บทที่ 1

บทนำ

แป้งมันสำปะหลัง

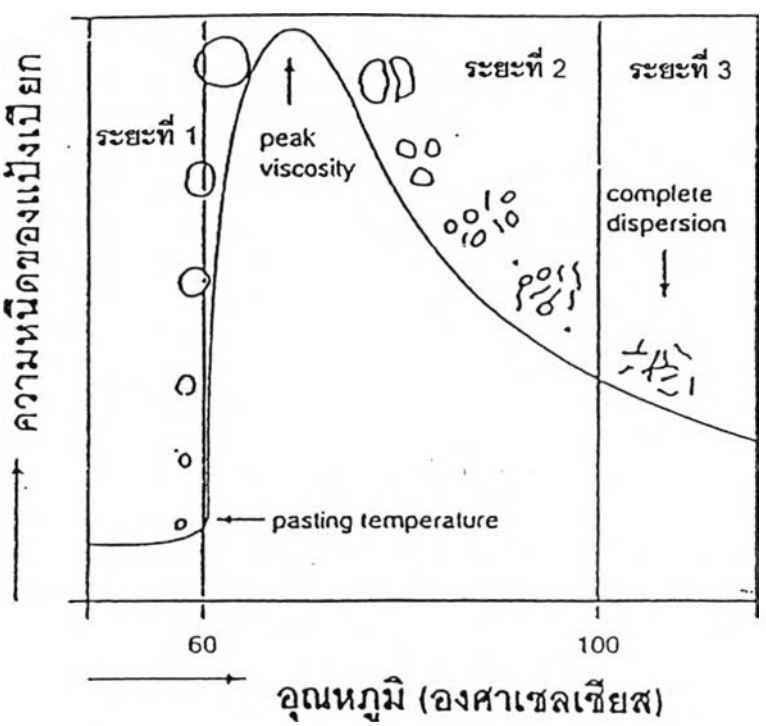
แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน ในอัตราส่วน 6: 10 :5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย พอลีเมอร์เชิงเส้น คือ อะไมโลส (amylose) ที่หน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-D-(1-4) glucosidic lingkage โดยมีหน่วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย และ พอลีเมอร์เชิงกิ่ง คืออะไมโลเพคติน (amylopectin) ซึ่งหน่วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-D-(1-4) glucosidic lingkage เป็นส่วนใหญ่ และส่วนที่แตกสาขาเป็นกิ่งนั้นจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-D-(1-6) glucosidic lingkage แต่ละสาขาประกอบด้วยหน่วยกลูโคสประมาณ 15-25 หน่วย สำหรับแป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 17 (Swinkles , 1983) มีน้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินประมาณ $2.1x10^4$ และ $3x10^6$ ดาลตัน ตามลำดับ (Peat , 1954) โดยทั่วไปเม็ดแป้งจะมีขนาดตั้งแต่ 2-100 ไมครอน อาจมีรูปกลม รูปไข่ และ อื่นๆ เมื่อตรวจเม็ดแป้งมันสำปะหลังที่อยู่ในหัวมันสำปะหลังจะมีรูปกลมปลายด้านหนึ่งเป็นรอยตัด จึงมีลักษณะคล้ายรูปถ้วย (Wurzburg , 1972) มีขนาดตั้งแต่ 5-35 ไมครอน (0.005-0.035 มิลลิเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 15 ไมครอน (Brautlecht , 1953)

ลักษณะความหนืดที่เกิดจากแป้งละลายในน้ำร้อนและน้ำเย็น

1. การเกิดเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ของแป้ง

เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำเย็น โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) เป็นจำนวนมากและยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Leach , 1965) เมื่ออยู่ในน้ำเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำและพองตัวได้เล็กน้อย (Wurzeburg , 1972) เนื่องจาก

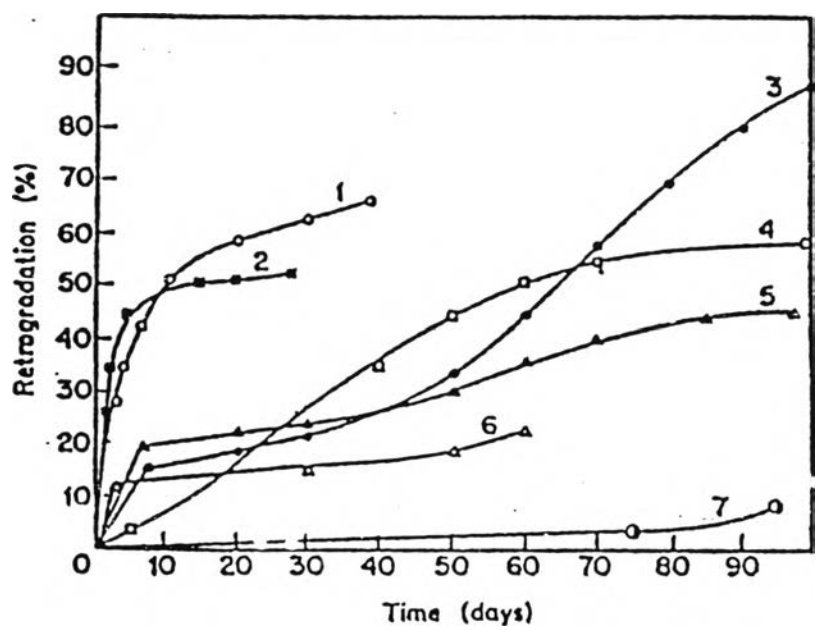
พันธะระหว่างโมเลกุลของเม็ดแป้งในบริเวณที่เป็นผลึก (crystalline region) มีความแข็งแรงที่จะทนต่อการละลายได้ (Osman , 1965) เมื่อให้ความร้อนกับน้ำแป้งจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆของเม็ดแป้ง จนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ 60-80 องศาเซลเซียส ซึ่งเรียกว่า ช่วงอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน ความร้อนจะทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดโครงสร้างในเม็ดแป้งเข้าด้วยกันแตกออกทำให้ดูดซึมน้ำได้มากขึ้น มีผลทำให้แป้งเกิดการพองตัวทำให้มีขนาดใหญ่กว่าเดิมหลายเท่า (Osman , 1965) การพองตัวของเม็ดแป้งทำให้แป้งละลายน้ำได้ดีขึ้น แป้งเปียก (paste) จะมีความใสและความหนืดมากขึ้น ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการพองตัวของเม็ดแป้งคือแรงยึดระหว่างพันธะไฮโดรเจนภายในเม็ดแป้ง สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะเกิดเจลาติไนเซชัน ที่อุณหภูมิต่ำกว่าแป้งจากธัญพืช เช่น แป้งสาลี และแป้งข้าวโพด เป็นต้น และอัตราการเพิ่มความหนืดจะรวดเร็วกว่า และยังเกิดการสลายตัวมากกว่าถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น โดยพบว่าเม็ดแป้งมันสำปะหลังจะแตกออกอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส (Schoch , 1968)



รูปที่ 1 ระยะในการเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้ง (Schoch,1968)

2. การเกิดรีโทรเกรเดชัน (rethogradation)

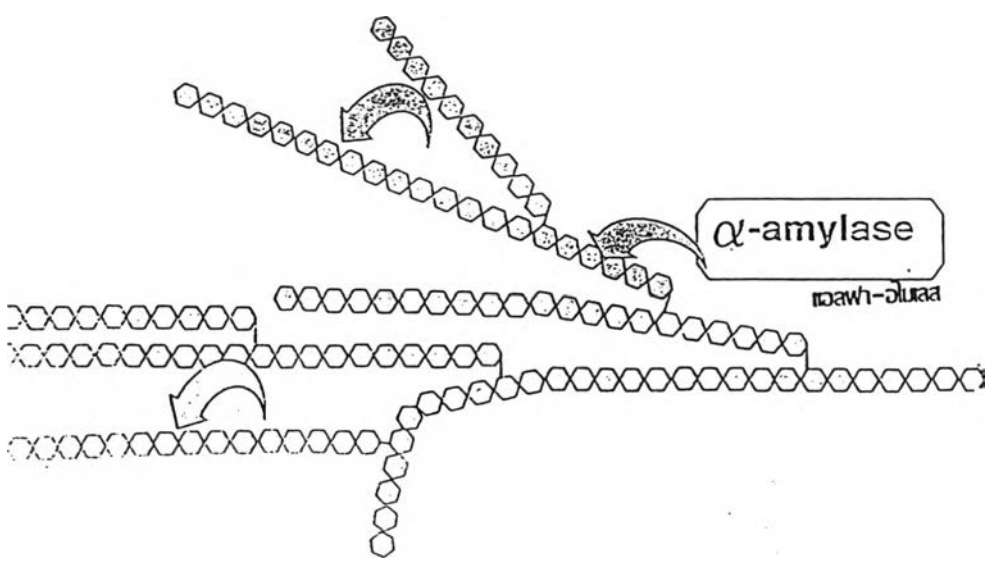
เมื่อผสมแป้งกับน้ำแล้วนำไปให้ความร้อน แล้วปล่อยให้เย็นตัวลง โมเลกุลของอะไมโลสที่อยู่ใกล้กันจะมาเรียงตัวกัน เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล จะเกิดโครงสร้างใหม่ที่สามารถอุ้มน้ำได้แต่ไม่มีการดูดซึมน้ำเข้ามาอีก สภาพเช่นนี้ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิยิ่งเย็นตัวลง ความแข็งแรงของโครงสร้างนี้จะยิ่งเพิ่มขึ้น ความหนืดก็ยิ่งสูงขึ้นจนสิ้นสุดการตรวจวัด ความหนืดสุดท้าย เรียกว่า final viscosity ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น เรียกว่า รีโทรเกรเดชัน (Leach,1965) แป้งที่เกิดรีโทรเกรเดชันแล้วจะมีความต้านทานต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยอะไมโลส แป้งมันสำปะหลังซึ่งมีปริมาณอะไมโลเพคตินสูงประมาณร้อยละ 83 อีกประมาณ 17 % มีแนวโน้มที่จะเกิดปรากฏการณ์รีโทรเกรเดชันเพียงเล็กน้อย (Collison , 1968) อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของแป้งชนิดต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของแป้งชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2
1. แป้งข้าวโพด 2. แป้งสาลี 3. แป้งมันฝรั่ง 4. แป้งมันเทศ 5. แป้ง Arrow root
6. แป้งมันสำปะหลัง 7. แป้ง waxy corn (Collission,1968)

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) มีชื่อตาม Commision on enzymes ว่า α-(1,4)-glucan 4-glucanohydrolase EC 3.2.1.1 เอนไซม์นี้ถ้าแบ่งตามตำแหน่งการย่อยแป้งจะเป็นแบบ เอนโดอะไมเลส (endoamylase) จะย่อยสลายแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-1,4 glycosidic lingkage ถ้าย่อยไม่สมบูรณ์จะได้ กลูโคส มอลโตส และ เด็กซ์ตริน ถ้าการย่อยสมบูรณ์ จะได้มอลโตส และ กลูโคส และไม่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,6 lingkage ในลักษณะที่ตัดภายในสายพอลีเมอร์แบบเอนโดไฮโดรเลส (endohydrolase) (Whitaker,1972) การตัดสายพอลีเมอร์ของแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3



รูปที่3 แสดงการย่อยภายในโมเลกุลของแป้งด้วยการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Bruinenberg,1996)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์นี้พบทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ตลอดทั้งในคน (Whitaker,1972) จะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งเอนไซม์มีบทบาทในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกแซคคาร์ไรด์ และ ไดแซคคาร์ไรด์ และมีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน มีแคลเซียม (Ca^{+2}) 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนอิออน เช่น Cl^- , Br^- และ F^- เป็นต้น ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-9 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส (Birch , 1981) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ให้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Whitaker,1972)

Microorganism	Mechanism	Main product
Aspergillus oryzae	Endohydrolase	maltose
Bacillus subtilis	Endohydrolase	maltotriose/maltopentaose
Bacillus licheniformis	Endohydrolase	maltotriose/maltopentaose
Pseudomonas stutzeri	Exohydrolase	maltotetraose
Aerobacter aerogenes	Exohydrolase	maltohexaose
Bacillus stearothermophilu	Endohydrolase	maltotriose
Bacillus amyloliquefaciens	Endohydrolase	maltotriose

ไคติน

ไคตินเป็นสารพอลีเมอร์ธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะซิติลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล

ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคติน

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับไคตินครั้งแรกโดย Braconnot เมื่อปี 1811 ได้ศึกษาเกี่ยวกับเห็ด โดยนำเอาเห็ด *Agaricus volvaccus* และเห็ดชนิดอื่นๆ มาทำการละลายในสารละลายด่าง แล้วทำการแยกไคติน ซึ่งคิดว่าเป็นไปได้ที่จะมีการปนมากับโปรตีน เมื่อทำการกลั่นผลิตผลที่ได้แล้วทำให้แห้ง เรียกสิ่งที่ได้มาว่า "fungine" ปี 1823 Odier พบว่าโครงสร้างภายนอกของแมลงมีสารชนิดเดียวกันกับที่พบในโครงสร้างของเห็ดจึง เรียกสารที่พบเป็นภาษากรีกว่า "chiton" และได้ชื่อว่าเป็นคนแรกที่ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างภายนอกของแมลง กับเนื้อเยื่อของพืช ในปี 1843 Lassaigne ได้ศึกษาโครงสร้างภายนอกของตัวไหม *Bombyx mori* โดยการใช้สารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่า มีไคตินในบริเวณปีก และ ส่วนภายในของตัวไหม ปี 1878 Ladderhorse พบว่าไคตินนั้นประกอบไปด้วยหน่วยของกลูโคซามีนและกรดอะซิติก ในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง และ ปู มีการศึกษาเกี่ยวกับไคตินเช่นกัน ในปี 1951 Blumberg และคณะ ได้ทดลองสกัดไคตินจากเปลือกกุ้งหิน (rock lobster) ด้วยสารละลายด่าง ปี 1978 Bough ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อไคตินมีหลายปัจจัยด้วยกัน แต่ที่สำคัญ คือ ระยะเวลาในการสกัดแยก ความเข้มข้นของสารละลายด่าง รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วย ส่วนในหมึก พบว่า จะมีไคตินอยู่ปริมาณน้อยที่บริเวณเปลือกนอก และส่วนใหญ่จะอยู่รวมกับกลุ่มของไฟบรัสโปรตีน (fibrous protein) แต่จะพบไคตินมากในส่วนที่เป็นแกนแข็ง (Stegeman , 1963)

ไคโตแซน

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ออกจากสายของไคติน เหลือเป็นหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

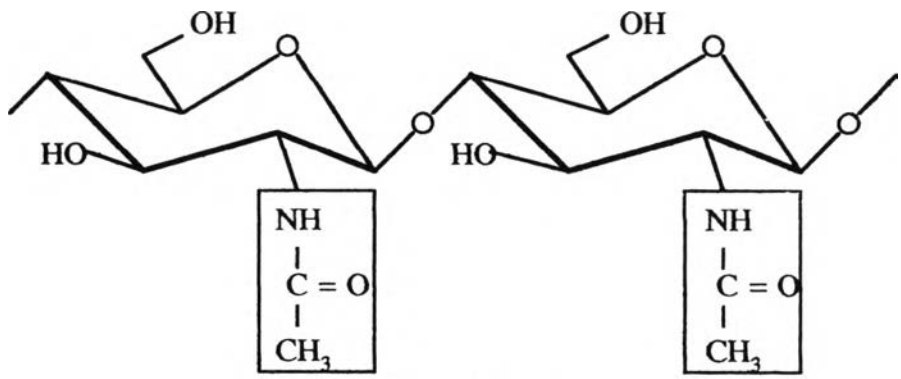
ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับไคโตแซน

ไคโตแซนนั้นพบครั้งแรกโดย Rouget ในปี 1859 โดยการนำเอาไคตินมาต้มในสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากจนเดือด และพบว่าไคตินที่นำมาต้มนั้นสามารถละลายในกรดอินทรีย์ได้ จึงเรียกวิธีนี้ว่า modified chitin และเมื่อนำมาทดสอบสี โดยการผสมด้วยสารละลายไอโอดีนและกรด พบว่าให้สีม่วง ในขณะที่ไคตินให้สีน้ำตาล ต่อมาในปี 1894 Hoppe-Seyler ได้ให้คำนิยามของ modified chitin ว่า chitosan

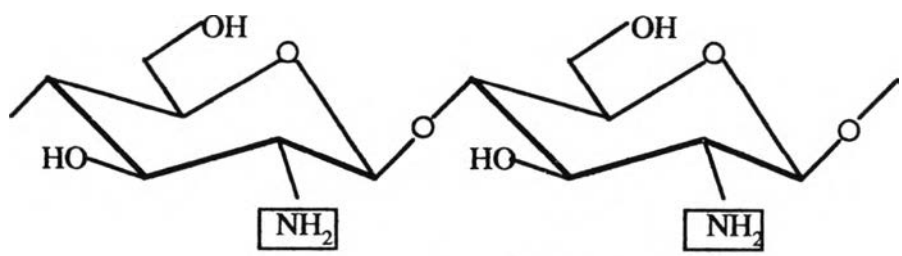
ในช่วงต้นปี 1900 ได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับไคตินและไคโตแซนกันอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิต ในปี 1931 Rammelberg พบว่ามีไคตินจากรา และเปลือกปู และในช่วงปลายปี 1930 ถึง 1940 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประโยชน์ของไคตินและอนุพันธ์ของไคตินกันมาก แต่เนื่องมาจากกระบวนการสกัดที่ซับซ้อน รวมทั้งระยะเวลาในการเก็บรักษาวัตถุดิบนั้นสั้นเพราะอาจเกิดการเน่าเสียได้ จึงทำให้มีความสนใจน้อยลง แต่ในปี 1970 เป็นต้นมา เมื่อมีการพัฒนาเทคโนโลยีขึ้น รวมทั้งมีปริมาณของวัตถุดิบจากแหล่งต่าง ๆ กันมากขึ้น จึงเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับไคตินและไคโตแซนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้นเรื่อยๆ เช่น ในปี 1991 Knorr ได้ทดลองใช้ไคตินและไคโตแซนที่ได้จากกระบวนการผลิตอาหารที่มีกุ้งเป็นส่วนประกอบนำเอากลับมาใช้ประโยชน์ เช่น การดูดซับโลหะหนัก สีย้อมผ้า และ ยาฆ่าแมลง เป็นต้น

1. ลักษณะทั่วไปของไคติน

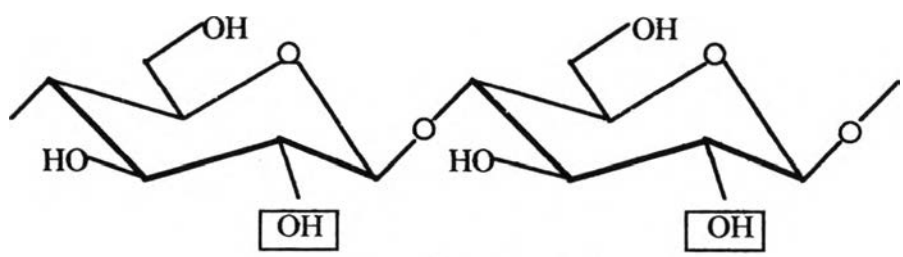
ไคติน เป็นพอลีเมอร์ของพอลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ตามธรรมชาติ มีสูตรโครงสร้างทั่วไปคล้ายคลึงกับเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสที่มีการเกาะกันแบบ β-lingkage ดังแสดงในรูปที่ 4



สูตรโครงสร้างของไคติน



สูตรโครงสร้างของไคโตแซน



สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส

รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของไคติน ไคโตแซน เปรียบเทียบกับเซลลูโลส (Robert,1994)

จากรูปที่ 4 แสดงความแตกต่างระหว่างพอลีเมอร์ทั้งสอง คือ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในเซลลูโลส เป็นหมู่อะเซตตาไมด์ (-NH-CO-CH_3) ในไคติน ดังนั้น เมื่อย่อยสลายไคตินเป็นหนึ่งหน่วยจะได้ N-acetylglucosamine เมื่อแต่ละหน่วยเกาะกันจะได้ N-acetylglucosamine นับพันหน่วย (Carrod,1978) อย่างไรก็ตาม ไคตินในธรรมชาติจะมีบางหน่วยที่ไม่มีหมู่ acetyl (-CO-CH_3)

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly-β (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และ มีสูตรทั่วไปเป็น $(C_8H_{13}NO_5)_n$ ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 47.29 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.89 และ ออกซิเจนร้อยละ 39.11 (Budavari,1976)

คุณลักษณะของไคติน พบว่า ไคติน เป็นของแข็งไม่ละลายในน้ำ มีความเสถียรสูง มีสี grayish-white สามารถเสถียรได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 260°C จึงจะย่อยสลายได้

1.1 แหล่งของไคติน

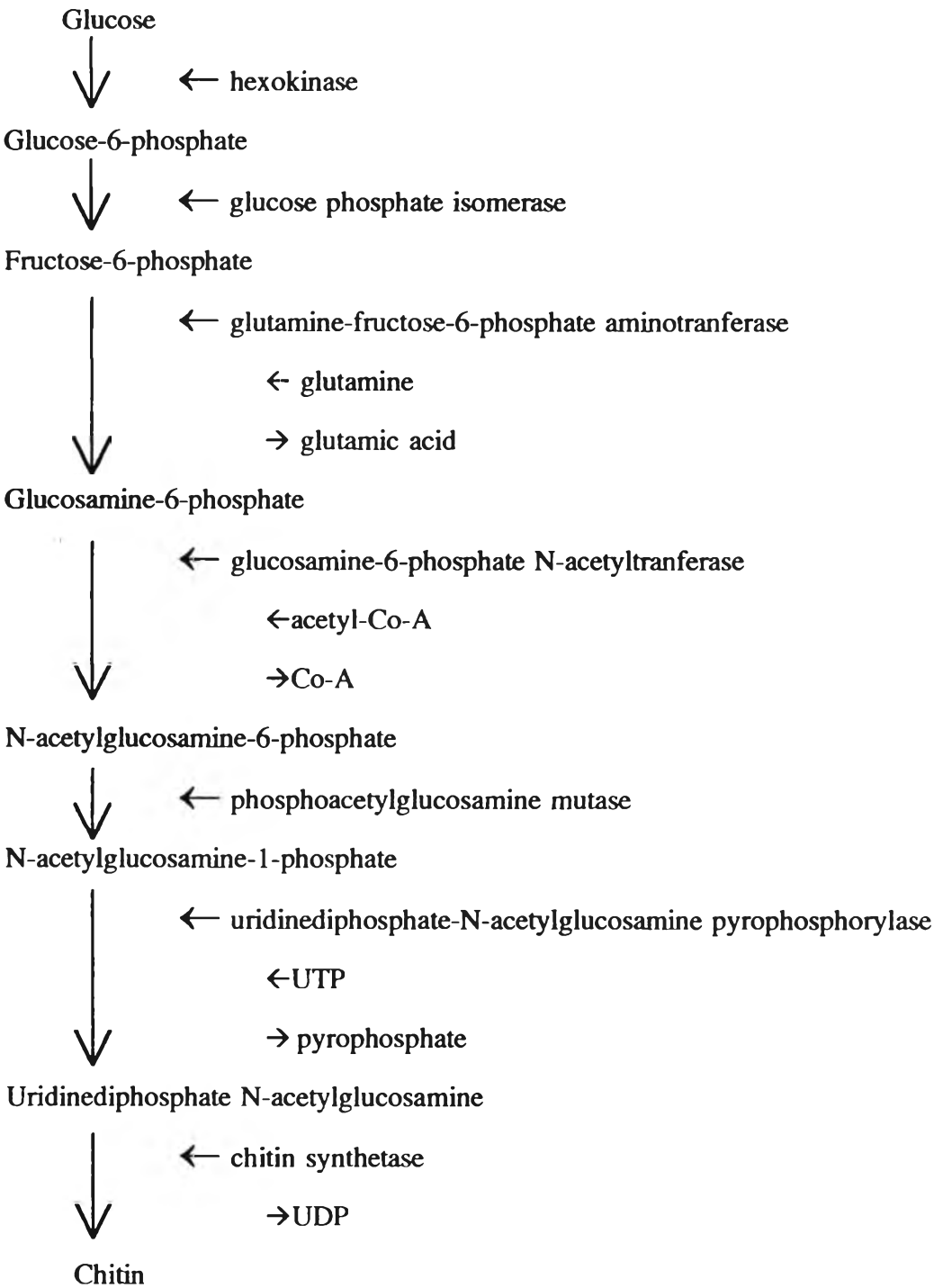
ไคติน เป็นพอลีเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ (Muzzarelli,1977) ในสัตว์จะพบไคตินมากตามบริเวณโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ของสัตว์ใน Phylum Arthropoda เนื่องจากไคตินเป็นตัวทำให้โครงสร้างยึดกันเป็นรูปและคงสภาพแข็งแรงพอที่จะใช้เป็นเครื่องป้องกันตัวจากการทำร้ายของสัตว์อื่นๆ ซึ่งจะพบมากใน Class Crustacea ได้แก่ กุ้ง ปู กั้ง กระดองของหมึกตลอดจนใน Class Insecta ได้แก่ แมลงปีกแข็ง ด้วง แมลงสาบ เป็นต้น และแหล่งสร้างไคตินที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง คือ เห็ด รา และ ยีสต์ ซึ่งสามารถพบไคตินได้ที่บริเวณผนังเซลล์ โดยปริมาณไคตินที่พบจะมีปริมาณแตกต่างกันออกไป แสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณไคตินที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างๆ (Muzzarelli ,1977)

แหล่งไคติน	ปริมาณไคติน (%)	รูปแบบของไคติน
Crustacea		
Crangon (shrimp)	69.1	α-chitin
Alaskan (shrimp)	28	
Insect		
May beetle	16	α-chitin
Pieris (sulfur butterfly)	64	
Colcoptera (beetle)	27-35	
Diptera (true fly)	54.8	
Bombyx (silk worm)	44.2	
Calleria (wax worm)	33.7	
Molluscan organ		
Squid,skeletalpen	41	β-chitin
Oyster shell	3.6	
Clamshell	6.1	
Fungi		
Aspergillus niger	42.0	α-chitin
Aspergillus phoenicis	23.7	
Pennicilium notatum	18.5	
Histoplasma capsulatum	25.8	
Histoplasma farciminosum	40.0	
Mucor rouxii	44.5	
Mortierella vinacea	22.0	

1.2 การสังเคราะห์ไคติน

กระบวนการสังเคราะห์ไคติน (chitin synthesis) ในสิ่งมีชีวิตจะมีกระบวนการต่างๆ สรุปดังนี้ (Muzzarelli , 1977)



1.3 รูปแบบของไคติน

ไคตินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติได้ถูกจำแนกโครงรูป (conformation) โดยถือตามแบบ (Muzzarelli,1977) มีอยู่ 3 รูปแบบ โดยพิจารณาจากความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของสายโมเลกุล คือ α-chitin , β-chitin และ γ-chitin โดยรูปแบบส่วนใหญ่ที่พบมากคือ α-chitin ที่พบในโครงสร้างภายนอกของแมลงและในเชื้อรา และ เปลือกกุ้ง

1.4 สมบัติการละลาย (solubility)

ไคตินไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ กรดเจือจาง ด่างทั้งที่เจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดไฮโดรคลอริก , กรดซัลฟุริก, กรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 78-79 รวมทั้งกรดอนินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิกที่ปราศจากน้ำ (Muzarelli,1985) และ สารละลายฟูลออโร - แอลกอฮอร์ (Knorr,1984 ; Austin,1981) อย่างไรก็ตาม Knorr และคณะ รายงานว่าตัวทำละลายเหล่านี้มีผลทำให้โมเลกุลของไคตินเกิดปฏิกิริยา degradation ได้ รวมทั้งการนำตัวทำละลายเหล่านี้ ไปใช้งานค่อนข้างยุ่งยาก ต่อมา Austin (1977 ; 1981) ได้ค้นพบระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับไคติน คือ N,N-dimethylacetamide และ N-methylpyrrolidone หรือ ของผสมของตัวทำละลายทั้งสองที่กล่าวมา ร่วมกับ lithiumchloride (LiCl) ปริมาณเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้สามารถนำไคตินไปอัดด้วยเครื่องทำเป็นเส้น (extrude) ในแอลกอฮอล์ หรืออะซีโตน ได้เป็นเส้นใยต่อเนื่องได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า ระบบตัวทำละลายดังกล่าวสามารถปรับสภาพของไคตินที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไปแล้วให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ โดยมีการทดลองวัดค่า specific rotation ของไคติน ก่อนและหลังการละลายใน N-dimethylacetamide และ LiCl พบว่าสามารถเปลี่ยนค่า specific rotation ของไคตินให้กลับสู่ค่าเดิมได้

1.5 กระบวนการแยกไคตินและทำให้บริสุทธิ์

กระบวนการแยกไคติน ประกอบด้วยขั้นตอนทั่วไป ดังนี้

1.5.1 การกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization)

Bade (1985) ได้รายงานถึงวิธีการกำจัดแร่ธาตุที่ปะปนอยู่ในไคตินไว้ 3 วิธี คือ

1. การใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง การใช้กรดซัลฟุรัส ในการกำจัดแร่ธาตุสำหรับการผลิตไคตินในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ ลดปฏิกิริยาการสูญเสียสภาพธรรมชาติของไคติน เนื่องจากกรดซัลฟุรัสเป็นกรดอ่อน

2. การใช้ ethylenediaminetetraacetic (EDTA) ซึ่ง Foster ได้เสนอไว้ในปี 1957 ใช้เพื่อให้ภาวะในการกำจัดแร่ธาตุอ่อนลง

3. ในปี 1985 Bade ได้นำเสนอการกำจัดแร่ธาตุโดยใช้เอนไซม์

1.5.2. การกำจัดโปรตีน (Deproteinization)

การกำจัดโปรตีน Bade (1985) ได้รายงานว่ามี 2 วิธีได้แก่ การใช้สารละลายด่าง โดยมากนิยมใช้ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ มีการใช้สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดโปรตีน

ในปี 1982 Cosio ได้รายงานว่า การลดขนาดวัตถุไคตินเป็น 20-60 mesh (0.85-0.25 มิลลิเมตร) สามารถกำจัดโปรตีนได้หมดภายใน 60 นาที ในขณะที่ไคตินที่มีขนาด 8-20 mesh (2.35-0.85 มิลลิเมตร) จะสามารถกำจัดโปรตีนได้เพียงร้อยละ 65 และอย่างไรก็ตาม พบว่าถ้ามีการลดขนาดให้เล็กลงเป็น 60-100 mesh (0.25-0.15 มิลลิเมตร) จะเพิ่มประสิทธิภาพได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับขนาด 20-60 mesh นอกจากการใช้สารละลายด่างในการกำจัดโปรตีนแล้ว ยังมีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนด้วย Bough (1978) พบว่า การใช้เอนไซม์จะมีผลทำให้ความหนืดของสารละลายไคโตแซนลดลง

1.5.3. การกำจัดสี (decolorize)

ขั้นตอนในการกำจัดสีนั้นโดยมากนิยมใช้ตัวทำละลายต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ อะซีโตน และ อีเทอร์ หรือ สารละลายเปอร์มังกาเนต แต่มีรายงานว่าการใช้สารละลายเปอร์มังกาเนต (Whistler , 1965) ซึ่งจัดเป็นพวก oxidizing agent ที่รุนแรงจะมีผลต่อการทำลายสภาพธรรมชาติของไคตินได้ ขั้นตอนการกำจัดสีนี้สามารถทำในระหว่างขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุและโปรตีน หรือภายหลังจากการกำจัดแร่ธาตุและโปรตีนแล้ว

1.5.4 การกำจัดน้ำและการทำให้แห้ง

ขั้นตอนการกำจัดน้ำและการทำให้แห้ง อาจทำโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ เช่น อะซีโตน และ แอลกอฮอล์ สามารถอบให้แห้งภายใต้ภาวะบรรยากาศ (Naczk , 1981) และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส (Peniston , 1970)

2. ลักษณะทั่วไปของไคโตแซน

ไคโตแซน เป็นอนุพันธ์ของไคติน ได้จากการแยกหมู่อะซิติลออกจาก (deacetylation) ไคติน บางครั้งเรียกไคโตแซนว่า ดีอะเซตติเลตไคติน (deacetyiated chitin) เนื่องจากหมู่อะซิติล (acetyl) (-CO-CH_3) ของไคตินถูกตัดออกเหลือเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง โดยทั่วไปถ้าหมู่อะซิติลถูกตัดหรือหลุดไปประมาณร้อยละ 60 ไคตินจะถูกเรียกว่าไคโตแซน และถ้าหมู่อะซิติลถูกตัดหรือหลุดไปประมาณร้อยละ 90-100 จะเรียกว่า fully deacetylated chitosan (Muzarelli , 1985)

ไคโตแซน มีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose และมีสมบัติที่แตกต่างจากพอลีแซคคาไรด์ตัวอื่น หรือ สารไฮโดรคอลลอยด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงอื่น ๆ คือ ไคโตแซนมีสมบัติเป็น cationic polyelectrolyte เนื่องจากไคโตแซนสามารถละลายได้ในสารละลายกรด ได้แก่ สารละลายกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น

คุณลักษณะของไคโตแซนที่สำคัญในการพิจารณาไคโตแซนส่วนใหญ่จะคำนึงถึงค่า Degree of deacetylation ,%D.D. และน้ำหนักโมเลกุล และสมบัติอื่นๆ อีก เช่น สมบัติในการละลาย (solubility)

2.1 กระบวนการผลิตไคโตแซน

กระบวนการผลิตไคโตแซนเป็นกระบวนการที่เปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซนโดยการกำจัดหมู่อะซิติลด้วยการใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้นสูงและที่อุณหภูมิสูง ซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการนี้มีหลายอย่างด้วยกัน คือ

2.1.1 ชนิดของสารละลายด่าง

Moorjani ได้รายงานไว้ในปี 1975 ว่าโดยส่วนใหญ่สารละลายด่างที่ใช้ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แต่ที่นิยมใช้ คือ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ้าใช้สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์จะให้ไคโตแซนที่มีความหนืดดีกว่าการใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

2.1.2 ความเข้มข้นของสารละลายด่าง

ในปี 1953 Lusena รายงานไว้ว่า ทั่วไปนิยมใช้ด่างในการกำจัดหมู่อะซิติลในรูปของสารละลายโดยที่ความเข้มข้นที่จะใช้นั้นอยู่ในช่วง 35-50% ส่วนในกระบวนการที่ใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์บางครั้งต้องใช้ถึง 55% (w/w) อีกทั้งการลดความเข้มข้นของสารละลายด่างแต่เพิ่มระยะเวลาของกระบวนการจะได้ไคโตแซนที่ละลายได้ดีรวมทั้งมีความหนืดน้อย แต่การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายด่างมีผลเล็กน้อยต่อการกำจัดหมู่อะซิติล และความหนืด

2.1.3 ขนาดของไคตินเพื่อผลิตไคโตแซน

Lusena ได้รายงานไว้ในปี 1953 ว่าขนาดของไคตินที่อยู่ในช่วงระหว่าง 20-40 ,40-60 และ 60-80 mesh ไม่มีผลต่อการกำจัดหมู่อะซิติล และ ความหนืด และ ในปี 1978 Bough ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของขนาดไคตินที่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของกระบวนการที่มีต่อส่วนประกอบรวมทั้งความหนืดของไคโตแซนที่ผลิตได้

2.1.4 อุณหภูมิของกระบวนการผลิตไคโตแซน

อุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิสูงในช่วงระหว่าง 100-120^{o}C, 140-150 ^{o}C และบางครั้งอาจสูงถึง 170-180 ^{o}C อย่างไรก็ตามมีการเลือกใช้อุณหภูมิที่ต่ำ 50-60 ^{o}C บางกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติลด้วย ในปี 1953 Lusena และคณะ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิจะสามารถเพิ่มเปอร์เซนต์ของการกำจัดหมู่อะซิติลและทำให้ขนาดของโมเลกุลลดลง การสกัดด้วยสารละลายด่างควรทำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการแตกหักของสายโมเลกุล และ ในปี 1978 Bough และคณะ กล่าวไว้ว่า การใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้ไคโตแซนที่ผลิตได้สูญเสียสภาพธรรมชาติและทำให้โมเลกุลของไคโตแซนเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ และ ถ้าใช้ความเข้มข้นของสารละลายด่างเพิ่มขึ้นอุณหภูมิที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติลควรจะลดลง เพื่อไม่ให้ภาวะที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติลรุนแรงจนเกินไป

2.1.5 ระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติล

ระยะเวลา ขึ้นอยู่กับค่า Degreeof deacetylation ของไคโตแซน ที่ต้องการ รวมทั้งขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายด่างและอุณหภูมิ ในปี 1978 Bough และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยการใช้ 50 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 145-150 ^{o}C จะได้ไคโตแซนในระยะเวลา 5-15 นาที แต่ถ้าใช้สารละลายด่างชนิดเดียวกันความเข้มข้นเท่ากัน แต่ใช้อุณหภูมิ 100 ^{o}C ระยะเวลาที่จะได้ไคโตแซนนานถึง 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมี รายงานว่า เวลาที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิติล เป็นปัจจัยที่ใช้ในการแบ่งความบริสุทธิ์ของไคโตแซน

2.1.6 ปฏิกิริยา oxidation

ในปี 1953 Lusena และ Rose พบว่าถ้าใช้กระบวนการกำจัดหมู่อะซิติลภายใต้บรรยากาศที่มีไนโตรเจนจะให้ปริมาณไคโตแซนที่มีความหนืดสูงและให้น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าในบรรยากาศที่มีออกซิเจน ทั้งนี้เนื่องจากออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นในปฏิกิริยาการย่อยสลายของสายโมเลกุล นอกจากนี้ ในปี 1983 Domand และ Rinaudo รายงานว่า thiophenol สามารถใช้เป็นตัวดักจับออกซิเจนได้ซึ่งเป็นผลให้สามารถป้องกันการเกิดการย่อยสลายของสายโมเลกุลได้

2.2 สมบัติในการละลาย

Knorr ได้รายงานไว้ในปี 1984 ว่า ตัวทำละลายที่ดีของไคโตแซน คือ สารละลายกรดฟอร์มิก ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-100 โดยปริมาตร นอกจากนี้ไคโตแซนยังสามารถละลายได้ใน สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง สารละลายกรดไนตริกเจือจาง และละลายได้น้อยในสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ รวมทั้ง สารละลายกรดซัลฟุริก ไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากไคโตแซนไม่สามารถละลายได้ในน้ำที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า6.5 แต่เมื่อนำไคโตแซนมาบดแห้งกับกรดอินทรีย์ จะได้ไคโตแซนที่สามารถละลายน้ำได้

2.3 ค่า Degree of deacetylation ของไคโตแซน

สมบัติส่วนใหญ่ของไคโตแซน จะขึ้นกับ Degree of deacetylation (%D.D.) ด้วยเหตุนี้จึงต้องวิเคราะห์หาค่า %D.D.ของไคโตแซน

3. การดัดแปลงไคตินและไคโตแซนโดยวิธีทางเคมี

สามารถทำได้หลาย ๆ วิธีด้วยกัน อนุพันธ์ที่เกิดวิธีทางเคมี (Muzzarelli,1977) ได้แก่

1. alkali chitin
2. salt form เช่น chitin citrate
3. polyelectrolyte complex
4. metal chelate
5. sulfated,phosphated หรือ nitrate derivative
6. deoxyhalo derivative
7. depolymerized derivative
8. sugar derivative
9. N-arylidene หรือ N-alkylidene derivative
10. N-acyl derivative
11. N-alkyl derivative
12. N-carboxyalkyl (aryl) derivative
13. O-carboxy หรือ O-hydroxy-alkyl derivative
14. O-acyl derivative
15. O-sulfonyl derivative

จะพบว่าอนุพันธ์ของไคตินและไคโตแซนมีหลายชนิดด้วยกัน แต่ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้มาก ได้แก่

1. Carboxymethyl chitin (CM-chitin) ซึ่งนิยมนำมาใช้ในเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาผิวพรรณ คล้ายกับกรดไฮยาลูโลนิก

2. N-carboxybutyl chitosan (Evalsan) เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถละลายน้ำได้และใช้ทำเป็นฟิล์มหรือเป็นแผ่นกรอง ช่วยในการตกตะกอนของโลหะหนัก

4. ประโยชน์ที่สำคัญ

ไคตินและไคโตแซน นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างด้วยกัน ในด้านของเทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ เครื่องสำอางค์ เกษตรกรรม อาหาร และอุตสาหกรรม ได้แก่

4.1 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Muzzarelli,1977)

ใช้เป็นตัวตรึง (matrix) ของทั้งเอนไซม์ และ เซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อเพิ่มความเสถียรให้กับตัวตรึง

สามารถทำเป็นแผ่นกรอง (membrane) ในการกรองน้ำผลไม้และไวน์

ใช้ในการเก็บเกี่ยวโปรตีน โดยใช้เป็นตัวตกตะกอนโปรตีน

4.2 ด้านการแพทย์ (Muzarelli,1977)

ช่วยลดคอเลสเตอรอล

รักษาบาดแผล โดยทำให้อยู่ในรูปผงโรยบริเวณบาดแผลซึ่งจะมีผลทำให้แผลสมานได้เร็วขึ้น

โดยสามารถปั่นเป็นเส้น เพื่อใช้เย็บแผลได้ดีกว่าเส้นใยสังเคราะห์ เพราะผูกเป็น ปมง่าย แผลหายเร็วสลายตัวเมื่อแผลติดกัน และคนไข้ไม่เกิด อาการแพ้ ใช้ทำเป็นผ้าปิดตาได้

ใช้ทำเป็นแคบซูลยา โดยไม่มีพิษรวมทั้งไม่มีผลต่อระบบนิเวศน์

ป้องกันความดันโลหิตสูง

4.3 ด้านเครื่องสำอางค์ (Muzzarelli ,1977)

รักษาเส้นผม ทำให้เส้นผมไม่ขาดง่าย และเป็นเงางาม เนื่องจากสารละลายของไคโตแซนนั้นมีความหนืด และมีคุณสมบัติในการเคลือบผม

ใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืดในแชมพูสระผม

ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ที่ใช้แต่งหน้า เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น ความเรียบ ให้กับการแต่งหน้าได้นาน ๆ

รักษาผิว ทำเป็นโลชั่นโดยจะเป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ป้องกันไม่ให้ผิวแห้ง เพิ่มความเนียนนุ่ม และรักษาความสะอาดบนผิวหนัง

4.4 ด้านเกษตรกรรม (Mashavan,1986)

ไคตินสามารถเร่งการเจริญเติบโตในไก่กระทง เมื่อผสมไคตินลงในอาหารไก่ด้วยปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ จะทำให้มีอัตราการกินอาหารลดลง แต่กลับมีน้ำหนักหลังฆ่าเพิ่มขึ้นถึง 12 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงไก่ด้วยอาหารธรรมดา ผลที่ได้ คือ ผู้เลี้ยงไก่ได้กำไรเพิ่มขึ้นถึง 70 เปอร์เซนต์ การใช้ไคตินในอาหารไก่ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตนี้ เป็นการใช้ของเสียให้เป็นประโยชน์ได้อย่างเหมาะสม

สามารถนำไคตินไปใช้ในด้านการเกษตร คือ นำไปใช้ในการปรับปรุงดิน เพื่อให้มีคุณภาพดีขึ้นเหมาะแก่การเพาะปลูก

ใช้ผงของไคโตแซนโรยบริเวณรากของพืช ทำให้เกิดการแพร่กระจายของอากาศได้ดี ทำให้รากสามารถเจริญเติบโต ชอนไชได้ดีขึ้น

ใช้เป็นตัวปรับสภาพของดิน หรือเป็นปุ๋ย ทำให้ *Actinomycetes* มีปริมาณเพิ่มขึ้นแต่มีผลยับยั้งการเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Fusarium oxysporum* อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ เช่น alfarfa mosaic virus เป็นต้น

ไคตินและไคโตแซนสามารถกระตุ้นการสร้าง phytoalexin ของพืช เพื่อสร้างสารพวก phaseolin , pisitin หรือ เอนไซม์ไคติเนสขึ้นมาป้องกันตัวเอง โดยเอนไซม์ไคติเนสสามารถที่จะย่อยผนังเซลล์ของราได้

ใช้ผสมกับเมล็ดก่อนการเพาะปลูก จะมีผลทำให้ผลิตผลของพืชมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดที่ไม่มีการผสมก่อนการเพาะปลูก

การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* ถูกยับยั้งเมื่ออยู่ในอาหารที่ประกอบด้วยไคโตแซนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 %

4.5 ด้านอาหาร (Knorr,1991)

ใช้เป็นอาหารลดน้ำหนักเพราะไคโตแซนมีหมู่อะมิโนอิสระสามารถที่จะจับกับไขมันได้ทำให้เอนไซม์ในกระเพาะอาหารไม่สามารถที่จะย่อยไขมันได้ อีกทั้งไคโตแซนยังไม่ละลายด้วยกรดในกระเพาะอาหารทำให้สามารถที่จะขับถ่ายออกมาได้

4.6 ด้านอุตสาหกรรม (Muzarelli,1977)

ช่วยให้วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุมีคุณภาพที่ดีขึ้น โดยเฉพาะกล่องกระดาษที่ใช้ในการบรรจุกุ้งเยือกแข็ง

ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบรรจุลงได้อย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการบรรจุทั่วไปที่ใช้อยู่ เช่น การใช้กล่องกระดาษไขสำหรับปลาเยือกแข็งหรือกระดาษเคลือบมัน (glassine paper) สำหรับห่อเนย เป็นต้น

กำจัดสารปรอทในน้ำให้มีระดับต่ำกว่าระดับที่อนุญาติให้มีในน้ำดื่ม

ทำให้อนุภาคของสารโลหะฟอสฟอรัส (metallic phosphorus particle) ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำทิ้งจากโรงงานฟอสฟอรัสตกตะกอน

ช่วยทำให้เครื่องดื่มโดยเฉพาะไวน์ใส และยังยืดอายุการสุกของผลไม้ เช่น มะม่วง กล้วย โดยการนำไคโตแซนไปเคลือบที่ผิว เป็นการช่วยทำให้อายุการเก็บนานขึ้นด้วย

ไคโตแซนที่ขึ้นรูปเป็นเม็ด สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับถังหมักได้ เช่น เป็นตัวยึดเกาะสำหรับเอนไซม์และโปรตีน

เมื่อนำเอาไคโตแซนมาทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์ในสารละลายกรดอินทรีย์ จะสามารถขึ้นรูปเป็นเจลได้หลายแบบ ซึ่งปฏิกิริยานี้ได้นำไปใช้ในการจับเซลล์ หรืออวัยวะต่าง ๆ

จากความสำคัญของไคตินและไคโตแซนที่ได้กล่าวมา ในปัจจุบันไคตินและไคโตแซนกำลังอยู่ในความสนใจของนักวิจัย เพราะมีผู้พบประโยชน์อย่างมากมายทั้งในด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านอุตสาหกรรม ด้านเกษตรกรรม และอื่นๆ อีก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* สายพันธุ์ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อผลิตไคติน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อให้ได้น้ำหนักไคตินที่อยู่ในเซลล์แห้งสูง และศึกษาลักษณะบางอย่างของไคตินและไคโตแซนจากสายใยราที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการวิจัย

1.ศึกษาเปอร์เซนต์แป้งมันสำปะหลังสูงสุดที่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อนำแป้งที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.หาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* โดยการแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไวตามิน รวมทั้งสารอาหารอื่นๆ และภาวะในการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า

3.ขยายขนาดจากขวดเขย่า เพื่อศึกษาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเบื้องต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในถังหมัก

4.สกัดไคตินจากเซลล์แห้งของราโดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อกำจัดโปรตีน และ สกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเพื่อกำจัดแร่ธาตุต่าง ๆ และ กำจัดสีและไขมัน ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 %

5.เปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซนโดยวิธีการทางเคมี โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

6. ทำการตรวจสอบลักษณะของทั้งไคตินและไคโตแซน โดยตรวจสอบด้วยการใช้วิธีอินฟราเรด โดยใช้เครื่อง FT-IR (1760X-Perkin Elmer ,USA)