knorr ได้ทดลองใช้ไคตินและไคโตซานที่ได้จากกระบวนการผลิตอาหารที่มีกุ้งเป็นส่วนประกอบมาใช้ประโยชน์ เช่น การดูดซับโลหะหนัก สีย้อมและยาฆ่าแมลง เป็นต้น

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไคตินและไคโตซาน

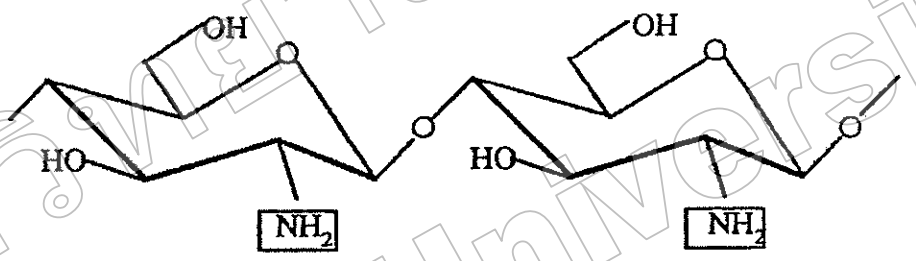
1. โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นพอลิเมอร์ของกลูแคน (Polymer of glucan) จัดเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งมีโครงสร้างเคมีคล้ายเซลลูโลสต่างกันตรงที่หน่วยย่อย (Monomer) ของเซลลูโลสเป็น D-glucose ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ดังแสดงในภาพที่ 2-1 ส่วนหน่วยย่อยของไคตินคือ *N*-acetyl-D-glucosamine ซึ่งมีหมู่อะเซตามิโด ($-NH-CO-CH_3$) เกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง โดยหน่วยย่อยนี้จะเรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ 1,4 β-glycosidic bond มีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-acetyamido-2-deoxy-D-glucose สูตรทั่วไปคือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 47.29 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.45 ไนโตรเจนร้อยละ 6.89 และออกซิเจนร้อยละ 39.37 โดยน้ำหนัก (Hon, 1996) เมื่อย่อยสลายไคตินเป็นหนึ่งหน่วยจะได้ *N*-acetyl-D-glucosamine เป็นโมโนเมอร์ เมื่อทำการต่อหน่วยโมโนเมอร์เข้าด้วยกันจะได้เป็น poly (*N*-acetyl-D-glucosamine) อย่างไรก็ตามไคตินในธรรมชาติจะมีบางหน่วยที่ไม่มีหมู่อะซิติล ($-CO-CH_3$) โดยเฉลี่ยร้อยละ 10 ในสายพอลิเมอร์ เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้างของไคตินพบว่าไคตินเป็นสารโมเลกุลยาวที่ไร้ประจุ (Non electrolytic polymer) ซึ่งทำให้ไคตินมีความสามารถในการละลายได้ค่อนข้างยากในสารละลายทั่ว ๆ ไป การใช้ประโยชน์จากไคตินจึงไม่แพร่หลายนัก อย่างไรก็ตามสามารถเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานโดยวิธีทางเคมีซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

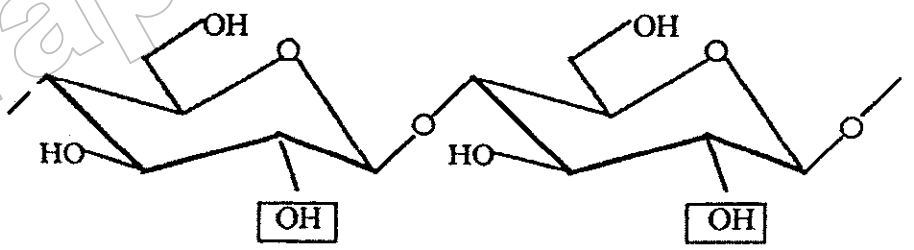
ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน (Chitin derivative) ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไคติน โดยการกำจัดหมู่อะซิติล (Deaceylation) ออกจากไคติน ทำให้หมู่อะเซตามิโดที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองของหน่วยย่อยไคตินถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ดังนั้นหน่วยย่อยของไคโตซานคือ D-glucosamine มีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-amido-2-deoxy-D-glucose (Muzzarelli, 1985)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของไคติน (ก) ไคโตซาน (ข) เปรียบเทียบกับเซลลูโลส (ค) (Robert, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. สมบัติที่สำคัญบางประการของไคตินและไคโตซาน

ไคโตซานมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากพอลิแซคคาไรด์หรือสารไฮโดรคอลลอยด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอื่น ๆ กล่าวคือไคโตซานมีสมบัติเป็นประจุบวก (Cationic polyelectrolyte) เนื่องจากไคโตซานมีประจุบวกบนหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้ไคโตซานมีความสามารถในการดูดซับ (Adsorp) ได้แก่ สารอินทรีย์ โปรตีน กรดนิวคลีอิกและอิออนโลหะ เป็นต้น เนื่องจากคุณสมบัติการดูดซับที่ดี ไคโตซานจึงทำหน้าที่เป็น Coagulating agent ได้ดี คุณลักษณะของไคโตซานที่สำคัญในการพิจารณาไคโตซานส่วนใหญ่จะคำนึงถึงค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation; % DD) และน้ำหนักโมเลกุลและสมบัติอื่น ๆ เช่น สมบัติในการละลาย (Solubility) (Muzzarelli, 1977)

2.1 สมบัติในการละลาย (solubility)

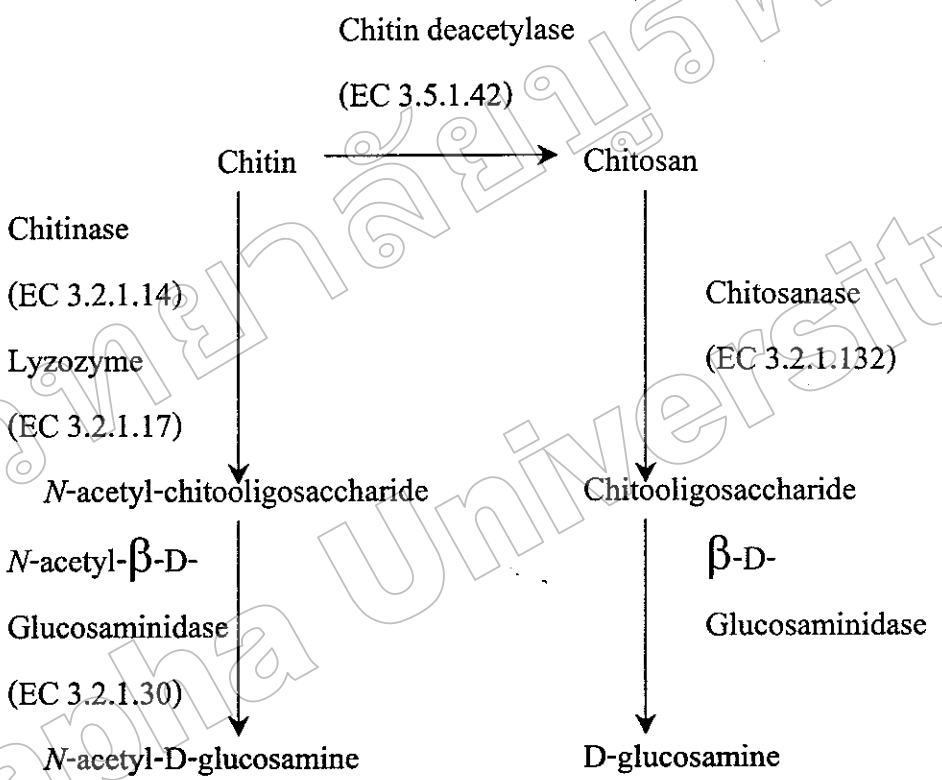
ไคตินมีสมบัติเป็นของแข็ง ไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างที่เจือจาง แอลกอฮอล์และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น แต่สามารถละลายได้ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 78-79 โดยน้ำหนัก กรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำและ DMAc-LiCl (*N,N*-Dimethyl-acetamine ที่มี Lithium chloride) ไคตินมีสมบัติในการละลายค่อนข้างต่ำ เนื่องจากโมเลกุลเป็นสายโซ่ที่เกาะกันอยู่อย่างหนาแน่น การที่ไคตินไม่ละลายในกรดเจือจางและด่างจึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้

สมบัติของไคโตซานนั้นไม่ละลายในน้ำ ด่างและตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) แต่ไคโตซานมีสมบัติเป็น Cationic polyelectrolyte เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) ดังนั้นไคโตซานจึงสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6 เช่น กรดฟอร์มิกความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.2-100 โดยปริมาตร (Knorr, 1984) และกรดอะซิติก ซึ่งนิยมใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ในการละลายไคโตซาน (Muzzarelli, 1977) นอกจากนี้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-1.10 และละลายได้น้อยในสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร จากสมบัติการละลายดังกล่าวทำให้สามารถนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางมากกว่าใช้ในรูปของไคติน

2.2 การย่อยสลาย (Degradation)

ไคตินและไคโตซานจัดเป็นพอลิแซคคาไรด์ ดังนั้นเมื่อเกิดการย่อยสลายจะให้สายโมเลกุลที่สั้นลงเป็นโอลิโกเมอร์ (Oligomer) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่าโมโนเมอร์ (Monomer) หรือโมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide)

โอลิโกเมอร์ของไคตินและไคโตซาน คือ *N*-acetyl-chitooligosaccharide และ Chitooligosaccharide ตามลำดับ ส่วนโมโนเมอร์ของไคตินและไคโตซาน คือ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ ซึ่งการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานมีได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้กรดด่าง คลื่นเสียง ความร้อนและเอนไซม์ โดยที่การใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าวิธีอื่น ๆ คือ มีความจำเพาะมากกว่ากระบวนการในการย่อยสลายของไคตินและไคโตซานด้วยเอนไซม์ ดังแสดงในภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 การย่อยสลายของไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์ (Mitsutomi, 2002)

2.3 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation, %DD) ของไคโตซาน

การกำจัดหมู่อะซิติลมากหรือน้อยจะมีผลต่อโครงสร้างและสมบัติของไคโตซานที่ได้ ปกติจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะซิติล (% Degree of deacetylation) กล่าวคือ ถ้าไคตินมีเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับ 50 %DD แสดงว่าโครงสร้างของไคตินนี้จะมีหน่วยย่อย D-glucosamine เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ นั่นคือพอลิเมอร์นี้จะเกิดสภาพการเป็นไคโตซาน ($-NH_2$) เพิ่มขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปไคตินจะถูกเรียกว่าไคโตซานเมื่อหมู่อะซิติลถูกกำจัดออกไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 60 %DD และถ้าไคตินถูกกำจัดหมู่อะซิติลออกไป 90-100 เปอร์เซ็นต์ เรียกไคตินว่า Fully deacetyled chitosan (Muzzarelli, 1985) ดังนั้นตัวบอกถึงคุณภาพของไคตินและ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไคโตซานคือเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะซิติลออกคือยิ่งมีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลออกมากเท่าไรหรือเป็นจำนวนมากจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซานเด่นชัด โดยมีการวัดระดับอะซิทิเลชั่น (Acetylation degree) ของไคโตซานเพื่อพิจารณาถึงการใช้งาน ซึ่งการวิเคราะห์มีหลายวิธี ได้แก่ อินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Infrared spectroscopy: IR) สำหรับหาปริมาณของหมู่อะซิติล นอกจากนี้มีการวิเคราะห์โดยเทคนิคอื่นบ้าง เช่น การไตเตรทคอลลอยด์ (Colloid titration) เพื่อหาระดับของการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซานโดยใช้พอลิไวนิลซัลเฟตโพแทสเซียม (Polyvinyl sulfate potassium) เป็นไตแตรนท์และทอลูอิดิน (Toluidine blue: TB) เป็นอินดิเคเตอร์ คุณสมบัติส่วนใหญ่ของไคโตซานขึ้นอยู่กับระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ด้วยเหตุนี้จึงต้องวิเคราะห์หาค่า %DD ของไคโตซานซึ่งเป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ในการพัฒนาคุณสมบัติ โครงสร้างและการทำงานของไคโตซานตลอดจนการใช้งานของไคตินและไคโตซาน (Miyoshi et al., 1992)

3. แหล่งของไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่พบปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis) ไคตินเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใยยึดสารต่าง ๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะและสร้างความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ตามบริเวณโครงสร้างภายนอก (Exoskeleton) พบไคตินได้ทั่ว ๆ ไปในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสัตว์จำพวกมีปล้อง เช่น สัตว์ในไฟลัมอาร์โธโปดา (Phylum Arthropoda) เนื่องจากไคตินเป็นตัวทำให้โครงสร้างยึดกันเป็นรูปและคงสภาพแข็งแรงพอที่จะใช้เป็นเครื่องป้องกันตัวจากการทำร้ายของสัตว์อื่น ๆ ซึ่งพบมากในคลาส Crustacea ได้แก่ กุ้ง ปู กั้ง แกนหมึก ตลอดจนในคลาส Insecta ได้แก่ แมลงปีกแข็ง ด้วง แมลงสาบ เป็นต้น พบไคตินในหอยเปลือกแข็ง (Mollusca) หอยมุก (Gastropoda) และแหล่งสร้างไคตินที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง คือ เห็ด ราและยีสต์ เช่น *Aspergillus* spp., *Phycomyces* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. และ *Mortierella* spp. เป็นต้น ยีสต์ที่พบไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ เช่น *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบไคตินในเห็ด *Lactarius* spp., *Boletus* spp. และ *Agaricus* spp. เป็นต้น อีกทั้งพบในสาหร่ายบางชนิดเช่นในวงศ์ Chlorophyceae อีกด้วย (Knorr, 1984) โดยปริมาณไคตินที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป

สำหรับแหล่งของไคโตซานในธรรมชาติพบมากในจุลินทรีย์จำพวกเห็ด ราและยีสต์ ในผนังเซลล์ของรากลุ่ม Zygomycetes ส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นไคโตซานมากกว่าไคติน (Bartinicki-Garcia, 1968) ตัวอย่างราในกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhizopus oryzae* (Hang, 1989), *Mucor rouxii*, *Absidia coerulea*, *Rhizopus delemar*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Mortierella isabelina* (Miyoshi et al., 1992) และ *Absidia repens* (Davoust & Persson, 1992) เป็นต้น ส่วนยีสต์พบ

ไคโตซานในผนังเซลล์และในช่วงการสร้างสปอร์ (Sporulation) แหล่งของไคโตซานตามธรรมชาติพบได้น้อยกว่าไคติน ดังนั้นจึงมีการผลิตไคโตซานจากแหล่งไคตินธรรมชาติ ได้แก่ เปลือกกุ้ง ปู และแกนหมึกมากกว่าการผลิตจากผนังเซลล์ของรา ซึ่งกระบวนการผลิตจะเป็นกรรมวิธีทางเคมี (White et al., 1979) ไคตินที่มาจากแหล่งต่าง ๆ จะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพที่ 2-3

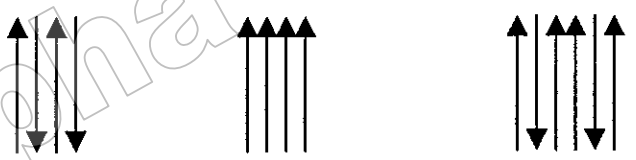
โครงสร้างของไคตินโดยทั่วไปมี 3 แบบได้แก่

(1) แอลฟาไคติน (α-chitin) เป็นแบบที่เส้นใยจัดเรียงตัวกลับไปมา ซ้อนกัน เส้นใยเรียงตัวได้แน่นและมีความแข็งแรงสูงสุด

(2) เบต้าไคติน (β-chitin) เป็นแบบที่เส้นใยเรียงตัวในทิศทางเดียวกัน เส้นใยเรียงตัวได้ไม่แน่นมาก

(3) แกมมาไคติน (γ-chitin) เป็นลักษณะผสมของแอลฟาและเบต้าเป็นแบบที่เส้นใยเรียงตัวไม่เป็นระเบียบไปในทิศทางเดียวกันบ้าง กลับทิศทางกันบ้าง

โดยทั่วไปจะพบโครงสร้างของไคตินเป็นแบบแอลฟาไคตินมากที่สุด ในการจัดเรียงตัวของโครงสร้างตามธรรมชาติพบว่าแอลฟาไคตินมีคุณลักษณะของเสถียรภาพทางเคมีสูงกว่าเบต้าไคติน ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (Intramolecular and intermolecular chain) มากกว่าจึงมีเสถียรภาพทางเคมีมากกว่าแบบอื่น (ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟู และก้องเกียรติ คงสุวรรณ, 2543; Ruiz-Herrera, 1992)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างการเรียงตัวของสายของไคตินแบบแอลฟา เบต้าและแกมมา (สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยอส้าน และโกสุม สมัครรัตน์, 2544)

4. ไคตินและไคโตซานจากรา

องค์ประกอบของผนังเซลล์ราจะเป็นพอลิแซคคาไรด์เป็นหลัก มีโปรตีนเพียงเล็กน้อยและพบไขมันในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งชนิดของพอลิแซคคาไรด์ที่พบนั้นแตกต่างไปในแต่ละกลุ่มของรา (Deacon, 1997) ดังแสดงในตารางที่ 2-1 กลุ่มของ Chytridiomycota, Ascomycota, Deuteromycota และ Basidiomycota มีไคตินและกลูแคนเป็นพอลิแซคคาไรด์หลักของผนังเซลล์

ไคตินประกอบเป็นหน่วยย่อยคือ *N*-acetyl-D-glucosamine เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ในขณะที่กลูแคนเป็นสายพอลิเมอร์ที่แตกแขนงประกอบกันด้วยพันธะ β-1,3 ราในกลุ่ม Zygomycota มีไคตินและไคโตแซนอยู่รวมกันที่ผนังเซลล์และมีองค์ประกอบพวกพอลิเมอร์ ได้แก่ กรดกลูคูโรนิกแทนกลูแคน ส่วนราในกลุ่ม Oomycota มีไคตินเป็นองค์ประกอบเล็กน้อยและมีเซลลูโลสเชื่อมกับ β-1,3 กลูแคนและ β-1,6 กลูแคน

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบพอลิแซคคาไรด์หลักในผนังเซลล์ของรา (Bartnicki-Garcia, 1968; Deacon, 1997)

องค์ประกอบผนังเซลล์	กลุ่มรา	ตัวอย่าง
1. Cellulose-glycogen	Acrasiomycetes	*Polysphondylium, Dictyostelium*
2. Cellulose-β-glucans	Oomycetes	*Phytophthora, Pythium, Saprolegnic*
3. Cellulose-chitin	Hyphochytridiomycetes	*Rhizidiomyces*
4. Chitin-chitosan	Zygomycetes	*Mucor, Phycomyces, Zygorhynchus*
5. Chitin-β-glucans	Chytridiomycetes Ascomycetes	*Allomyces,Blastocladiella*
	Deuteromycetes and	*Neurospora, Ajellomyces*
	Basidiomycetes	*Aspergillus*
		Schizophyllum, Fomes, Polyporus
6. Mannan-β-glucans	Ascomycetes	*Saccharomyces, Candida*
7. Chitin-mannan	Basidiomycetes	*Sporobolomyces, Rhodotorula*
8. Galactosamine-galactose polumers	Trichomycetes	*Amoebidium*

4.1 เปรียบเทียบปริมาณไคตินจากราและไคตินจากแหล่งอื่น ๆ

ไคตินที่พบในแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ เช่น ตามผนังเซลล์ของพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เป็นต้น มีอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2-2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไคตินจากรากับไคตินจากแหล่งอื่น ๆ แล้วจะเห็นได้ว่าไคตินจากราบางชนิด เช่น *Aspergillus* spp., *Rhizopus oryzae* และ *Phycomyces blakesleeanus* เป็นต้น มีปริมาณไคตินค่อนข้างสูงกว่าไคตินจากผนังเซลล์ของกุ้ง ปู หอยและแมลง เป็นต้น อย่างไรก็ตามปริมาณไคตินที่พบในราแต่ละชนิดอาจแปรผันได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น อายุ องค์ประกอบของสารอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น

ตารางที่ 2-2 ปริมาณไคตินที่พบในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (Knorr, 1984; Hamlyn & Schmidt, 1994)

แหล่งไคติน	ปริมาณไคติน (%)	รูปแบบของไคติน
Crustacea		
Crangon (shrimp)	69.1[c]	
Alaskan (shrimp)	28.0[c]	α-chitin
Cancer (crab)	72.1[c]	
Carcinus (crab)	64.2[c]	
Insect		
May beetle	16 .0[b]	
Colcoptera (beetle)	27-35[c]	α-chitin
Bombyx (silk worm)	44.2[c]	
Calleria (wax worm)	33.7[c]	
Molluscan organs		
Squid, sleletalpen	41.0[c]	β-chitin
Oyster shell	3.6[d]	
Clamshell	6.1[b]	
Fungi		
Aspergillus niger	42.0[a]	
Aspergillus phoenicis	23.7[a]	
Histoplasma capsulatum	25.8[a]	
Histoplasma farciminosum	40.0[a]	α-chitin
Mortierella vinacea	22.0[a]	
Phycomyces blakesleeanus	91.0[a]	
Rhizopus oryzae	72.0[a]	
Rhizomucor miehei	70.0[a]	

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

แหล่งไคติน	ปริมาณไคติน (%)	รูปแบบของไคติน
Fungi		
Penicillum notatum	18.5[a]	α-chitin
Mucor rouxii	44.5[a]	
Fusarium graminearum	19.0[a]	
Mucor mucedo	52.0[a]	
Penicillum chrysogenium	19.5-42.0[a]	
Trichoderma viridis	12.0-22.0[a]	
Neurospora crassa	8.0-11.9[a]	
Blastomyces dermatitidis	13.0[a]	
Saccharomycopsis gutulata	2.3[a]	

หมายเหตุ [a]Dry wieght of the cell wall

[b]Dry body weight

[c]Organic weight of cuticle

[d]Wet body weight

4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณไคตินและไคโตซานของรา

4.2.1 อายุ

อายุของรามีผลต่อปริมาณของไคตินและไคโตซาน องค์ประกอบดังกล่าวจะมีปริมาณสูงสุดที่ช่วงเวลาในการเลี้ยงช่วงใดช่วงหนึ่ง การใช้เวลาเลี้ยงรานานนั้นไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของไคตินและไคโตซาน เช่น *M. rouxii* มีปริมาณไคตินและไคโตซานสูงสุดเมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 2-3) (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997) ในขณะที่รามีการสังเคราะห์เส้นใยก็จะเริ่มมีการสะสมไคตินและไคโตซานที่ผนังเซลล์เพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงแก่เส้นใย จึงพบปริมาณไคตินและไคโตซานสูงในช่วงแรกของการเจริญ และไคตินและไคโตซานบางส่วนอาจถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นปริมาณไคตินและไคโตซานจะลดลงในระยะเวลาต่อมา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-3 องค์ประกอบของเส้นใยราในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของ *Mucor rouxii* (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997)

องค์ประกอบ	ระยะเวลา (ชั่วโมง)			
	12	24	48	96
น้ำ	81.1	82.9	84.0	81.0
โปรตีน (%)	63.7	61.7	60.1	55.5
เส้นใยที่กำจัดโปรตีน (%)	11.8	13.8	16.4	17.1
ไคโตซาน	4.4	6.1	7.3	7.0

หมายเหตุ % น้ำหนักเส้นใยแห้ง

4.2.2 โครงสร้าง

องค์ประกอบของผนังเซลล์ยังมีการเปลี่ยนแปลงไปตามวงจรการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 2-4 เช่น ผนังเซลล์ของ Zygomycetes ซึ่งมีไคติน ไคโตซานและเบต้ากลูแคนเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างหลักและยังมีโปรตีนต่าง ๆ เช่น แมนโนโปรตีน (Mannoprotein) กาแลคโตโปรตีน (Galactoproteins) ไซโลแมนโนโปรตีน (Xylomannoproteins) และกลูคูโรโนโปรตีน (Glucuronoproteins) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ โปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้ถูกกำจัดได้โดยการใช้สารละลายด่าง ไคโตซานถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ โดยการสกัดด้วยกรด ซึ่งไคโตซานสามารถละลายในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6 ส่วนไคตินและเบต้ากลูแคนไม่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดที่ความเป็นกรด-ด่างในช่วงดังกล่าว (Rane & Hoover, 1993)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-4 ความแตกต่างขององค์ประกอบในผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* ในแต่ละช่วงการเจริญ (Deacon, 1997)

องค์ประกอบ	น้ำหนักแห้ง (%)			
	Yeast phase	Hyphae	Sporangiophores	Spores
อะซิติลกลูโคซามีน (ไคติน)	8	9	18	2
กลูโคซามีน (ไคโตซาน)	28	33	21	10
แมนโนส (แมนแนน)	9	2	1	5
กรดกลูโคโรนิค (กลูโคโรแนน)	12	12	25	2
กลูโคส (กลูแคน)	0	0	<1	43
น้ำตาลอื่น ๆ	4	5	3	5
โปรตีน	10	6	9	16
เมลานิน	0	0	0	10

จากตารางจะเห็นได้ว่า *Mucor rouxii* มีปริมาณไคตินและไคโตซานในส่วนของไมซีเลียมมากกว่าส่วนของสปอร์ ซึ่งปริมาณไคตินและไคโตซานพบได้แตกต่างกันไปในราแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าในราแต่ละสายพันธุ์นั้นมีการสะสมไคตินหรือไคโตซานสูงสุดในโครงสร้างที่แตกต่างกัน เช่น *Rhizopus oryzae* มีไคติน 72 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของไมซีเลียม ในขณะที่ *Phycomyces blakesleeanus* มีไคติน 91 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของสปอร์แรงจิโอสปอร์ เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 ปริมาณไคตินของราชนิดต่าง ๆ (Hamlyn & Schmidt, 1994)

รา	การเจริญ	ไคติน[a] %
Fusarium graminearum	Mycelium	19
Rhizomucor miehei	Mycelium	70
Rhizopus oryzae	Mycelium	72
Phycomyces blakesleeanus	Sporangiophores	91
Mucor mucedo	Mycelium	52

หมายเหตุ [a]น้ำหนักเส้นใยแห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2.3 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.3.1 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

จากรายงานของ Bartinicki and Nickersen (1962) พบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน *M. rouxii* จะใช้น้ำตาลไดแซคคาไรด์ เช่น ซูโครสและแลคโตส ในการเจริญได้ไม่ดี แต่จะสามารถใช้น้ำตาลเฮกโซสได้ดีอย่าง เช่น กลูโคส ได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสภาวะไร้ออกซิเจน *M. rouxii* สามารถใช้กลูโคสได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นสูงสุด 5 เปอร์เซ็นต์ โดยถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำเกินไปทำให้มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญ ส่วนน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปก็อาจจะมีผลต่อการถ่ายเทของอากาศทำให้เจริญได้ช้า รวมถึงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอากาศน้อยเชื้ออาจผลิตสารบางชนิด เช่น แอลกอฮอล์ ซึ่งมีผลต่อยับยั้งการเจริญทำให้มีปริมาณชีวมวลต่ำลงและส่งผลต่อการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานของราด้วย

4.2.3.2 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ราสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียได้ดีกว่ารูปไนเตรท จากรายงานของ Jenning (1995) กล่าวว่าราบางชนิดใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียหรืออินทรีย์ไนโตรเจน แต่จะไม่ใช้ในรูปไนเตรท เช่น *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus nigricans* และ *R. oryzae* เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วราสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรตเพราะเกลือไนเตรตจะมีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างในอาหารทำให้ค่า pH มีค่าสูงขึ้น

4.2.3.3 แร่ธาตุ

จากรายงานของ Jaworska and Konieczna (2001) กล่าวว่าเมื่อมีการเติมแมงกานีส (Mn^{2+}) และเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตไคตินและไคโตซานเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของชีวมวล โดยแมงกานีสและเฟอร์รัสมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase ให้ดียิ่งขึ้น แต่มีผลลดการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase ส่วนผลของทริปซินและไคตินต่อผลผลิตชีวมวลและปริมาณไคโตซานที่ผนังเซลล์มีค่อนข้างน้อย ในขณะที่โคบอลท์ (Co^{2+}) มีผลยับยั้งการเจริญของรา จากการศึกษานี้พบว่าปริมาณไคตินและไคโตซานที่ได้แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของแร่ธาตุที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ Michael (1984) พบว่าเมื่อเติม Mg^{2+} ซึ่งเป็นสารจำเป็นสำหรับการเจริญและเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ Chitin synthase ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไคติน ในการเติมแร่ธาตุที่มีความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไปทำให้มีผลยับยั้งการเจริญและอาจเป็นพิษต่อราได้ ดังนั้นการเลือกใช้สารใดเป็นองค์ประกอบ

ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญของรา ดังแสดงในตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 ผลของสารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone glucose ต่อปริมาณชีวมวล AIF และไคโตซานของ *Absidia orchidis* (Jaworska & Konieczna, 2001)

ความเข้มข้น (g/L)	ผลผลิต:		
	ชีวมวล (g/L)	AIF (g/L)	ไคโตซาน (g/L)
ชุดควบคุม	22.5	1.7	0.40
Mn^{2+}			
1.13	35.3	4.0	1.15
2.27	36.2	4.7	1.84
Fe^{2+}			
1.00	21.8	3.7	1.28
2.01	12.3	4.0	0.78
Co^{2+}			
2.30	<0.5	-	-
4.50	<0.5	-	-
ทริปซิน			
0.02	19.0	1.4	0.36
0.05	21.4	1.5	0.36
ไคติน			
5	31.9	4.8	0.60

หมายเหตุ สภาวะการเพาะเลี้ยงเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที บ่มที่ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องเลือกใช้วัตถุดิบที่หาง่ายและราคาถูกทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งสามารถเลือกใช้ธาตุอาหารราคาถูกสำหรับการเจริญและผลิตไคตินและไคโตซานสำหรับรา ดังแสดงในตารางที่ 2-7

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-7 วัตถุดิบที่ใช้เป็นธาตุอาหารสำหรับการเจริญและผลิตไคตินและไคโตซานของรา

ธาตุอาหาร	เอกสารอ้างอิง
กากน้ำตาล (Molasses salt medium, MSM)	Chatterjee et al., 2005
กากถั่วเหลืองและกากถั่วเขียว	Pochanavanich & Suntornsuk, 2002
น้ำตาล D-psicose	Yoshihara et al., 2002
ของเหลือทิ้งจากโรงกลั่นเหล้า (Barley-buckwheat-*shochu* medium (BBS) และ Sweet potato *shochu* medium (SPS))	Yokoi et al., 1998
ฟางข้าวสาลี	Crestini et al., 1996

4.3 ข้อได้เปรียบของการใช้ราเป็นแหล่งไคตินสำหรับการผลิตไคโตซาน

ราเป็นจุลินทรีย์ที่พบทั่วไปในธรรมชาติ หากมีการนำมาใช้เป็นแหล่งของไคตินสำหรับการผลิตไคโตซานในระดับอุตสาหกรรมในอนาคตก็น่าจะมีข้อได้เปรียบแหล่งวัตถุดิบเดิมที่ใช้กันอยู่หลายประการดังนี้

ก. รามีศักยภาพในการเพิ่มมวลชีวมวลได้สูง เนื่องจากมีอัตราการเจริญที่เร็ว

ข. สามารถผลิตได้ต่อเนื่องตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นกับฤดูกาลเหมือนกับอุตสาหกรรมสัตว์น้ำทะเล

ค. สามารถควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ ทำให้คุณภาพของไคโตซานมีความสม่ำเสมอ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการผลิตไคโตซานคือไม่สามารถควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบได้ ทำให้ไคโตซานที่ผลิตออกมามีคุณภาพแตกต่างกันไปได้

ง. ราไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งทำให้ลดต้นทุนในการผลิตที่สูงโดยขบวนการกำจัดแร่ธาตุด้วยกรด

จ. ขบวนการผลิตไคโตซานของพวกเปลือกกุ้ง และปู อาจมีส่วนเนื้อติดอยู่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ทำให้มีการป้องกันการเน่าเสียและส่งกลิ่นเหม็นโดยการนำไปตากแดดเป็นเวลา 1-2 วัน จึงเกิดความยุ่งยากและเสียเวลาในการเก็บรักษา

ฉ. อุตสาหกรรมการผลิตไคโตซานจากเปลือกกุ้งและปูจำเป็นต้องใช้สภาวะที่รุนแรงในการเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตซาน แต่ในกรณีของการสกัดไคโตซานจากราไม่จำเป็นต้องใช้แต่ในกรณีของการสกัดไคโตซานจากราไม่จำเป็นต้องใช้สภาวะที่รุนแรง เนื่องจากในเส้นใยหรือผนังเซลล์มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบอยู่แล้ว ทำให้ปริมาณของสารเคมีที่ใช้น้อยลงซึ่งน่าจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ช. ราบางชนิดมีไคโตซานเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ซึ่งเกิดจากการดึงหมู่อะซิติลจากไคตินที่สังเคราะห์ขึ้นในผนังเซลล์โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด ซึ่งการผลิตไคตินและไคโตซานจากราสามารถปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อควบคุมให้ราผลิตไคโตซานมีคุณภาพสม่ำเสมอและมีคุณสมบัติที่จำเพาะได้ดีกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี

ซ. ไคโตซานจากราสามารถควบคุมคุณภาพได้ เหมาะสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์

ฌ. หากมีการศึกษาสภาวะตลอดจนธาตุอาหารราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรา ก็คาดว่าต้นทุนในการผลิตไคโตซานในเชิงการค้าน่าจะลดลงได้

จากเหตุผลข้างต้นทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาไคตินและไคโตซานจากรากันมากขึ้น เป็นข้อได้เปรียบของการใช้ราสำหรับผลิตไคโตซานซึ่งสามารถสกัดไคโตซานจากเซลล์ราได้โดยตรง เช่น การศึกษาปริมาณไคโตซานจาก *Mucor rouxii* พบว่าไมซีเลียมของราชนิดนี้มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในปริมาณสูงร้อยละ 81.3 และไคโตซานที่ผนังเซลล์ยังสามารถสกัดออกได้ง่าย (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997)

5. กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

การผลิตไคตินและไคโตซานสามารถทำได้ทั้งทางเคมีและทางชีวภาพ แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจะใช้กระบวนการทางเคมีมากกว่า เนื่องจากงานทางเอนไซม์ยังมีน้อยและราคาค่อนข้างสูง โดยมีวิธีการดังนี้

5.1 วิธีทางเคมี

นำวัตถุดิบซึ่งได้แก่ เปลือกกุ้ง กระดองปู หรือเส้นใยรา ล้างให้สะอาด ทำให้แห้งแล้วบดให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

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

5.1.2 การกำจัดแร่ธาตุ (Deminaerization) โดยนำวัตถุดิบที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วมาเติมไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3-5 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือแร่ ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ หินปูน ($CaCO_3$) โดยราจะไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้การผลิตไคตินของราในขั้นตอนนี้ช่วยลดต้นทุนที่สูงในขบวนการกำจัดแร่ธาตุด้วยกรด เมื่อผ่านขั้นตอนนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือไคติน

5.1.3 การกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล (Deacetyltion) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยนำไคตินที่ได้มาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40-50 เปอร์เซ็นต์ ที่

อุณหภูมิสูง 90-130 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล เมื่อผ่านขั้นตอนนี้จะได้ไคโตซาน แต่หากต้องการผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะต้องทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติลซ้ำอีกครั้ง โดยก่อนที่จะทำปฏิกิริยาซ้ำต้องทำการล้างไคโตซานที่ได้ก่อนเนื่องจากการล้างก่อนที่จะเติมสารละลายด่างใหม่ลงไปทำให้การซึมผ่านของสารละลายเข้าไปในไคโตซานเกิดได้ดีขึ้น

นอกจากวิธีการกำจัดหมู่อะซิติลดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีวิธีการในสภาวะต่าง ๆ ซึ่งแต่ละวิธีจะให้ไคโตซานที่มีสมบัติต่าง ๆ กันไป เช่น Horton and Lineback (1965) ได้ไฮโดรไลส์ไคตินด้วยสารละลายด่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน พบว่าสามารถกำจัดหมู่อะซิติลได้ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่สายพอลิเมอร์ที่ได้ถูกตัดสั้นมากจึงไม่เหมาะกับการใช้งานบางประเภท เช่น การใช้เป็นตัวตกตะกอน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wolform et al. (1958) ที่ใช้สภาวะในการไฮโดรไลส์ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนได้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ และเยาวภา ไหวพริบ (2534) ได้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับ 90-92 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากวิธีทางเคมีในการผลิตไคตินและไคโตซานมีข้อจำกัด คือ ถ้าใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้นสูงหรืออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงเกินไปจะทำให้ไคโตซานที่ได้สูญเสียสภาพธรรมชาติและมีมวลโมเลกุลของไคโตซานลดลง (Bough et al., 1978) และหากใช้สารละลายด่างที่เจือจางไปหรืออุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ได้ไคตินและไคโตซานที่มีคุณภาพต่ำคือมีโปรตีนและเกลือแร่ปนเปื้อน ไคโตซานที่ผลิตได้จากวิธีทางเคมีพบว่ามีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลที่ไม่แน่นอน ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการผลิต นอกจากนี้วิธีทางเคมียังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากใช้ด่างความเข้มข้นสูงและเหลือปริมาณด่างทิ้งจากกระบวนการผลิตมากและเป็นอันตรายเนื่องจากสภาวะการผลิตค่อนข้างรุนแรง

5.2 วิธีทางชีวภาพ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

5.2.1 การกำจัดโปรตีนและเกลือแร่ โดยนำวัตถุดิบที่ผ่านการทำความสะอาดทำให้แห้งและบดแล้ว มาหมักกับแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอส (Protease) เพื่อย่อยโปรตีนที่ติดอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ออก ในขั้นตอนนี้สามารถแยกโปรตีนออกจากไคตินเพื่อนำไปใช้เป็นโปรตีนเสริมในอาหารสัตว์และสามารถสกัดรงควัตถุสีส้มที่มีอยู่จำพวกแอสทาแซนติน (Astaxanthin) และสุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์คือไคติน

5.2.2 การกำจัดหรือลดหมู่อะซิติล โดยใช้เอนไซม์ Chitin deacetylase ไฮโดรไลส์ไคตินที่ได้จากขั้นตอนแรก (Hirano, 1996)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จะเห็นได้ว่าการผลิตไคตินและไคโตซานโดยวิธีทางชีวภาพมีข้อดีกว่าวิธีทางเคมีคือ ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน ไม่ก่อปัญหาด่างเหลือทิ้งที่เป็นอันตรายและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังได้ผลผลิตพลอยได้ (By product) จากกระบวนการคือ สารรงควัตถุสีส้มและโปรตีน ซึ่งจะสูญเสียไปเมื่อใช้วิธีทางเคมี อีกทั้งยังควบคุมกระบวนการผลิตได้ดีกว่าและได้ไคตินและไคโตซานที่มีคุณภาพดีขึ้นและมีความสม่ำเสมอมากขึ้น

ในกระบวนการผลิตไคตินและไคโตซานทางชีวภาพนอกจากใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์แล้ว ยังมีการศึกษาการผลิตไคตินและไคโตซานจากจุลินทรีย์โดยตรง โดยปกติมักเป็นราที่ใช้ในการผลิตสารสำคัญทางอุตสาหกรรมซึ่งเมื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้วจะแยกเซลล์ราทิ้งไป เช่น การผลิตไคตินและไคโตซานจากรา *Aspergillus niger* (Suwannachart & Pichyangkura, 1996) โดยเลี้ยงราสำหรับการผลิตกรดซิตริกและสกัดไคตินและไคโตซานออกจากผนังเซลล์แล้วนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่สกัดได้ พบว่าไคตินจากรามีคุณสมบัติคล้ายกับไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง การผลิตไคตินและไคโตซานจากเส้นใยราที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งในขบวนการหมักเชิงการค้าจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2-8

ตารางที่ 2-8 แหล่งของไคตินและไคโตซานจากราที่ได้จากอุตสาหกรรมการหมักสารชนิดต่าง ๆ (Hu et al., 2004)

รา	การผลิตในอุตสาหกรรม
Aspergillus niger	กรดซิตริก กรดกลูโคนิก และเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ เบต้ากลูคาเนส เซลลูเลสและกลูโคสออกซิเดส
Ashbya gossypii	วิตามินบี 2 (riboflavin)
Penicillium chrysogenum	ยาปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (penicillin)
Aspergillus sp.	เอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ ไลเปส เพนโตซาเนสและโปรติเอส
Mucor sp.	น้ำย่อยเรนนิน(rennin) ทำให้นมรวมตัวกัน

นอกจากนี้ Arcidiacono and Kaplan (1992) ซึ่งศึกษาการผลิตไคโตซานจากรา *Mucor rouxii* พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งวิธีการสกัดไคโตซานออกจากผนังเซลล์ของรามีผลต่อคุณภาพของไคโตซานที่ผลิตได้ คุณภาพของไคตินมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลต่อคุณภาพของไคโตซานที่ผลิตได้ เนื่องจากไคตินเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไคโตซาน Bough et al. (1978) รายงานว่าคุณสมบัติของไคตินที่มีผลต่อการกำจัดหมู่อะซิติลที่สำคัญ ได้แก่ ขนาดของไคติน (Particle size) และความหนาแน่นของไคติน โดยมีผลต่ออัตราการซึมผ่าน (Permeability) ของด่างในขั้นตอนการกำจัดหมู่อะซิติลเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปคุณสมบัติของไคตินและไคโตซานที่ได้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุดิบเริ่มต้น วิธีการผลิต ชนิดของสารเคมี ความเข้มข้นและอัตราส่วนในการใช้ ตัวอย่างของกรรมวิธีการผลิตและคุณสมบัติไคตินและไคโตซาน ดังแสดงในตารางที่ 2-9

ตารางที่ 2-9 การผลิตและคุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน

วิธีการผลิต/สภาวะและเทคนิค	คุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน	เอกสารอ้างอิง
นำเปลือกกุ้งมาทำปฏิกิริยากับ NaOH (1-4%) และ 4% HCl ที่สภาวะต่าง ๆ	<u>ไคติน</u> ผลผลิต = 15-20% (dry weight) ความชื้น = 7.3-8.1% เถ้า = 0.2-0.7% โปรตีน = 0.8-9.6% %DD = 8.4-14.3%	Lertsutthiwong et al. (2002)
นำไคตินที่สกัดจากเปลือกกุ้งที่สภาวะต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยา deacetylation ด้วย 50% NaOH (w/v) นาน 3 วัน	<u>ไคโตซาน</u> ความชื้น = 6.7-8.4% เถ้า = 0.5-0.8% ความหนืด = 106-830 cP. %DD = 73-76%	
นำแกนหมึกมาทำปฏิกิริยากับ 1 M NaOH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	<u>ไคติน</u> ความชื้น = 8.5% เถ้า = 0.5% โปรตีน $\leq$ 2% %DD = 10%	Domard & Chaussaard (2002)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-9 (ต่อ)

วิธีการผลิต/สภาวะและเทคนิค	คุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน	เอกสารอ้างอิง
นำแกนหมึกมาทำปฏิกิริยากับ 1 M NaOH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	การเกิดผลึก (Crystallinity) = 62% น้ำหนักโมเลกุล = 1.35×10^6 g/mol	Domard & Chaussaard (2002)
เติมเอนไซม์ Protease ลงในเปลือกกุ้ง ที่อุณหภูมิ 50°C pH 6-7 และทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะผ่านกระบวนการทางเคมีเพื่อผลิตเป็นไคติน	<u>ไคติน</u> ผลผลิต = 1.35-1.96% (dry weight) ความชื้น = 7.0% โปรตีน = 0.27-0.93% ไนโตรเจน = 6.1%	Bhuwapathpun (1996)
ไคตินที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ Protease ร่วมกับกระบวนการทางเคมีทำปฏิกิริยากับ 50% NaOH ที่อุณหภูมิ 140-145°C 10 นาที	<u>ไคโตซาน</u> ผลผลิต = 1.12-1.63% (dry weight) ความชื้น = 6.8% โปรตีน = 0.25-0.33% ไนโตรเจน = 7.6%	
นำเปลือกกุ้งสด 100 กิโลกรัม (1) กระบวนการแยกโปรตีน โดยแช่เปลือกกุ้งใน 4% NaOH ปริมาตร 270 ลิตร ที่อุณหภูมิ ห้อง นาน 24 ชั่วโมง (2) กระบวนแยกแร่ธาตุด้วย 4% HCl ปริมาตร 270 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 18 ชั่วโมง (3) นำไคตินแห้งที่ได้จากกระบวนการที่ 2 มา 3 กิโลกรัม แช่ 50% NaOH ปริมาตร 30 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง หลังจากล้างน้ำจนมี pH เป็นกลาง นำไคโตซานที่ได้มาแช่ใน 50% NaOH อีกครั้ง ปริมาตร 12 ลิตร ที่ 60°C นาน 48 ชั่วโมง	เปลือกกุ้งสด 100 กิโลกรัม ได้ ไคตินแห้ง ≈ 6 กิโลกรัม ไคโตซานแห้ง ≈ 4 กิโลกรัม <u>สมบัติของไคโตซาน</u> ความชื้น = 8-10% เถ้า = 1% โปรตีน < 1% %DD ≥ 10% ความหนืด = 500 cP. น้ำหนักโมเลกุล = $1\text{-}1.5 \times 10^6$ ดาลตัน	Aye et al. (2002)

ตารางที่ 2-9 (ต่อ)

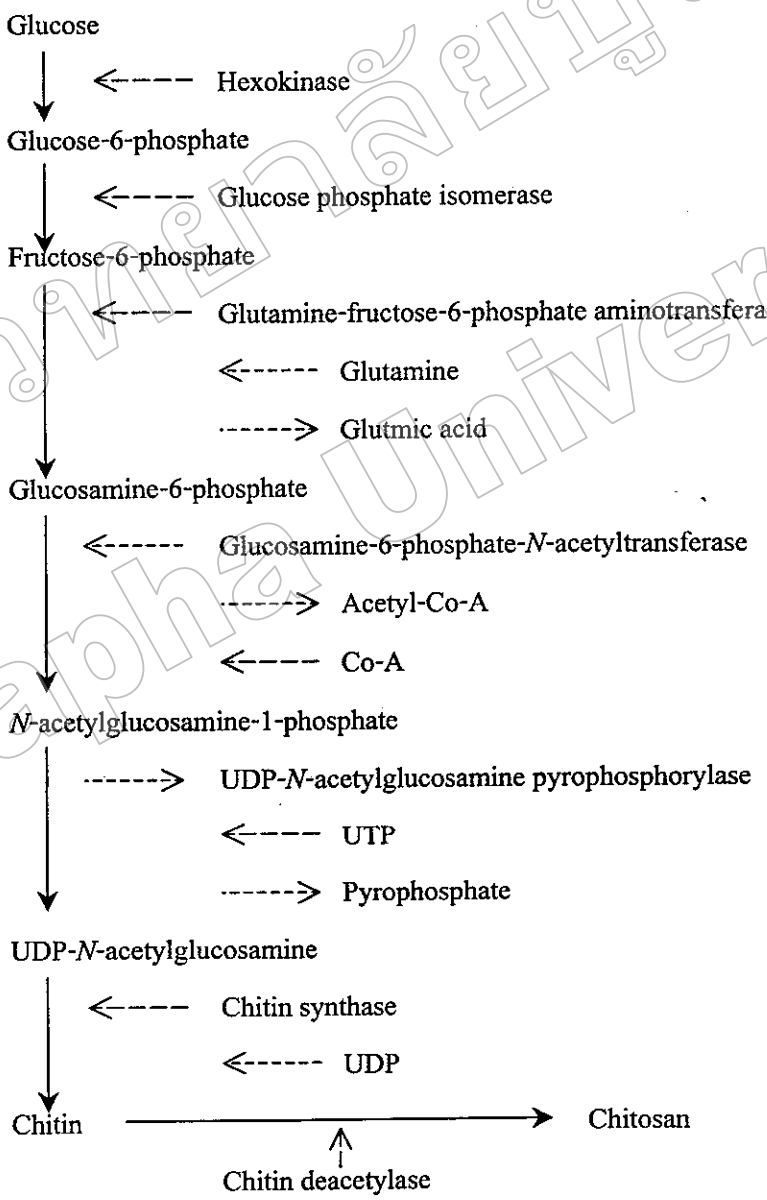
วิธีการผลิต/สภาวะและเทคนิค	คุณสมบัติของไคตินและไคโตซาน	เอกสารอ้างอิง
สกัดไคโตซานจากเส้นใยรา *Aspergillus niger* ใช้ NaOH 40% อุณหภูมิ 95±2°C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และใช้ HCl 2% เป็น ตัวสกัดไคโตซาน	<u>ไคโตซาน</u> %DD = 98-99% ความหนืด = 0.88-1.04 cP. น้ำหนักโมเลกุล = 4-5x10^{4}ดาลตัน	อัษฎาวุธ และคณะ (2538)
นำเส้นใย *Aspergillus niger* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ไปอบแห้งที่ 60°C บดให้มีขนาด 25-35 mesh เติม 2M HCl นาน 2 ชั่วโมง และกำจัดโปรตีนด้วย 2M NaOH นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีด้วยเอทานอล 95%	<u>ไคติน</u> ผลผลิต = 75.34% (dry weight)	Suwannachart & Pichyangkura (1996)
รา 33 สายพันธุ์ที่ผลิตไคโตซาน ได้แก่ 1 Basidioomycetes, 9 Zygomycetes, 5 Ascomycetes และ 18 Deuteromycetes นำไปอบได้เส้นใยแห้ง เติม 1N NaOH (1:40 w/v) ที่ 121°C นาน 15 นาที ได้ AIF แล้วเติม 1N HCl (1:40 w/v) ที่ 95°C นาน 3 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 12	<u>ไคโตซาน</u> ผลผลิต = 0.3-7.4% (dry weight) = 1.2-22.9% (AIF) AIF = 10.6-39.6% %DD = 76.6%	Hu et al. (2004)
รา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger, Rhisopus oryzae, Lentinus edodes, Pleurotus sago-caju* และยีสต์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR5058 และ *Candida albicans* TISTR5239 นำไปอบได้เส้นใยแห้งแล้วเติม 1M NaOH (1:30 w/v) ที่ 121°C นาน 15 นาที ได้ AIF แล้วเติม 2% acetic acid (1:40 w/v) ที่ 95°C นาน 8 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 10 โดยเติม 2M NaOH	<u>ไคโตซาน</u> ผลผลิต = 1-14% (dry weight) %DD = 84-90% ความหนืด = 3.1-6.2 cP. น้ำหนักโมเลกุล = 2.7x10^4-1.9x10^5 ดาลตัน	Pochanavanich & Suntornsuk (2002)

<u>หมายเหตุ</u> เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักเส้นใยแห้ง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานโดยรา

การเริ่มต้นกระบวนการสร้างไคตินและไคโตซาน โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นผ่านเอนไซม์ต่าง ๆ จนได้ Fructose-6-phosphate ในกระบวนการ Glycolysis และได้ UDP-*N*-acetyl glucosamine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ Chitin synthase จนในที่สุดได้ไคตินที่เพิ่งถูกสร้างขึ้นมาใหม่หรือเรียกว่า เนสเซนท์ ไคติน (Nascent chitin) และเป็นสับเสตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์ Chitin deacetylase ต่อไป ดังแสดงกระบวนการต่าง ๆ ดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน (ดัดแปลงมาจาก Muzzarelli, 1977)

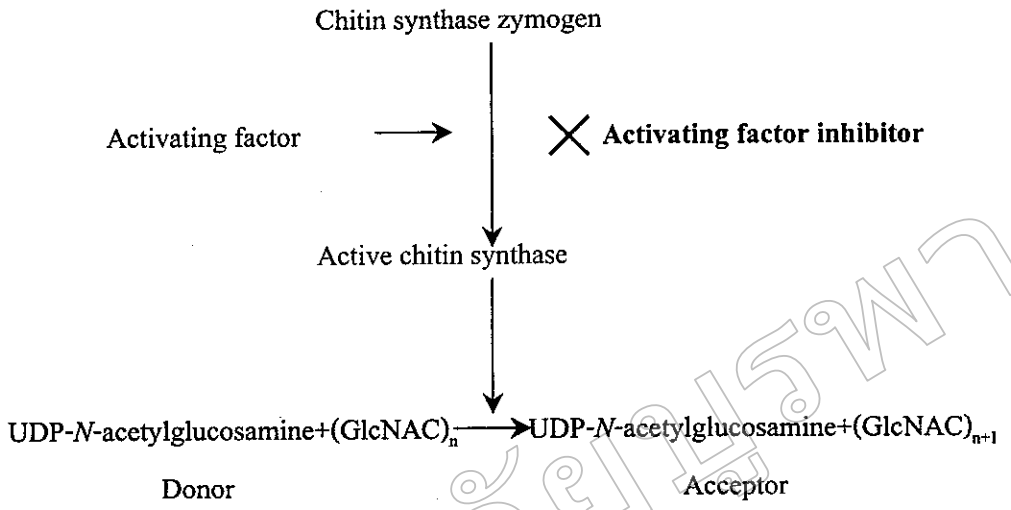
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอนไซม์ Chitin synthase

การสังเคราะห์ไคตินเกี่ยวกับการเจริญของเส้นใยรา สารประกอบและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างผนังเซลล์บรรจุอยู่ภายในออร์แกเนลที่เรียกว่าเวสิเคิล (Vesicles) ซึ่งอยู่ภายในไซโตพลาสซึม เวสิเคิลเป็นออร์แกเนลที่มีเมมเบรนหุ้ม จากการศึกษาคาดว่าถูกสร้างมาจากกอลจิบอดี (Golgi body) หรือจากบริเวณเฉพาะของเอนโดพลาสมมิก เรคติคิวรัม (Endoplasmic recticulum) เวสิเคิลที่อยู่ในไซโตพลาสซึมมี 2 ประเภทคือ เวสิเคิลขนาดใหญ่ (Macrovesicles) และเวสิเคิลขนาดเล็ก (Microvesicles) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าไคโตโซม (Chitosomes) โมเลกุลของ Macrovesicles บรรจุพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น โปรตีน ลิปิดและสเตอรอล เป็นต้น ที่จะนำเข้ามาเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ ส่วนภายในโมเลกุลของไคโตโซมบรรจุเอนไซม์ Chitin synthase สับเสตรทสำหรับเอนไซม์ชนิดนี้คือ UDP-*N*-acetylglucosamine ดังสมการที่ 2-1 ซึ่งพบกระจายอยู่ในไซโตซอล

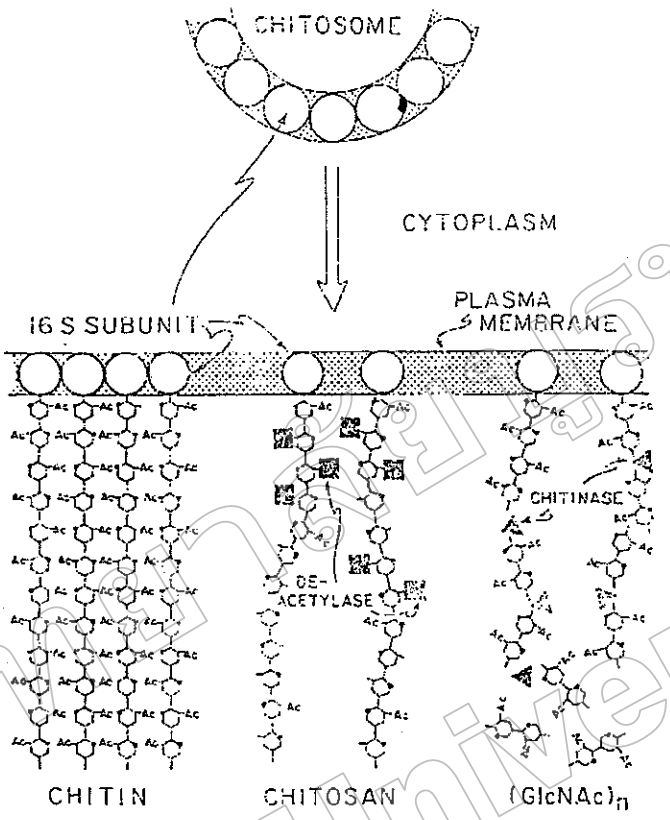
$$2\text{UDP-(GlcNAc)} + (\text{GlcNAc})_n \longrightarrow (\text{GlcNAc})_{n+2} + 2\text{UDP} \qquad (2\text{-}1)$$

ไคตินในราเกิดจากเอนไซม์ Chitin synthase ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สายไคติน โดยเอนไซม์ chitin synthase ที่อยู่ในไคโตโซมจะเป็นรูปที่ไม่อยู่ในสภาพที่ยังไม่พร้อมที่ทำงาน (Inactive) หรือเรียกว่าซัยโมเจน (Zymogen) แต่เมื่อมีการสร้างผนังเซลล์ทั้ง Macrovesicles และไคโตโซมจะถูกส่งมาสะสมอยู่บริเวณส่วนปลายของเส้นใย (Hyphal apex) มีการหลอมเมมเบรนของเวสิเคิลเข้ากับเซลล์เมมเบรนและปล่อยองค์ประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ในเวสิเคิลออกสู่ส่วนของเพอริพลาสซึม (Periplasm) ในบริเวณนี้จะมีเอนไซม์โปรติเอส (Protease) ทำหน้าที่กระตุ้นให้ Zymogen อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงาน ซึ่งทำให้มีการสังเคราะห์ไคตินเกิดขึ้นในบริเวณดังกล่าว โดยเริ่มจากการกระตุ้นปฏิกิริยา Transglycosylation ของเอนไซม์ Glycosyltransferase โมเลกุลของ UDP-*N*-acetylglucosamine ทำหน้าที่เป็นตัวให้เรสิดิวซ์ *N*-acetylglucosamine ซึ่งจะถูกนำมาต่อกันเป็นสายพอลิแซคคาไรด์ แต่ละเรสิดิวซ์ยึดกันด้วย β-1,4 linkage เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์จะได้เส้นใยของราที่มีความยาวเพิ่มขึ้น (Bartnicki-Garcia, 1989) ดังแสดงในภาพที่ 2-5 และราต้องการอิออน (2+) (Divalent cation) เช่น แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) และโคบอลต์ (Co^{2+}) เป็นต้น โดยแร่ธาตุเหล่านี้มีบทบาทสำคัญกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ไคติน และมีความเป็นไปได้ที่ยาปฏิชีวนะพอลิออกซิน (Polyoxin) และนิคโคมัยซิน (Nikkomycins) ที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่ในดินสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ Chitin synthase ของราได้ (Ruiz-Herrera, 1992)



ภาพที่ 2-5 ปฏิกิริยา Transglycosylation ในการสังเคราะห์ไคติน (Muzzarelli, 1977; Ruiz-Herrera, 1992)

นอกจากไคตินแล้วยังพบไคโตซานอยู่ในโครงสร้างผนังเซลล์ของราอีกด้วย โดยเฉพาะราในกลุ่ม Mucorales การสังเคราะห์ไคโตซานเกิดขึ้นหลังจากมีการสังเคราะห์ไคตินแล้ว โดยไคตินที่เพิ่งถูกสร้างขึ้นจะถูกดึงหมู่อะซิติลออก (Deacetylation) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin deacetylase โดยปกติไคตินเป็นสายผลึกขนาดใหญ่ซึ่งเกิดจากสายโซ่ไคตินรวมกันอย่างหนาแน่นตลอดจนการยึดกันของพันธะไฮโดรเจน ทำให้เอนไซม์ Chitin deacetylase ไม่สามารถแทรกเข้าไปในโครงสร้างผลึกของไคตินได้ การดึงหมู่อะซิติลออกจากโมเลกุลไคตินเกิดขึ้นในระหว่างการเกิดสายโซ่ไคตินก่อนที่จะเป็นผลึกในรูปเส้นใยและสายโซ่ไคตินอิสระจะมีความไวต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ Chitinase เช่นกัน ซึ่งจะเปลี่ยนกลับไปเป็น *N*-acetylglucosamine ต่อไปอีกดังแสดงในภาพที่ 2-6 (Bartnicki-Garcia, 1989; Ruiz-Herrera, 1992)



ภาพที่ 2-6 การควบคุมการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานที่ผิวเซลล์ของ *Mucor rouxii* (Bartnicki-Garcia, 1989)

เอนไซม์ Chitin deacetylase

เอนไซม์ Chitin deacetylase (EC 3.5.1.42) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลส์หมู่อะซิติลออกจากคาร์บอนตำแหน่งที่สองของ *N*-acetylglucosamine ในสายพอลิเมอร์ของไคติน ทำให้เกิดไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์ดีอะซิทิเลชั่นต่าง ๆ กัน และได้กรดอะซิติกอิสระ ดังสมการที่ 2-2

$$\underset{\text{ไคติน}}{\text{(1,4)-linked (GlcNAc)}} \longrightarrow \underset{\text{ไคโตซาน}}{\text{(1,4)-linked (GlcN}_m\text{, GlcNAc}_{n-m}\text{)}} + \underset{\text{กรดอะซิติก}}{m\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}} \qquad (2\text{-}2)$$

สับเสตรทในธรรมชาติของเอนไซม์ Chitin deacetylase ได้แก่ ไคตินที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (Nascent chitin) โดยเอนไซม์ Chitin synthase นอกจากนี้ยังได้แก่โอลิโกเมอร์และโมโนเมอร์ของ

ไคติน ไกลคอลไคติน (Glycol chitin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคตินที่สามารถละลายน้ำได้ เป็นต้น พบจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Chitin deacetylase ซึ่งแหล่งและบทบาทที่มีในจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ซึ่งมีรายงานดังนี้

Araki and Ito (1975) ศึกษาเอนไซม์ Chitin deacetylase ใน *Mucor rouxii* AHU6019 โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเส้นใย ในอาหารที่ประกอบด้วย 2 เปอร์เซ็นต์กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์พอลิเปปโตนและ 0.3 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าราสร้างเอนไซม์ Chitin deacetylase ได้ภายในเซลล์เอนไซม์นี้สามารถย่อยไกลคอลไคตินและโอลิโกเมอร์ของไคติน และ Davis and Bartinicki-Garcia (1984) ศึกษาการสร้างไคโตซานซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* IM-80 (ATCC 24905) โดยเลี้ยงในอาหารและสภาวะเดียวกับ Araki and Ito (1975) พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไคโตซาน 2 ชนิดคือ Chitin synthase และ Chitin deacetylase ซึ่งแยกได้จากส่วนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และจากส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ 2 ชนิด นี้จะทำงานต่อเนื่องกันนั่นคือเอนไซม์ Chitin synthase สร้างไคตินขึ้นมาใหม่ ๆ โดยใช้สารตั้งต้น ได้แก่ UDP-*N*-acetylglucosamine จากนั้นเอนไซม์ Chitin deacetylase จะเข้าไปไฮโดรไลส์หมู่อะซิติลออกจากไคตินที่สร้างใหม่นั้นและได้ไคโตซานในที่สุด ซึ่งไคโตซานเป็นสมบัติเด่นของผนังเซลล์ราในกลุ่ม Zygomycetes ดังนั้นเอนไซม์ Chitin deacetylase ในรากลุ่มนี้จึงมีบทบาทในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (Cell biosynthesis) นั่นเอง

Alfonso et al. (1995) ศึกษาเอนไซม์ Chitin deacetylase จากรา *Aspergillus nidulans* ซึ่งเป็นราที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ โดยเลี้ยงราในอาหารที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์และเติมแร่ธาตุบางชนิด คือ K_2HPO_4, $MgSO_4$ และ KCl เลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส คณะผู้วิจัยตรวจพบ Chitin deacetylase ระหว่างการย่อยสลายเองตามธรรมชาติ (Natural autolysis) ของเชื้อ โดยเอนไซม์จะถูกขับออกนอกเซลล์มีส่วนร่วมในการย่อยสลายผนังเซลล์ที่เป็นไคติน จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ Chitin deacetylase นอกจากมีบทบาทในการสังเคราะห์ผนังเซลล์เพื่อการเจริญแล้วยังมีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ด้วย

นอกจากราชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว มีผู้รายงานในราชนิดอื่น ๆ อีกมาก ตัวอย่างเช่น *Absidia coerulea* (Gao et al., 1995) และ *Rhizopus oligosporus* NS1 (นันทนา นิ่มเจริญนิยม, 2542) ที่พบราสามารถสร้างเอนไซม์ Chitin deacetylase ได้ เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าการสร้างผนังเซลล์ของราที่มีไคโตซานต้องมีการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Chitin synthase และ Chitin deacetylase ซึ่งทำงานด้วยกันตามลำดับ โดยไคตินถูกสร้างขึ้นก่อน จากนั้นจึงถูก Chitin deacetylase ไฮโดรไลส์เอาหมู่อะซิติลออกจนได้ไคโตซาน

การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซาน

เนื่องจากไคโตซานมีสมบัติในการละลายได้ดีกว่าไคตินคือสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิดแล้วเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้ โดยที่สารละลายไคโตซานมีความหนืด (Viscous) มีความใส (Clear solution) และมีลักษณะของพลาสติกใสที่ยืดหยุ่นได้จึงสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบเช่น เจล (Gel) เม็ด (Tablet) เยื่อแผ่นบาง (Membrane) เส้นใย (Fibrill) คอลลอยด์ (Colloid) และสารเคลือบ (Coating) เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำไคโตซานไปเตรียมเป็นอนุพันธ์ได้อีกมากมาย เนื่องจากไคโตซานประกอบด้วยหมู่อะมิโนอิสระ ($-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งสามารถ ทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อที่เปลี่ยนให้เป็นสารอนุพันธ์ของไคโตซานได้แก่ *N*-acyl chitosan, NIO-carboxylacyl chitosan, *N*-carboxybutyl chitosan และ Chitosan xanthate เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว ไคโตซานยังไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต (Non-toxic material) เป็นสารที่มีส่วนร่วมได้ในกิจกรรมทาง ชีวภาพ (Bioactivity) และสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Biodegradable) จึงทำให้นำมาใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมได้อย่างปลอดภัย

ไคโตซานได้รับการพัฒนาจนสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ด้านต่าง ๆ ซึ่งสรุปได้ดังนี้ ประโยชน์ของไคโตซาน (Muzzarelli, 1977; ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟู และก้องเกียรติ คงสุวรรณ, 2543)

1. ด้านการแพทย์และยา

พบว่าไคโตซานเป็นตัวเร่งกระบวนการรักษาแผลไม่ให้ติดเชื้อและยังสามารถดูดซับน้ำเหลืองจากแผลได้ดี จึงนำไคโตซานมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาแผล เช่น ผ้าปิดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด รักษาบาดแผลซึ่งอยู่ในรูปผงโรยบริเวณบาดแผล ทำให้แผลสมานได้เร็วขึ้น และใช้ผลิตไหมละลายใช้ในการเย็บบาดแผลผ่าตัด ซึ่งช่วยให้แผลแห้งเร็วและสลายตัวเมื่อแผลติดกันและไม่เกิดการแพ้ อีกทั้งนำไคโตซานผลิตเปลือกแคปซูลยาเนื่องจากไคโตซานมีสมบัติในการเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อย (Controlled-release systems) มีประสิทธิภาพในการแตกตัวได้ดี นอกจากนี้ไคโตซานสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลและกรดไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้

2. ด้านเครื่องสำอาง

ปัจจุบันมีการนำไคโตซานไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลายโดยนำไปใช้เป็นส่วนผสมใน แชมพูสระผม ครีมนวดผมและครีมปรับสภาพผม เพื่อเพิ่มความหนืดให้ผลิตภัณฑ์และยังทำให้เส้นผมเป็นเงางาม ชุ่มชื่นไม่ขาดง่าย ผสมในสบู่ ครีม และโลชั่นทางผิว เพื่อเป็นตัวให้ความชุ่มชื่นและเก็บความชื้นได้ดี ทำให้ผิวไม่แห้งและเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางที่ใช้แต่งหน้า ทำให้ติดผิวหน้าได้นาน และเพิ่มความเรียบเนียน นอกจากนั้นยังเป็นส่วนผสมในยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปากเพื่อขจัดกลิ่นปากและยังป้องกันการก่อตัวของหินปูนและฟันผุ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. ด้านอาหาร

ไคโตซานเป็นสารที่ไม่ให้พลังงาน และไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งสามารถจับกับกรดไขมันได้ จึงมีการนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนักและอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้ไคโตซานถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่ม โดยใช้ในรูปของสารกันเสีย (Preservative) เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ใช้ผสมในเครื่องดื่มเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกันไม่ตกตะกอน เป็นตัวช่วยให้อาหารมีสีคงตัว (Color stabillization) และใช้แยกสารที่ไม่ต้องการบางชนิดออกจากผลิตภัณฑ์ เช่น การแยกสีและของแข็งบางชนิดออกจากน้ำผักและผลไม้ ใช้ทำบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร

4. ด้านการบำบัดน้ำ

ไคโตซานมีสมบัติเป็น Chelating polymers สามารถเป็นคีเลต (Chelate) โลหะหนัก เช่น ทองแดง (Copper) ตะกั่ว (Lead) ปรอท (Mercury) และยูเรเนียม (Uranium) ในน้ำที่มีการปนเปื้อน นอกจากนี้ไคโตซานยังเป็นตัวจับและตกตะกอน (Coagulating and flocculant agent) เนื่องจากมีหมู่อะมิโนซึ่งสามารถจับกับสารประจุลบต่าง ๆ เช่น โปรตีน ของแข็งและสี ปัจจุบันได้มีการนำไคโตซานมาผลิตเป็นเยื่อกรอง (Chitosan membrane) เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำ เช่น ในอุตสาหกรรมน้ำดื่ม การบำบัดน้ำในสระว่ายน้ำ ในโรงงานอุตสาหกรรมและใช้บำบัดกากของเสียประเภทอาหาร โดยไคโตซานจะจับกับอนุภาคที่เป็นคอลลอยด์ ซึ่งแพร่กระจายอยู่ในน้ำเสียโดยจะดึงโปรตีนกลับคืนมาเพื่อใช้ผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งจะใช้วิธีการฉีดสารละลายไคโตซาน 0.25-1.0 เปอร์เซ็นต์ลงในน้ำเสีย

5. ด้านเกษตรกรรม

การใช้ไคโตซานเป็นสารเคลือบเมล็ดพืชช่วยลดปริมาณราก่อโรค รวมทั้งเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่พืช ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ช่วยเร่งการงอก (Germination) ให้เร็วขึ้น และรากของพืชตระกูลถั่ว เพื่อเพิ่มจำนวนฝักและผลผลิต โดยสารละลายไคโตซานจะลดจำนวนบริเวณที่ถูกทำลายโดย Alfalfa mosaic virus ใช้เคลือบผักและผลไม้เพื่อยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวให้นานขึ้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในปุ๋ย ช่วยเร่งการเจริญของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Madhavan et al., 1986)

6. ด้านอุตสาหกรรม

ไคโตซานที่ขึ้นรูปเป็นเม็ดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในขบวนการหมักได้ เช่น เป็นตัวห่อหุ้มและยึดเกาะ (Immobilize) สำหรับเอนไซม์และโปรตีน และยังสามารถใช้เป็นตัวกลางในการจับโลหะโดยปฏิกิริยาการเกิดคีเลต (Chelating agents reaction)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

ใช้เป็นตัวตรึงเอนไซม์และเซลล์สิ่งมีชีวิต ใช้ทำแผ่นกรอง (Membrane) ทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Chromatographic columns) มีชื่อว่า Chito Pearl ใช้เป็นตัวแยกโปรตีน (Protein separation) เป็นต้น

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พิมพ์ทิพย์ โภชนะวนิชย์ (2542) ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์บนกากถั่วเหลืองและกากถั่วเขียว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร พบว่ารา 4 สายพันธุ์คือ *Aspergillus niger* TISTR3245, *Rhizopus oryzae* TISTR3189, *Lentinus edodes* NO.1 และ *Pleurotus sajo-caju* NO.2 สามารถเจริญได้ดี ปริมาณไคโตซานที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งอยู่ในช่วง 0.6-3.7 กรัมต่อกิโลกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาณไคโตซานจะอยู่ในช่วง 8.5-10.8 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โดย *Rhizopus oryzae* TISTR3189 มีปริมาณไคโตซานสูงสุดทั้งการเลี้ยงในอาหารเหลวบนกากถั่วเหลืองและกากถั่วเขียว และศึกษาคุณสมบัติของไคโตซานพบว่าไคโตซานจากรามีเปอร์เซ็นต์ดีอะซิทิเลชัน (%DD) ประมาณ 84-90 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $2.7x10^4$ ถึง $1.9x10^5$ ดาลตัน และมีความหนืดประมาณ 3.1-6.2 เซนติพอยส์ (cP)

อัษฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ, วิโรจน์ บุญอำนวยวิทยา และสุวลี จันทร์กระจ่าง (2538) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไคโตซานจากเส้นใย *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตกรดซิตริก และศึกษาคุณสมบัติของไคโตซานที่สกัดได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 อุณหภูมิ 95±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัด 24 ชั่วโมง โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นตัวทำละลายในการสกัดไคโตซาน ทำให้ไคโตซานที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 ถึง 50,000 ดาลตัน ความหนืดประมาณ 0.88-1.04 เซนติพอยส์ (cP) และเปอร์เซ็นต์ดีอะซิทิเลชัน (%DD) มีค่าประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์

Chatterjee et al. (2005) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของรา *Mucor rouxii* ที่ผลิตไคโตซานเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ Molasses salt medium (MSM), Potato dextrose broth (PDB) และ Yeast extract peptone (YPG) พบว่าปริมาณผลผลิตไคโตซานของราในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีค่า 0.61 กรัมต่อลิตร (MSM), 0.51 กรัมต่อลิตร (PDB) และ 0.56 กรัมต่อลิตร (YPG) ตามลำดับ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เช่น เถ้า ความชื้น ปริมาณโปรตีนและ Specific rotation ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไคโตซานที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM มีค่าอนุภาพการกระจาย (Polydispersion) และ

การเกิดผลึก (Crystallinity) น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YPG และ PDB

Crestini et al. (1996) ทดลองเลี้ยง *Lentinus edodes* ในอาหารเหลว Synthetic medium (Submerged fermentation) และบนอาหารแข็ง (Solid-state fermentation) ในการเลี้ยงบนอาหารแข็งมีการใช้ฟางข้าวสาลีเป็นสับเสตรท ในการศึกษาปริมาณไคโตซานจากราที่เพาะเลี้ยงราบนฟางข้าวสาลีทำโดยการปั่นให้เส้นใยแตก และแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสกัดกากที่ได้ด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 14 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองเป็นการเปรียบเทียบปริมาณไคโตซาน โดยพบว่าราชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีบนฟางข้าวสาลีและสามารถผลิตเส้นใยได้ถึง 6.18 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ได้เส้นใย 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าถึง 50 เท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน

Davoust and Hansson (1992) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญของรา *Absidia* หลายสายพันธุ์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสปอร์จาก 1.4×10^7 เป็น 5.8×10^7 ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ทำให้มีอัตราการเจริญสูงขึ้น นอกจากนั้นความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อที่ต่ำทำให้เส้นใยเจริญเป็นเยื่อและมีอัตราการเจริญต่ำ ในขณะที่ความเร็วรอบเพิ่มขึ้นจะทำให้เส้นใยเจริญแบบเกาะกลุ่มแน่นมากขึ้นและเชื้อมีอัตราการเจริญสูง

Davoust and Persson (1992) ศึกษาลักษณะการเจริญของราและผลของระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวไคโตซานของรา *Absidia repens* (CBS 102.32) พบว่าราเจริญในลักษณะเพลเลท (Pellet) ขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร มีอัตราการเจริญสูงสุดและชีวมวลมากที่สุด ในขณะที่การเจริญแบบเพลเลทขนาดใหญ่ 2-3 มิลลิเมตร ทำให้การเจริญของราถูกจำกัด ซึ่งความแตกต่างนี้พบมากในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 31-33 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณองค์ประกอบที่เป็นไคโตซานที่มีอยู่ในเส้นใยของราจะถูกสร้างตลอดการเจริญแต่พบมากในช่วง Stationary โดยมีองค์ประกอบที่เป็นไคโตซานเพิ่มจาก 18 เปอร์เซ็นต์ เป็น 23 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งชีวมวล และมีปริมาณผลผลิตไคโตซาน 2.8 กรัมต่อลิตร และถ้ามีการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ที่ 6.0 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้อัตราการเจริญของราเพิ่มขึ้น

Hu et al. (2004) ศึกษาปริมาณไคโตซานจากรา 33 สายพันธุ์ ได้แก่ ราในกลุ่ม Basidiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes และ Deuteromycetes (1, 9, 5 และ 18 สายพันธุ์ตามลำดับ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PGY salt broth 400 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 26

องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที การเจริญส่วนใหญ่ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 2-3 วัน พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งอยู่ในช่วงประมาณ 1585.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (*C. cladosporisides*) ถึง 10,209.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (*A. bisporus*) อัตราการเจริญเป็นเส้นใยต่อหน่วยชั่วโมงมีค่าอยู่ในช่วง 19.8 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง (*C. cladosporisides*) ถึง 209.3 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง (*R. oryzae*) สำหรับผลผลิตไคโตซานอยู่ในช่วง 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (*A. gossypii*) ถึง 646 มิลลิกรัมต่อลิตร (*A. glauca* (+)) สำหรับองค์ประกอบที่มีไคโตซานในชีวมวลมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 เปอร์เซ็นต์ (*A. gossypii*) ถึง 7.4 เปอร์เซ็นต์ (*A. glauca*(+)) ในขณะที่องค์ประกอบที่มีไคโตซานในผนังเซลล์อยู่ในช่วง 1.2 เปอร์เซ็นต์ (*P. chrysogenum*) ถึง 22.9 เปอร์เซ็นต์ (*A. nidulans*) และมีปริมาณ AIF อยู่ในช่วง 10.6 เปอร์เซ็นต์ (*Botrytis cimerea*) ถึง 0.3 เปอร์เซ็นต์ (*G. butleri*)

Jaworska and Konieczna (2001) ศึกษาผลของสารอาหารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างไคโตซานของ *Absidia orchidis* ได้แก่ เฟอร์รัส แมงกานีส โคบอลต์ ทริปซินและไคติน ซึ่งพบว่าแมงกานีสและเฟอร์รัสมีผลทำให้เกิดการเพิ่มผลผลิตของไคโตซานของราเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของชีวมวล แมงกานีสและเฟอร์รัสมีผลลดการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase แต่มีผลต่อการเร่งกิจกรรมเอนไซม์ Chitin synthase ให้ทำงานได้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ส่วนผลของทริปซินและไคตินต่อผลผลิตชีวมวลและปริมาณไคโตซานที่ผนังเซลล์มีค่อนข้างน้อย ในขณะที่โคบอลต์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของรา

Pochanavanich and Suntornsuk (2002) ศึกษาปริมาณไคโตซานจากรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* TISTR3245, *Rhizopus oryzae* TISTR3189, *Lentinus edodes* และ *Pleurotus sajo-caju* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-21 วัน และยีสต์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR5058 และ *Candida albicans* TISTR5239 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt extract broth (YMB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน สามารถให้ไคโตซาน 10-140 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเส้นใยแห้ง โดยไคโตซานที่ได้มีเปอร์เซ็นต์ดีอะซิทิเลชัน (%DD) ประมาณ 84-90 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุล 2.7×10^4–1.9×10^5 ดาลตัน และมีความหนืด 3.1-6.2 เซนติพอยส์ (cP) โดยพบว่า *Rhizopus oryzae* TISTR3189 สามารถผลิตไคโตซานได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับราชนิดอื่น (ตารางที่ 2-10)

ตารางที่ 2-10 ปริมาณและคุณสมบัติทางเคมีของไคโตซานที่ได้จากราสายพันธุ์ต่าง ๆ

รา	ไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของน้ำหนักแห้งเส้นใย (mg g^{-1})	ไคโตซานเป็นองค์ประกอบของนน.แห้งเส้นใย (%)	ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (%)	น้ำหนักโมเลกุล (Da)	ความหนืด (cP)
*A.niger*TISTR3245	107	11	90	1.4×10^5	6.2
*R. oryzae*TISTR3189	138	14	87.9	6.9×10^4	3.5
Lentinus edodes no.1	33	3.3	86.5	1.9×10^5	5.8
Pleurotus saja-caju no.2	12	1.2	83.8	1.1×10^5	5.6
Zygosaccharomyces rouxii TISTR5058	36	3.6	85.1	2.7×10^4	3.3
Candida albican TISTR5239	44	4.4	83.8	1.1×10^5	3.1

Prathumpai (1998) ศึกษาปริมาณของไคตินและไคโตซานจากรา *Gongronella butleri* USDB0201 และ *Aspergillus niger* ที่เจริญบนมันฝรั่ง พบว่า *G. butleri* USDB0201 ในอาหารเหลวสามารถผลิตไคโตซานได้ 75.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และอาหารแข็ง 88.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเปอร์เซ็นต์ดีอะซิทิเลชัน (%DD) ประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *A. niger* สามารถผลิตไคตินในอาหารแข็งได้ 80.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ในอาหารเหลวจะไม่ใช้ในการผลิตไคตินจากราเพราะให้ผลผลิตของเส้นใยต่ำ และสกัดไคตินจากราโดยใช้กรดฟอร์มิกเป็นตัวทำละลาย

Rane and Hoover (1993) ศึกษาสภาวะการสกัดไคโตซานจากไมซีเลียมรา *Absidia coerulea* ATCC14076 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสกัดไคโตซานด้วยสารละลายด่างและกรดโดยการเปลี่ยนแปลงเวลาและอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีผลต่อระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ความหนืด และปริมาณไคโตซานมีคุณสมบัติดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิและกรดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดไฮโดรคลอริกและกรดฟอร์มิกต่อปริมาณของไคโตซาน ซึ่งการสกัดไคโตซานด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ปริมาณไคโตซานสูงสุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ปริมาณไคโตซานสูงสุด

Suwannachart and Pichyangkura (1996) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินและไคโตซานจาก *Aspergillus niger* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริก โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟ่าอะมัยเลส (Cassava starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วที่เหมาะสมคือ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยให้ชีวมวลสูงสุดคือ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.6 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อสปอร์ $6x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ภายหลังการเก็บเกี่ยวนำเส้นใยราที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส และบดให้มีขนาด 25-35 mesh การสกัดไคตินจากเซลล์ราโดยใช้สารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างสีด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปอบที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถให้น้ำหนักแห้ง 13.842 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (75.34 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเส้นใยแห้ง) เปอร์เซ็นต์ดีอะซิลเลชั่นของไคโตซานที่ได้จากราเท่ากับ 68.24 เปอร์เซ็นต์ ตรวจวัดโดย HPLC

Synowiecki and Al-Khateeb (1997) ศึกษาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา *M. rouxii* เพื่อให้ได้ปริมาณไคตินและไคโตซานสูงสุด ในการศึกษาได้สกัดไคตินและไคโตซานจากเส้นใยราโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง จากนั้นใช้กรดอะซิตริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายในการสกัดไคโตซาน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงให้ได้ปริมาณไคตินและไคโตซานสูงที่สุดคือ 2 วัน ได้น้ำหนักไคตินและไคโตซาน 8.9 และ 7.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามลำดับ และพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงราให้นานมากขึ้นจะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไคตินและไคโตซานของรา

Tan et al. (1996) ศึกษาปริมาณไคโตซานของราในกลุ่ม Zygomycetes โดยเก็บเกี่ยวเส้นใยราในระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับราแต่ละสายพันธุ์ซึ่งมีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน โดยในระยะ Late exponential ราสามารถให้ผลผลิตไคโตซานสูงที่สุด ซึ่ง *Gongronella butleri* USDB0201 สามารถผลิตไคโตซานได้สูงที่สุดเมื่อเทียบต่อปริมาตรของสับเสตรท (93.4 มิลลิกรัมต่อ 200มิลลิลิตรของสับเสตรท) รองลงมาคือ *Cunninghamella echinulata* (79.3 มิลลิกรัมต่อ 200 มิลลิลิตร ของสับเสตรท) และ *G. butleri* USDB0428 (76.6 มิลลิกรัมต่อ 200 มิลลิลิตรของสับเสตรท) แต่เมื่อพิจารณาปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยพบว่า *C. echinulata* ไคโตซานต่อชีวมวลราสูงที่สุดคือ 7.14 เปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ไคโตซานต่อชีวมวลแห้ง 1 กรัม)

White et al. (1979) ศึกษาการผลิตและสกัดไคโตซานจาก *M. rouxii* โดยเลี้ยงราด้วยถังหมักขนาด 4 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YPDB (Yeast peptone dextrose broth) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ปรับให้มีความเป็นกรดด่างเป็น 4-4.5 เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าได้ผลผลิตส่วนที่เป็นผนังเซลล์ 16-22 เปอร์เซ็นต์จากน้ำหนักแห้งของเส้นใยแห้งทั้งหมด โดยมีปริมาณกลูโคซามีน 35-40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์รา การแยกไคโตซานที่สกัดได้ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้กรดอะซิติก กรดฟอร์มิกและกรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น ซึ่งกรดไฮโดรคลอริกมีประสิทธิภาพมากที่สุด ผลผลิตไคโตซานที่ได้อยู่ในช่วง 4-8 เปอร์เซ็นต์จากน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์รา

Yokoi et al. (1998) ศึกษาการเจริญและการผลิตไคโตซานของรา *Absidia atrospora* IFO9471, *Gongronella butleri* IFO8080 และ *G. butleri* IFO8081 โดยเพาะเลี้ยงบนวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม คือ Barley-buckwheat-*shochu* distillery wastewater (BBS medium) และ Sweet potato-*shochu* (SPS medium) ซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากโรงงานเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ประเภท *Shochu* ของเสียเหล่านี้ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ในปริมาณเข้มข้นสูง ไม่มีสารที่เป็นอันตราย และราสามารถเจริญบนของเสียเหล่านี้ได้ใน SPS medium ราทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่ 4-8.5 และให้ปริมาณไคโตซานได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงใน BBS medium โดยพบว่า *G. butleri* IFO8081 ให้ผลผลิตของไคโตซานสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในอาหาร SPS medium คือ 730 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University