รายงานการวิจัย

"การผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล"

"Production of amino sugar food supplement from squid pen"

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

รศ.ดร. มงคล สุขวัฒนาสินทธิ์ (หัวหน้าโครงการ)

อ.ดร. อนวัช อาชวาคม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากแผนงานวิจัย "นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่" ประจำปีงบประมาณ 2551 ประเภทผลงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนต้นทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 40% และด้วยกรรมวิธีการทำให้บริสุทธิ์ที่พัฒนาแล้วสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์สูงถึง 100%

การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิคเพื่อให้ได้เกลือกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:1 (w/w) และที่อุณหภูมิ 40°C ได้ผลการย่อยที่มีประโยชน์และสามารถนำไปใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป ขณะนี้การทดลองของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นด้วยสภาวะต่างๆอยู่ในระหว่างการเก็บข้อมูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The degradation of squid pen by using enzymes of *Aspergillus fumigatus* and cloned bacteria *Serratia sp.* can be accomplished to specifically *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) and *N,N*-acetylchitobiose [$(GlcNAc)_2$]. Enzyme of *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) can degrade chitin (3% w/v) at 40°C, pH 3, for 2 days, to give GlcNAc in 72% yield. The degradation of chitin (3% w/v) by using enzymes from bacteria *Serratia sp* (1 U/1 g of chitin) at 37°C, pH 6, for 6 days, to produce both $(GlcNAc)_2$ and (GlcNAc) in 72% and 2.6% yields respectively. The purification of (GlcNAc) and $(GlcNAc)_2$ could be done by recrystallization following by either the activated charcoal decolorization or the activated charcoal column chromatography to obtain pure GlcNAc in 64% yield and pure $(GlcNAc)_2$ and 40% yield. And the %purity of both products is raised to 100% by using the developed purification method.

The degradation of chitin by using conc. HCl to obtain Glucosamine hydrochloride salt (GlcNHCl) can be accomplished with or without ultrasonication. The conditions is to use chitin to conc. HCl ratio 1:1 (w/w) and at 40°C the result was useful enough to further utilize in the next experimental step. The degradation by conc. HCl by varying conditions is under investigation.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
1.บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.1.1 การย่อยด้วยเอนไซม์	2
1.1.2 การย่อยด้วยกรด	4
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
1.3 วัตถุประสงค์	6
1.4 ขอบเขตการวิจัย	6
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	6
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2. เนื้อเรื่อง	7
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย	8
2.2 ผลการวิจัย	9
สรุปรายงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2550	9
รายงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2551	10
A) การย่อยด้วยเอนไซม์	10
B) การย่อยด้วยกรด	15
3. วิจารณ์ผลการทดลอง	17
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Column resolution between GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ at various amount of loading sugars	11
ตารางที่ 2 %purity and %isolated yield of purified products by using different purification method	13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
1. Chromatogram of activated charcoal column loading by 0.44 g of total GlcNAc and $(GlcNAc)_2$	10
2. Chromatograms of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ starting from diluted hydrolysate (250 mL) with starting sugars of 1.86 g/30 mL (a), 2.27 g/150 mL (b) and 2.58 g/300 mL (c)	12
3. Chromatogram of GlcNAc and (GlcNAc)2 from the hydrolysis of chitin by enzyme 5 U/1 g of chitin.	12
4. NMR spectrum of standard GlcNAc and precipitated GlcNAc (a) and standard (GlcNAc)2 and $(GlcNAc)_2$ purified by activated charcoal (b)	14
5. โฟลชาร์ตของปฏิกิริยาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริก	16
6. Yields of GlcNHCl from the hydrolysis α-chitin with conc. HCl compared sonicate and preheat and varies ratio of chitin/concHCl	16
7. Relative yields, MS signal intensity, of GlcNAc compared to chitooligosaccharides	17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

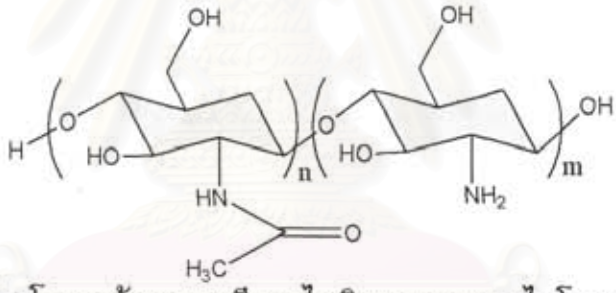
GlcNAc	*N*-Acetyl-*D*-glucosamine
$(GlcNAc)_2$	*N,N*-Acetylchitobiose
GlcNHCl	Glucosamine hydrochloride salt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HCl	Hydrochloric acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
U	Unit
g	Gram
mL	Milliliter
w/v	Weight by volume
w/w	Weight by weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โดยนิยามโครงสร้างเคมี ไคติน (chitin) หมายถึง poly(β-(1-4)-2-acetymido-2-deoxy-*D*-glucose) ซึ่งมีโครงสร้างของสายพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-acetamido-2-deoxy- *D* -glucose หรือ *N*-acetyl-*D*-glucosamine (GlcNAc) เป็นหน่วยซ้ำในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) หมายถึง poly(β-(1-4)-2-amido-2-deoxy- *D* -glucose) ที่มีน้ำตาล 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose หรือ *D* -glucosamine (GlcN) เป็นหน่วยซ้ำในสายโซ่พอลิเมอร์ อย่างไรก็ตามไคโตซานมักได้จากการทำปฏิกิริยาดีแอซิทิเลชั่น (deacetylation) ของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างน้ำตาล *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) และน้ำตาล *D* -glucosamine (GlcN) ในทางปฏิบัติไคตินจึงหมายถึง โคพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในสารละลายกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ *N*-acetyl- *D*-glucosamine (GlcNAc) (degree of acetylation) มากกว่า 50% และไคโตซานหมายถึงโคพอลิเมอร์ที่ละลายได้ในกรดเจือจางเนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของ *D* -glucosamine (GlcN) (degree of deacetylation) มากกว่า 50%



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน (n>m) และไคโตซาน (n<m)

เนื่องจากโครงสร้างของไคตินและไคโตซานมีหน่วยย่อยของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ไคตินและไคโตซานจึงสามารถถูกย่อยโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในที่สุด ได้มีรายงานการทำไฮโดรไลซิสของไคตินและไคโตซานอยู่ 2 ลักษณะด้วยกันคือ การใช้กรดหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในทางอุตสาหกรรมปัจจุบัน นิยมใช้วิธีการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) เนื่องจากเป็นกระบวนการผลิตที่ทำได้ค่อนข้างรวดเร็ว และใช้รีเอเจนต์ที่มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี[10] และการใช้เอนไซม์[11] ในส่วนของการใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบด้านการควบคุมปฏิกิริยาซึ่งทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงและมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย และในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของเอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา, แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่

แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่าง ๆ [12,13]

ในกรณีของกรรมวิธีการย่อยไคตินนั้น ถึงแม้ว่าตามทฤษฎีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะไกลโคซิดิกต้องการกรดเพียงเล็กน้อยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ในทางปฏิบัตินั้นต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ทั้งนี้เนื่องจากไคตินไม่ละลายในกรดเจือจางแต่สามารถละลายได้ในกรดหรือเบสเข้มข้น และมักใช้อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 95-100°C ในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดขึ้นเป็นเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทั้งพันธะไกลโคซิดิกและพันธะเอไมด์

คลื่นอัลตราโซนิคหมายถึง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่หูมนุษย์จะได้ยิน โดยทั่วไปแล้วหูของมนุษย์โดยเฉลี่ยจะได้ยินเสียงสูงถึงเพียงแค่ประมาณ 15 KHz เท่านั้น ดังนั้นโดยปกติแล้วคำว่าอัลตราโซนิคจึงมักจะหมายถึงคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป แต่ความถี่ที่ใช้ก็มักจะจำกัดอยู่เพียงไม่เกิน 50 KHz คลื่นอัลตราโซนิคเมื่อออกจากเครื่องกำเนิดหรือบางทีเราเรียกว่า "เครื่องโซนิเคเตอร์" แล้วสามารถถ่ายทอดพลังงานทางกลโดยการสั่นไปมากระจายไปในอากาศหรือของเหลวได้

ในกรณีที่โมเลกุลได้รับพลังงานของคลื่นอัลตราโซนิคแล้ว โมเลกุลจะดูดซับพลังงานที่ถ่ายทอดผ่านพาหะนั้น ๆและทำให้ตัวโมเลกุลเกิดการสั่นได้มากขึ้น และตรงนี้เองที่เราสามารถนำพลังงานที่ดูดซับไปช่วยในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆได้ เนื่องจากเมื่อโมเลกุลมีอัตราการสั่นตัวเพิ่มมากขึ้นเพราะฉะนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มตามไปด้วยเช่นเดียวกัน เพราะฉะนั้นในกรณีของปฏิกิริยาการย่อยไคตินถ้านำคลื่นอัลตราโซนิคมาใช้เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยในทุก ๆด้านซึ่งจะทำให้ต้นทุนในการผลิต GlcNAc และ GlcNHCl ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ

1.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยมีสองชนิดคือเอนไซม์ที่ได้จากราและเอนไซม์ที่ได้เชื้อแบคทีเรีย

a. ศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินที่ได้จากรา

ในปี 2002 Nopakarn Rattanakit และคณะ[14] ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp.S1-13 โดยการหมักแบบแห้งที่มีเปลือกกุ้งและเปลือกปูที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเป็นสารอาหาร และบ่มที่อุณหภูมิ 45°C และ pH 4 เป็นเวลา 11-13 วัน ได้ *N*-acetylglucosamine 33% จากไคตินเริ่มต้น

ในปี 2003 Krissana A.[15] ได้ทดสอบรา 5 สายพันธุ์ *Aspergillus fumigatus, Trichoderma viride, Trichoderma aureoviride, Trichoderma reesei* และ *Mucor sp.* สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน รา *Aspergillus fumigatus* สามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์ได้สูงที่สุด โดยให้แอคติวิตีสูงถึง 438 mU/ml เมื่อเลี้ยงด้วยคอลลอยดอลไคติน ที่อุณหภูมิ 40°C และมีปริมาณโปรตีนเป็น 1.70 mg/ml ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเบต้าไคตินโดยเอนไซม์ย่อยไคตินที่ผลิตจากรา *Aspergillus fumigatus* ให้ผลิตภัณฑ์เอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน มากกว่า 70 % ใน 1 วัน อัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อไคตินคือ 1-4 mU/mg ที่ความเข้มข้นของสับเสตรทเป็น 20 mg/mL ช่วงพีเอชที่เหมาะสมคือ 3-5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45°C ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีบัฟเฟอร์ซึ่งง่ายต่อการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ในระดับการผลิต

ในปี 2004 Parameswaran Binod และคณะ[16] ศึกษาการผลิตและการทำเอนไซม์ไคติเนสให้บริสุทธิ์ โดยทำการคัดเลือก *Penicillium* 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวสาลีผสมกับไคติน ซึ่งเป็นการหมักแบบแห้ง และคัดเลือก *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะการณ์ทำงานที่เหมาะสมที่พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 50°C ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้เท่ากับ 0.2 U/gds (gram dry substrate)

ในปี 2005 Laura Raminea – Coutiño และคณะ[17] ทำการคัดเลือกรา *Lecanicillium* sp. 15 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงแบบอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ พบว่า *Lecanicillium fungicola* ที่เลี้ยงที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 40°C สามารถผลิต endochitinase และ *N*-acetylhexosaminidase ได้แอคติวิตี้เท่ากับ 747 และ 410 U/mg ตามลำดับ

ในปี 2005 Patidar และคณะ[18] ทำการแยกรา *Aspergillus flavus* 15 สายพันธุ์ *Aspergillus niger* 6 สายพันธุ์ และ *Penicillium chrysogenum* ซึ่งทำการแยกจากดิน ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจาก *P. chrysogenum* , PPCS 1 และ PPCS 2 ที่สภาวะการหมักแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 40°C พีเอช 4 โดยที่ PPCS 1 ได้ไคติเนสแอคติวิตี้ 3809 U/g ของไคตินเริ่มต้น และ PPCS 2 ได้ 2516 U/g ของไคตินเริ่มต้น

b. การศึกษาวิจัยการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินจากเชื้อแบคทีเรีย

ในปี 2001 Gemma Reguera และ Susan Leschine[19] ทำการศึกษาแบคทีเรีย *Cellulomonas* sp. 8 สายพันธุ์, *clostridium sp. 12 สายพันธุ์, Acetivibrio cellullolyticus, bacteroides cellulosolvens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ ที่สามารถย่อยไคตินได้ โดยแยกแบคทีเรียจากดินได้ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ และเลือก *Cellulomonas uda* มาทำการเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลสกับไคตินและการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิด

ในปี 2002 Rath Pichyangkura และคณะ[20] ได้ทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคตินด้วยเอนไซม์ chitinase (EC 3.2.1.14) and β-*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) เพื่อทำการผลิต 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose (GlcNAc) โดยใช้ crude chitinase จากแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* TU09 และ *Bacillus licheniformis* SK-1 ในการย่อยผงแอลฟาและเบต้าไคติน พบว่า chitinase จาก *B. cepacia* TU09 ให้ผลผลิต GlcNAc มากกว่า 85 % จากเบต้าไคตินใน 1 วัน และจากแอลฟาไคตินใน 7 วัน และ chitinase จาก *B. licheniformis* SK-1 ย่อยเบต้าไคตินได้หมดภายใน 6 วัน ได้ GlcNAc 75 % กับ 20% ของ $(GlcNAc)_2$ และจากแอลฟาไคตินได้ 41% ของ GlcNAc

ในปี 2003 M.Gómez Ramirez และคณะ[21] ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย wild type 150 สายพันธุ์ ซึ่งเลือก *Serratia marcescens* Wf ซึ่งผลิตเอนไซม์สูงสุด และ *B. thuringiensis* Bt-8 ซึ่งผลิตเอนไซม์ต่ำสุด มาทำการทดสอบการย่อยไคติน โดยใช้เทคนิคการย้อมสี colloidal chitin ด้วย Remazal Brilliant Blue R® เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว โดยเมื่อ colloidal chitin ถูกย่อยจะปล่อยสีที่สามารถวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 595 นาโนเมตร

ในปี 2004 Purwani Yuli และคณะ[22] ศึกษาผลของการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำพุร้อน Tompaso ทางเหนือของประเทศอินโดนีเซีย พบว่า *Bacillus* sp.13.26 สามารถเจริญได้บนอาหารที่

มีไคติน 0.5% ที่อุณหภูมิ 55°C และผลิตเอนไซม์ไคติเนสหลังจากผ่านไป 72 ชั่วโมง โดยเอนไซม์นี้จะมีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง มีแอคติวิตี้ 420 U/mg protein

ในปี 2004 Ju Hee Kuk และคณะ[23] ได้ทำการแยก *Aeromonas* sp. GJ-18 จากดิน และใช้ในการเตรียมเอนไซม์ ซึ่งมีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *N*-acetyl-D-glucosaminidase และ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ทำงานที่อุณหภูมิต่างกัน โดย *N*-acetyl-D-glucosaminidase จะผลิตให้ 74% ของ GlcNAc ที่อุณหภูมิ 45°C ใน 5 วัน และ *N,N'*-diacetylchitobio hydrolase จะผลิตให้ 35% ของ $(GlcNAc)_2$ ที่อุณหภูมิ 55°C ใน 5 วัน และในปีถัดมา Ju Hee Kuk และคณะ[24] ได้ต่อยอดการพัฒนาการย่อยไคติน ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น *N,N'*-diacetylchitobiose โดยการควบคุมอัตราส่วนของ β-*N*-acetylglucosaminidase ต่อ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase activities ในการเตรียม crude enzyme ของ *Aeromonas* sp. GJ-18 เมื่อบ่มอุณหภูมิที่ 50°C β-*N*-acetylglucosaminidase จะเสียสภาพ ในขณะที่ *N,N'*-diacetylchitobiohydrolase ยังคงมี activity อยู่ หลังจากย่อย swollen แอลฟาไคติน และผงเบต้าไคติน 7 วัน ได้ $(GlcNAc)_2$ 78.9 และ 56.6% ตามลำดับ

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเป็นแท่งยาว มีแฟลกเจลาที่ขั้ว เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งแบบมีอากาศและแบบไม่มีอากาศ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C พบทั่วไปในน้ำจืด มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ 2 ชนิด ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ *N*-acetylhexosaminidase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 37°C ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาล*เอ็น*-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *N,N'*-diacetylchitobio-hydrolase ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 50°C ได้*เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 จากดินในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำการย่อยแอลฟาและเบต้าไคติน ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้น้ำตาลเอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และเพิ่มขนาดการผลิตน้ำตาลแอมิโนโดยใช้ไคติน 100 กรัม ทำการแยกผลิตภัณฑ์น้ำตาล*เอ็น*-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และ *เอ็น,เอ็น*-ไดแอซิทิล-ดี-กลูโคซามีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งความแตกต่างจากงานวิจัยของ Ju Hee Kuk และคณะ จะอยู่ที่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย สเกลในการผลิต และการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

1.1.2) การย่อยด้วยกรด

รายงานการเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคตินด้วยกรด ปรากฏขึ้นครั้งแรกตั้งแต่ปี 1946 โดย Purchase และ Braun[25] ได้ทำการย่อยไคตินขนาด 20 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 116 กรัม ที่อุณหภูม 100°C เป็นเวลา 150 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมน้ำ 100 กรัม และผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 2 กรัม กวนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาส่วนใสมาระเหยภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 50°C ได้เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% และทำให้แห้งแล้วได้ผลิตภัณฑ์ 67.5% ที่มีความบริสุทธิ์ 95.31%

ในปี 1997 Novikov และ Ivanov[26] ได้เตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคติน 100 กรัม ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 200 กรัม ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นตั้งสารละลายที่ได้จากการย่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดผลึกเกลือกลู

โคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) นำมากรองและล้างสีเหลืองของผลึกด้วยเอทานอล 194 กรัม ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 100% จากการไทเทรตด้วยเบส

ในปี 2002 Gandhi และ Laidlhi[27] ได้เตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) จากการย่อยไคตินขนาด 20 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยใช้สัดส่วนของไคตินต่อกรดเป็น 1:2 (W:W) โดยจะมีการให้ความร้อนแก่กรดจนกระทั่งอุณหภูมิถึง 65°C แล้วจึงเติมไคติน และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95°C หลังจากนั้น 75 นาที ตั้งสารละลายให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง กรองตะกอนที่เกิดขึ้น นำมาละลายน้ำและเติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) กรองเอาส่วนที่ไสมาระเหยจนแห้งเหลือผลึกเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งเมื่อล้างด้วยเอทานอล 95% ได้ผลิตภัณฑ์ 70% ที่มีความบริสุทธิ์ 100%

ในปี 2004 Novikov[28] ได้ศึกษาการย่อยไคตินและไคโตซานด้วยกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 50°C และ 70°C พบว่ากลไกของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะ *N*-acetyl และพันธะ glycosidic ต่างกัน คือพันธะ *N*-acetyl เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_N2 ส่วนพันธะ glycosidic นั้นเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกลไก S_N1 โดย rate-determining step เกิดจากการที่โมเลกุลน้ำเข้าทำที่ carbocation ซึ่งอัตราเร็วขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำ

จากการรายงานที่ได้อธิบายมาขั้นต้นยังไม่มีการใช้โซนิเคเตอร์มาช่วยในการย่อยไคตินด้วยกรดแต่อย่างใด เพราะฉะนั้นถ้าเราสามารถนำเอาโซนิเคเตอร์มาช่วยในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไคตินด้วยกรดเพื่อใช้ในการเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว *เอ็น*-แอซีทิล-*ดี*-กลูโคซามีน (GlcNAc) เราคาดหวังว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไคตินด้วยกรดดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และหาสภาวะที่เหมาะสมที่ควบคุมการย่อยให้เกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว *เอ็น*-แอซีทิล-*ดี*-กลูโคซามีน (GlcNAc)

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไคตินและไคโตซานเป็นสารที่มีมากในเปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ไม่มากเท่าที่ควร ถึงแม้ประเทศไทยได้มีการผลิตไคตินและไคโตซานจากของเหลือทิ้งเหล่านี้มาเป็นเวลาพอสมควร แต่การผลิตยังถือว่ามีปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณของเหลือทิ้ง นอกจากนี้ไคโตซานที่ผลิตได้มักจะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาต่ำ การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากไคตินให้มีมูลค่าสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น

ไคติน (chitin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีคือ poly(β-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose) หรือเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลักในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ดังนั้นไคโตซานจึงประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่เป็น poly(β-(1-4)-2-amino-2-deoxy- *D*-glucose) หรือดี-กลูโคซามีน (*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลัก ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเซลลูโลส แตกต่างกันที่หมู่แทนที่บนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลสโดยหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ของเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิลแต่ของไคตินเป็นหมู่อะซิทาไมด์ (NHAc) ส่วนไคโตซานเป็นหมู่อะมิโน (NH_2)

ไคติน-ไคโตซานที่ผลิตขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาถูก (กิโลกรัมละ 400-1000 บาท) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งให้กลายเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่มั่นคงและยั่งยืน เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ขายในรูปสารเคมีปัจจุบันมีราคากว่า 57,700 บาท/กิโลกรัม ส่วนไดเมอร์ของไคตินคือ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส มีราคาสูงกว่า 900,000 บาท/กรัม และโอลิโกเมอร์ที่มีขนาด 3-7 หน่วยนั้นมีราคาสูงขึ้นไปอีกตามลำดับ[1] ซึ่งสารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนผสมหลักในยารักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส (osteoarthritis)[2] โครงการวิจัยนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปรรูปวัถตุดิบคือไคติน และไคโตซานให้เป็นสารเคมีโมเลกุลขนาดเล็กลงที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่มีราคาสูงขึ้น

ในงานวิจัยเบื้องต้นของเราพบว่าเอนไซม์จาก *Burkoderia cepacia* สามารถใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน จาก ไคติน มากกว่า 90% ในเวลา 1 วัน โดยอัตราค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการจะอยู่ที่ประมาณ 800-1,500 บาท/กิโลกรัม และถ้าขยายขนาดการผลิตก็จะสามารถลดราคาการผลิตต่อกิโลกรัมลงอย่างมีนัยสำคัญได้อีก อย่างไรก็ตามจุดเด่นของการวิจัยนี้ไม่ได้อยู่ที่ต้นทุนการผลิตต่ำแต่เพียงอย่างเดียว แต่อยู่ที่ความปลอดภัยและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีมากกว่าวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีซึ่งมีกระบวนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 ศึกษาการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

1.3.1 ศึกษาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาหาเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาล เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และไดแอซิทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] พร้อมทั้งการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยไคตินให้เป็นผลิตภัณฑ์เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดยมีคลื่นอัลตราโซนิกเป็นตัวช่วย

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

-แบ่งแนวทางวิธีดำเนินการวิจัยเป็นสองทางคือ

1.5.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

1.5.2) การย่อยด้วยกรด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือภาคอุตสาหกรรมทางด้านการแปรรูปอาหารทะเล

2. เนื้อเรื่อง

น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) และไคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Chitooligo-sacchride) เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กที่ได้จากการตัดสายไคตินและไคโตซานซึ่งมีความสำคัญทางชีวภาพสำหรับทั้งสัตว์และพืช จึงได้มีการศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านเภสัชกรรมและเกษตรกรรม[20] เช่น ช่วยรักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส[2]นี้ ช่วยทำให้ภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมีประสิทธิภาพมากขึ้น[21] เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย[22] เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์หลายประเภทในร่างกายรวมทั้งยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกภายในร่างกาย[23] และต่อต้านศัตรูพืชที่มารบกวนได้อีกด้วย[24, 25] น้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ยังใช้สังเคราะห์ต่อเป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ ของยาเพราะเชื่อว่าจะทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น[26]

ในการตัดสายไคตินและไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ สามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี[27] และการใช้เอนไซม์[28] แต่การใช้เอนไซม์นั้นจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีการทางเคมีหลายประการ เช่น การควบคุมปฏิกิริยานั้นทำได้ค่อนข้างง่าย ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงและมีปฏิกิริยาข้างเคียงน้อย

ในหลายปีที่ผ่านมา มีผู้วิจัยศึกษาฤทธิ์ในการย่อยไคตินของเอนไซม์หลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากรา แบคทีเรียหรือเอนไซม์จากพืช ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการย่อยที่แตกต่างกันออกไปและได้ผลิตภัณฑ์ทั้งที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ขนาดต่าง ๆ[4, 29]

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอสจากการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดคือ เอนไซม์ดิบจากราแอสเพอร์จิลลัส ฟูมิเกทัส (*Aspergillus fumigatus*) เอนไซม์ไค60 (Chi60) จากแบคทีเรียในเซอร์ราเทียสปีชีส์ (*Serratia sp.*) และเอนไซม์จากซีรัมน้ำยางที่มีชื่อว่า เฮวา บราซิลเลียนซิส(*Hevea brasiliensis*) โดยศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและทำการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

มีคณะผู้วิจัยหลายคณะได้ศึกษาถึงการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากไคติน เนื่องจากสารเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งทางการแพทย์ เภสัชกรรมและเกษตรกรรม แต่ในปัจจุบันการผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้มาจากการนำไคตินและไคโตซานมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดหรือด่าง แต่กระบวนการเหล่านี้ต้องอาศัยสภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง ความดันสูง และปฏิกิริยามักจะมีความจำเพาะต่ำ ให้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์น้อย อีกทั้งยังต้องมีกระบวนการในการกำจัดกรดหรือสารที่ใช้เร่งปฏิกิริยาก่อนนำมาใช้ และของเสียจากกระบวนการผลิตนี้สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้ตัดสายไคตินและไคโตซาน เพราะสามารถทำได้ง่าย ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาการตัดได้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูง มีของเสียที่เกิดจากการผลิตต่ำและมีความเป็นพิษน้อย

เราสามารถพบเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยไคตินและไคโตซานในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น มนุษย์, สัตว์ (เช่น กุ้ง, ปู, แมลงต่างๆ), พืช (เช่น ข้าว, ใบยาสูบ, ยางพารา, มันเทศ และถั่วต่างๆ) และจุลินทรีย์ โดยสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ใช้เอนไซม์เพื่อประโยชน์ในการดำรงชีพต่างๆ กัน เช่น ในการลอกคราบหรือแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต การย่อยอาหารและการทำลายศัตรูหรือสิ่งมีชีวิตที่มารุกราน เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีสามกลุ่มใหญ่คือ ไคทิเนส (chitinase), เฮกโซซามินิเดส (hexosaminidase) และ ไคโตซานเนส (chitosanase) โดยที่เอนไซม์แต่ละกลุ่มจะมีสมบัติและการทำงานที่แตกต่างกันออกไปดังนี้

1. ไคทิเนส (chitinase: EC 3.2.1.14, glycohydrolase family 18 และ 19) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน, เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส (N,N'-diacetylchitobiose) หรือเอ็น-แอซีทิลไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดที่จำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ โดยเอนไซม์ไคทิเนสนี้ถูกแบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ แฟมิลี่ 18 และ 19 ซึ่งแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาและโครงสร้างของเอนไซม์

2. เฮกโซซามินิเดส หรือ ไคโตไบเอส (hexosaminidase หรือ chitobiase: EC 3.2.1.52, glycohydrolase family 3 และ 20) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดไคตินจากบริเวณปลายสายเท่านั้น หรือเร่งปฏิกิริยาการตัดไคโตไบโอสแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนสองโมเลกุล

3. ไคโตซานเนส (chitosanase: EC 3.2.2.132, glycosylhydrolase family 46) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดสารไคโตซานโดยจะไม่ตัดสายไคตินและให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคซามีนหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ของ กลูโคซามีน

กลุ่มวิจัยของเราเองก็ได้ทำการศึกษาทางด้านนี้มาพอสมควรและเคยได้รับทุนสนับสนุนจากทางมูลนิธิโทเร และปัจจุบันจากสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุแห่งชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในระดับห้องปฏิบัติทางด้านนี้ 4 บทความ ในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา เราจึงมีความสนใจที่จะขยายขอบเขตและพัฒนางานวิจัยนี้ให้สามารถพัฒนาไปสู่การใช้จริงในอุตสาหกรรมได้ในที่สุด

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตน้ำตาลแอมิโนจากการย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ดิบจากราแอสเพอร์จิลลัส ฟูมิเกทัส (*Aspergillus fumigatus*) และเอนไซม์ไค60 (Chi60) จากแบคทีเรียในเซอร์ราเทียสปีชีส์ (*Serratia sp.*) โดยศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและทำการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมในปฏิกิริยา

2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)

2.1.1) การย่อยด้วยเอนไซม์

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. จัดหาสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็น
c. นำ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 ที่คัดเลือกสายพันธุ์แล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ จากดร. รัฐ พิชญางกูร ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปศึกษาต่อ และเก็บเป็น stock เชื้อ

d. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 หาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก เช่น
   - การใช้แอลฟาและเบต้าไคตินที่ระดับ 0.5, 1, 1.5 และ 2% เป็นแหล่งคาร์บอน
   - อุณหภูมิที่ 30 – 50°C

e. หาสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยของเอนไซม์
   - อุณหภูมิที่เหมาะสมแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ 30 – 45°C และ 45 - 60°C
   - พีเอชที่เหมาะสมโดยศึกษาในช่วง pH 3.5 - 8

f. ย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแอมิโนโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ โดยใช้วิธีการหมักแบบครั้งเดียว, แบบกึ่งต่อเนื่อง และแบบต่อเนื่อง

g. ทำการแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้บริสุทธิ์

h. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนเขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือ จดสิทธิบัตร

2.1.2) *การย่อยด้วยกรด*

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

b. จัดหาสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็น

c. ศึกษาการย่อยไคตินจากเปลือกกุ้งบดขนาด 200 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12 M) ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้โซนิเคเตอร์ช่วย

d. ทำการแยกผลิตภัณฑ์เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) พร้อมทั้งคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เปรียบเทียบกับการย่อยโดยไม่ใช้คลื่นโซนิเคเตอร์

e. หา activity ของการย่อยโดยใช้ โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

f. ศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างปริมาณไคตินกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่มีต่อเปอร์เซ็นต์ผลผลิตแบบใช้โซนิเคเตอร์

g. หาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อย

h. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วย HPLC

i. แยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วย การตกตะกอน หรือโครมาโทกราฟฟี

j. เขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือ จดสิทธิบัตร

สถานที่ทำการทดลอง ณ ชั้น 13 ตึกมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ผลการวิจัย

<u>สรุปรายงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2550 มีรายละเอียดดังนี้</u>

ได้ศึกษาการเตรียมสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็นโดยทำการเตรียมแกนปลาหมึกที่บดแล้วมาเตรียมคอลลอยด์ไคตินโดยทำการเตรียมในสภาวะที่เป็นกรดจะได้สเลอร์รีสีขาว นำคอลลอยด์ไคตินที่เตรียมมาหา activity ของเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* การ

ตกตะกอน GlcNAc ออกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเลือกใช้น้ำ-เอทานอลเพื่อใช้ในระบบ ตั้งแต่การตกตะกอนตกผลิตภัณฑ์ออกมาที่มีสีเหลืองอ่อนและมีความบริสุทธิ์ 90% ซึ่งเป็นผลที่ไม่น่าพอใจ การกำจัดสี (decolorization) จึงเป็นวิธีที่ช่วยส่งเสริมและปรับปรุงความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งผลเราสามารถสรุปผลการวิจัยได้ว่าการย่อยไคตินจากแกนหมึกให้ผลิตภัณฑ์เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 40%

ต่อไปเป็นรายงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้วในปี 2551 มีรายละเอียดดังนี้

A การย่อยด้วยเอนไซม์

การวิจัยขั้นต่อไปเป็นการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์นั้นมีหลายปัจจัยที่ต้องปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และสามารถแยกทั้ง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ได้ดีขึ้นดังต่อไปนี้

1) Loading capacity of the activated charcoal column

การผันผวนของจำนวน Crude product จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ถูกนำผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ 60 กรัม โครมาโตแกรมแสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด1.86 กรัม สามารถแยก ระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ได้ดีดังที่ได้รายงานในครั้งที่แล้ว โดยมี R (retention time) = 1.7 ซึ่งหมายความว่าการแยกสามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากการทำให้แห้งของแต่ละส่วนรวมกันของ $(GlcNAc)_2$ น้ำตาลที่ได้มาเป็นของแข็งสีขาวและมีความบริสุทธิ์สูง

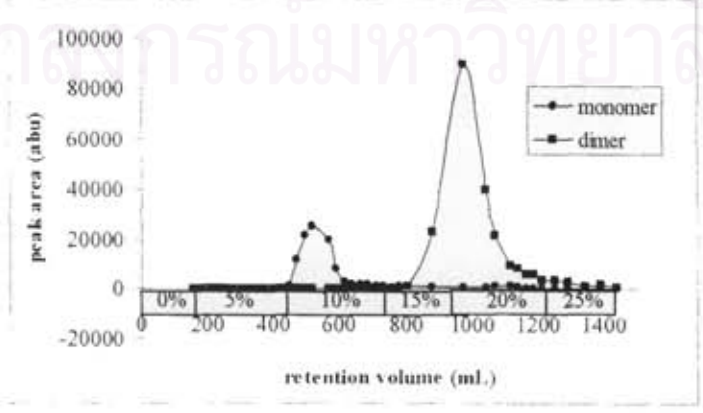


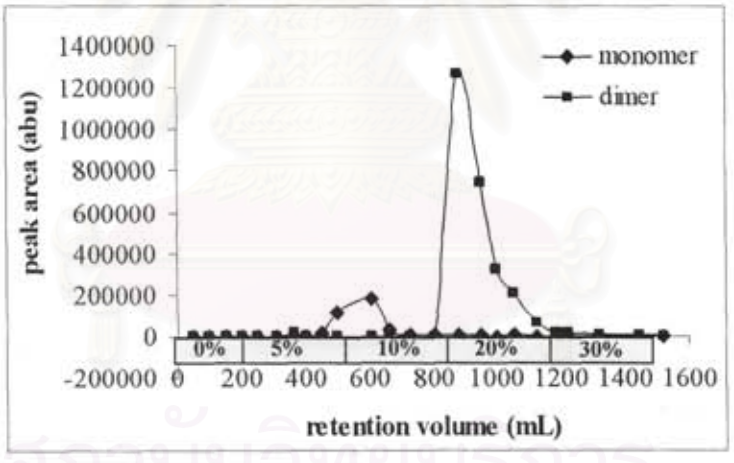
Figure 1 Chromatogram of activated charcoal column loading by 0.44 g of total GlcNAc and $(GlcNAc)_2$.

Table 1 Column resolution between GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ at various amount of loading sugars

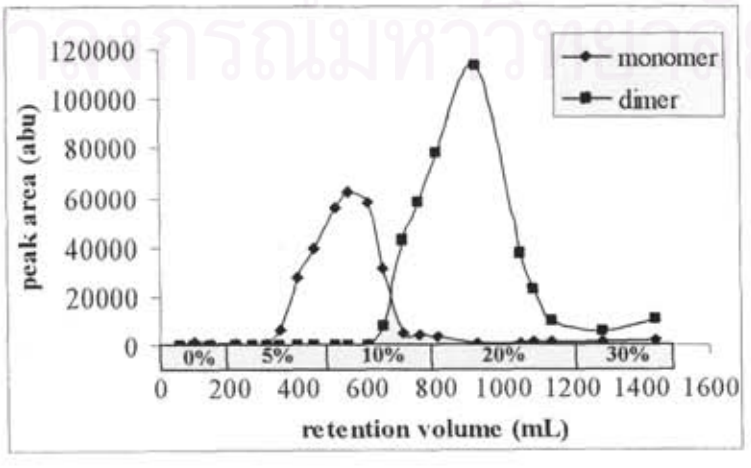
GlcNAc+$(GlcNAc)_2$ Weight (g)	$(GlcNAc)_2$ obtained (g)	R	% purity determined by HPLC
0.44	0.37	1.8	98
0.89	0.85	3.2	100
1.86	1.63	1.7	90

2) Effect of loading volume of the sugar solution

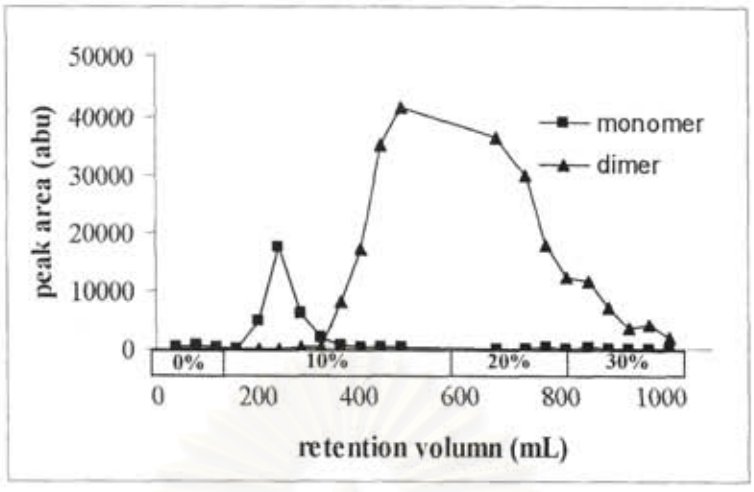
สำหรับในการผลิต $(GlcNAc)_2$ ในสเกลใหญ่นำไคตินที่ถูกย่อยแล้ว (~150, 300 mL) จากเอนไซม์โดยตรงเติมลงไปโดยผ่านคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ คอลัมน์จากโครมาโตแกรม แสดงให้เห็นว่าการแยกระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ สามารถทำได้โดยตรงโดยที่ crude hydrolysate จากที่ย่อยด้วยเอนไซม์โดยไม่ต้องผ่านการทำให้แห้งก่อน (**Figure 2**) น้ำตาลที่เติมลงไปทั้งหมดจะลดลงกว่า 2 กรัม



(a)



(b)



(c)

Figure 2 Chromatograms of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ starting from diluted hydrolysate (250 mL) with starting sugars of 1.86 g/30 mL (a), 2.27 g/150 mL (b) and 2.58 g/300 mL (c)

3) Effect of enzyme/chitin ratio to the product yield

เพื่อเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ $(GlcNAc)_2$ ไคตินถูกย่อยโดยการใช้เอนไซม์ 5 U/1g ของไคตินที่มีปริมาตรในปฏิกิริยาทั้งหมดเท่ากับ 300 มิลลิลิตร หลังจากการย่อยเป็นเวลา 6 วัน ส่วนที่ถูกย่อยแล้ว (150 mL จากทั้งหมด 250 mL) ถูกเติมลงไปในผงถ่านกัมมันต์คอลัมน์ ผลการทดลองแสดงว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น $(GlcNAc)_2$ (2.07 g) จาก 150 mL ของส่วนที่ถูกย่อยแล้ว สามารถคำนวณได้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ซึ่งเท่ากับ 40 และมีความบริสุทธิ์ 100% (**Figure 3**) ทั้งนี้ทั้งนั้นยังมีบางส่วนของโมโนเมอร์ และไดเมอร์ในกรณีนี้ผสมกันไม่สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์อยู่บ้างดังจะเห็นได้จากพีคโครมาโตกรัม (**Figure 3**) ซึ่งเป็นสาเหตุที่เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ลดต่ำลงไปบ้าง อนึ่งผลที่ได้นี้เป็นผลที่ดีที่สุดหลังจากมีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อปริมาณของไคติน

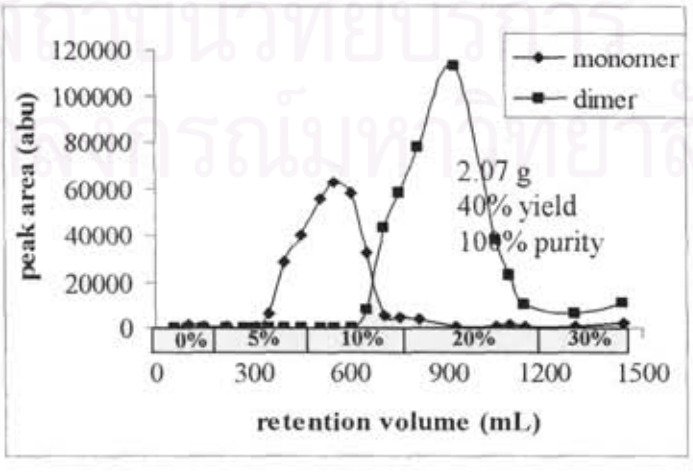


Figure 3 Chromatogram of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ from the hydrolysis of chitin by enzyme 5 U/1 g of chitin.

4) Purity analysis of sugar

ความบริสุทธิ์ของน้ำตาล GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ถูกวัดด้วยการใช้ 2 เทคนิค คือ high performance liquid chromatography (HPLC) และ nuclear magnetic resonance (NMR) การใช้เทคนิค HPLC หาปริมาณน้ำตาลที่โดยคำนวณเทียบกับเส้น calibration ของน้ำตาลมาตรฐานและ หาความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ คำนวณตามสมการ โดย calculated weight หมายถึงน้ำหนักจริงของน้ำตาลที่แยกได้ exact weight หมายถึงน้ำหนักของน้ำตาลที่เริ่มต้น

$$\% \text{ purity} = \frac{\text{calculated weight} \times 100}{\text{exact weight}}$$

การวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า GlcNAc ที่แยกออกมาได้จากการตกตะกอนด้วยเอทานอลจากสารละลายที่มีความเข้มข้นมากๆ ให้ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ถึง 90% ความบริสุทธิ์สามารถที่จะปรับปรุงได้จนถึง 100% โดยวิธีกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์แต่ผลิตภัณฑ์บางส่วนหายไป การแยกของ $(GlcNAc)_2$ โดยผงถ่านกัมมันต์คอลัมน์ด้วยน้ำหนักน้ำตาลที่เหมาะสมและระบบการชะที่ให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ 100% (**Table 2**)

Table 2 % purity and % isolated yield of purified products by using different purification method

Method of purification	product	% purity	% isolated yield
Precipitation	GlcNAc	90	71
Precipitation + decolorization	GlcNAc	99	64
Activated charcoal column	$(GlcNAc)_2$	100	40

การวัดหาความบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค ^{1}H NMR นั้นโดยการเปรียบเทียบสเปคตรัม ^{1}H NMR ของสารมาตรฐานกับผลิตภัณฑ์ที่เราทำแยกได้ สเปคตรัมของ GlcNAc ที่ได้มาจากการตกตะกอนต่อด้วยการกำจัดสีถูกพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ด้วย GlcNAc มาตรฐาน (**Figure 4 a**) ในกรณีของ $(GlcNAc)_2$ ที่แยกออกมาโดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบผงถ่านกัมมันต์นั้นพบว่าสัญญาณเล็กๆที่ประมาณ 1.0, 1.8, 2.1 และ 3.0 ppm นั้นเป็นสัญญาณของสิ่งเจือปน แต่เมื่อยกเว้นสัญญาณดังกล่าวพบว่าสัญญาณทั้งหมดพิสูจน์ได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่แยกมาได้มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อเทียบกับ $(GlcNAc)_2$ มาตรฐาน

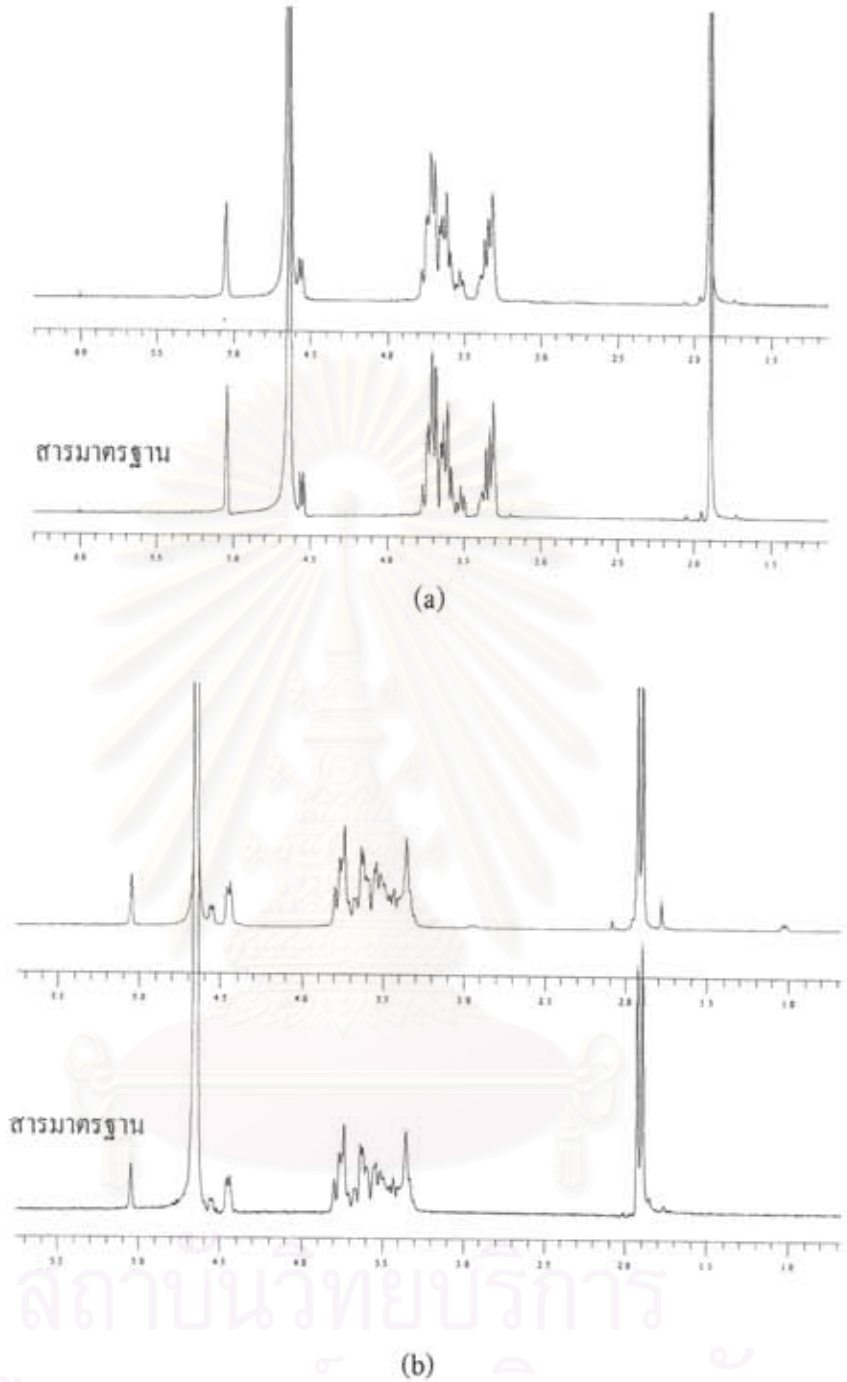


Figure 4 NMR spectrum of standard GlcNAc and precipitated GlcNAc (a) and standard $(GlcNAc)_2$ and $(GlcNAc)_2$ purified by activated charcoal (b)

B การย่อยด้วยกรด

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นนั้น ได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นในอัตราส่วนที่ต่างกัน และพร้อมที่จะเริ่มทำการทดลองการย่อยด้วยคลื่นอัลตราโซนิคดังต่อไปนี้ เครื่องคลื่นอัลตราโซนิค หรือเครื่องโซนิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองคือ Ultrasonic bath (ของบริษัท Elmasonic S30H, 50/60 Hz) ซึ่งจะบรรจุน้ำแบบไม่มีประจุ โดยจะทำการละลายไคตินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนแล้วด้วยเครื่องคลื่นอัลตราโซนิคดังกล่าวต่อด้วย

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นนั้น ซึ่งจากสมมุติฐานถ้าใช้คลื่นอัลตราโซนิกคาดว่าจะสามารถย่อยได้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าและใช้เวลาที่สั้นลงอีกด้วย ทั้งยังคาดว่าผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการย่อยนี้น่าจะเป็นน้ำตาล GlcNAc จากสมมุติฐานดังกล่าวเราจึงได้วางแผนการทดลอง ซึ่งได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นในอัตราส่วนที่ต่างกันแล้ว และเครื่องคลื่นอัลตราโซนิค หรือเครื่องโซนิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองการย่อยในครั้งนี้คือ Ultrasonic bath (ของบริษัท Elmasonic S30H, 50/60 Hz) ซึ่งจะบรรจุน้ำแบบไม่มีประจุ โดยจะทำการละลายไคตินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นก่อนแล้วด้วยเครื่องคลื่นอัลตราโซนิคดังกล่าวต่อด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยการแปรตามเวลาในการใช้คลื่นอัลตราโซนิค, ความเข้มข้นของสารละลาย และปริมาณกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นต้น โดยสภาวะที่ได้ศึกษาไปแล้วก็มีในส่วนของอุณหภูมิ และอัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (w/w) รวมทั้งการหา activity ของกรดไฮโดรคลอริกโดยการวัดปริมาณ reducing sugar ที่เกิดขึ้นจากการย่อยตามลำดับ

ตามปฏิกิริยาการย่อยโดยทั่วไป ละลายไคตินในกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่อุณหภูมิที่กำหนดขึ้นพร้อมทั้งเปรียบเทียบการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิก (**Figure 5**) หลังจากไคตินละลายหมด ให้ความร้อนเพิ่มแก่ของผสมในปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิและเวลาที่กำหนดขึ้นทำให้ได้ของผสมสีน้ำตาล หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำของผสมมากรอง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายน้ำและกำจัดสีออกด้วยผงถ่านกัมมันต์ ณ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองเก็บส่วนใสมาระเหยจนแห้ง จนได้ของแข็งสีเหลืองอ่อน เติม 95%เอทานอล, กวน, กรองส่วนตะกอน และทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ จะได้ของแข็งสีขาว (solid 1) นำส่วนใสที่ได้จากการกรองมาปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยการกรองผ่านผงโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) แล้วมาทำให้เข้มข้นด้วยการระเหย โดยใช้เครื่องโรตารี อีแวปโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ให้ปริมาตรลดลงเหลือ 1/3 ของปริมาตรเดิมแล้วจึงนำไปหยดลงในเอทานอล แยกตะกอนออกจากสารละลายขาวขุ่นที่ได้ด้วยการเซนตริฟิวส์ และนำตะกอนไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศ (solid 2) นำส่วนใสที่แยกจากการเซนตริฟิวส์มาระเหยจนปริมาตรลดลง 1/3 ของปริมาตรเดิมอีกครั้งแล้วหยดลงในเอทานอลทำให้ได้ตะกอนสีขาว (solid 3) ส่วนใสที่แยกออกมาทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศจนได้ของแข็ง (solid 4) ซึ่งความบริสุทธิ์ที่ได้จะแตกต่างกัน ทั้งนี้ทั้งนั้นยังคงต้องพัฒนากรรมวิธีการในการพิสูจน์สารด้วย HPLC ต่อไป

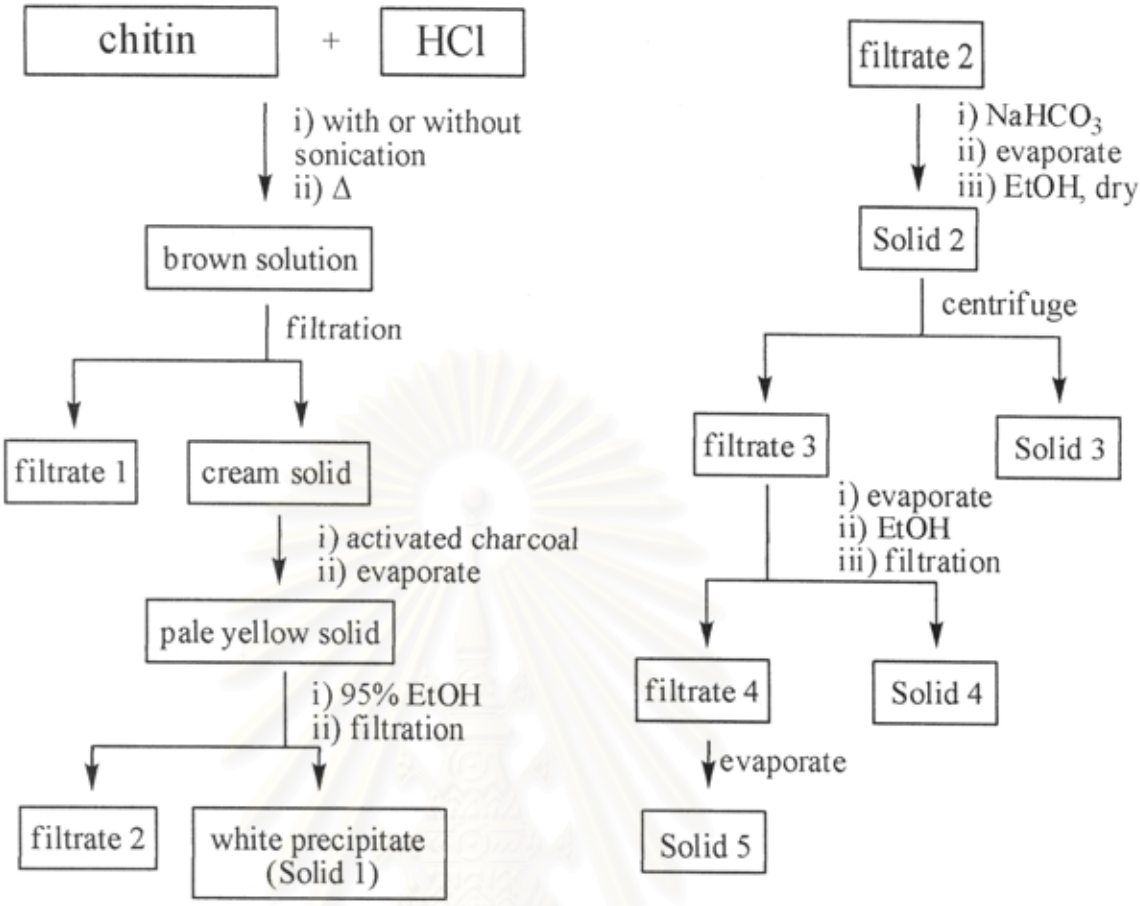


Figure 5. โฟลชาร์ตของปฏิกิริยาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริก

จากผลการทดลองในส่วนที่เกี่ยวกับการย่อย ณ อุณหภูมิ 90°C ของแอลฟา-ไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการละลายไคตินโดยการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกพบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยในการละลายไคตินได้เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ GlcNHCl สูงกว่าการให้ความร้อนโดยไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิก (**Figure 6**) และปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นเท่าไรก็ยิ่งสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้นเท่านั้นทั้งในกรณีของการละลายโดยใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วย โดยที่อัตราส่วนไคติน / กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เท่ากับ 0.2 จะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์มากที่สุดถึง 80% และต่ำที่สุด (43%) ที่อัตราส่วน 1 / 1

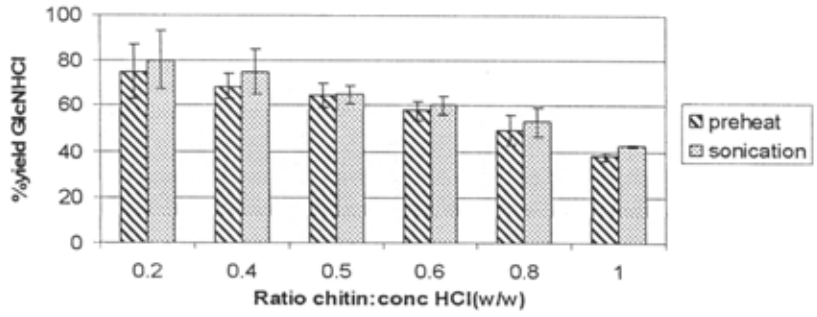


Figure 6. Yields of GlcNHCl from the hydrolysis α-chitin with conc. HCl compared sonicate and preheat and varies ratio of chitin/conc. HCl

ณ อุณหภูมิการย่อยที่ 40°C โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยในการย่อยไคตินที่อุณหภูมิต่ำ ความสัมพันธ์ของปริมาณ GlcNAc เพิ่มในระหว่างช่วง 4 ชั่วโมงแรก (**Figure 7**) และปริมารไคโตโอลิโอแซคคาไลด์บ่งบอกถึงการย่อยของพันธะไกลโคซิดิก เมื่อเวลาการย่อยติดต่อกันมากกว่า 4 ชั่วโมง ปริมาณ GlcNAc และ ไคโตโอลิโกแซคคาไลด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (**Figure 7**) โดยบ่งบอกถึงการเกิดดีอะซิทิลเลชัน

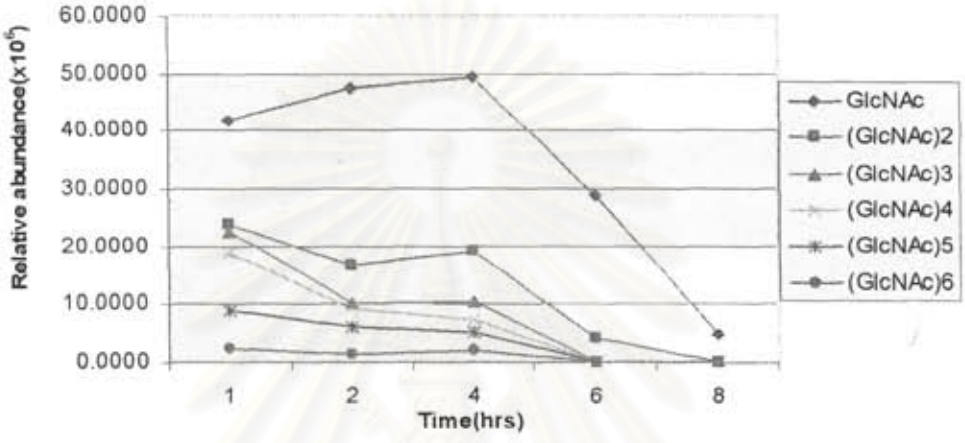


Figure 7. Relative yields, MS signal intensity, of GlcNAc compared to chitooligosaccharides

3. วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] ดำเนินการไปได้เป็นที่พึงพอใจ การตกตะกอน และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการนำเอา crude product ที่ตกตะกอนได้มาผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ อย่างไรก็ตามการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์โคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสมระหว่าง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ และและเมื่อใช้การตกตะกอนในการแยกผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารผสมนี้ให้บริสุทธิ์ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การผลิตของ $(GlcNAc)_2$ ลดลงไปบ้าง

การทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์นั้นมีประสิทธิภาพที่ดี สามารถแยกทั้ง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ได้ และการพิสูจน์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ก็สามารถทำได้ด้วย ^{1}H-NMR ซึ่งทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นนั้น ได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นในอัตราส่วนที่ 1:1 ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่จะนำไปทำการทดลองการย่อยต่อไป ส่วนการศึกษาการย่อยที่อุณหภูมิต่าง ๆกันได้เริ่มทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 40°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิการย่อยทั่ว ๆไปอย่างมีนัยสำคัญและได้ผลการทดลองที่เป็นประโยชน์ต่อการทดลองและวิจัยในลำดับต่อไป

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

การย่อยไคตินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การทำให้ GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านกัมมันต์หรือใช้คอลัมน์ที่มีผงถ่านกัมมันต์ให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% และ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 40% สำหรับการเสนอแนะในการวิจัยขั้นต่อไปการทำให้บริสุทธิ์คอลัมน์โครมาโตกราฟีที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์นั้นมีหลายปัจจัยที่ต้องปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และสามารถแยกทั้ง GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ ให้บริสุทธิ์ได้ดีขึ้นอีก

ในส่วนของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นนั้น ได้เริ่มเตรียมสารละลายไคตินด้วยการผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นในอัตราส่วนที่ 1:1 โดยมีคลื่นอัลตราโซนิกเป็นตัวช่วย รายละเอียดต่างๆกำลังอยู่ในระหว่างการทดลองและเก็บข้อมูลเพิ่มเติม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรณานุกรม

1) Sigma-Aldrich "Biochemicals and Reagents for Life Science Research" Catalog **2004-2005**, p.45 and p.625.

2) Shikhman, A. R.; Kuhn, K.; Alaaeddine, N.; Lotz, M., "*N*-Acetylglucosamine Prevents IL-1 Beta-Mediated Activation of Human Chondrocytes", *J. Immunology*, **2001**, *166*, 5155-5160.

3) Shahidi, F.; Kamil, J.; Arachchi, V.; Jeon, Y. J., "Food applications of chitin and chitosan", *Trends in Food Science & Technology*, **1999**, *10*, 37-51.

4) Suzuki, S., "Studies on Biological Effects of Water Soluble Lower Homologous Oligosaccharides of Chitin and Chitosan", *Fragrance J.*, **1996**, *15*, 61-68.

5) Scheel, O.; Thiem, J., "Cleavage of chitin by means of aqueous hydrochloric acid and isolation of chito-oligosaccharides". *Chitin Handbook*, ed. Muzzarelli, R. A.; Peter, M. G., *Atec Edizioni: Grottammare AP*, Italy. **1997**, 165.

6) Suzuki, K.; Mikami, T.; Okawa, Y.; Suzuki, S., and Suzuki, M., "Antitumor Effect of Hexa-*N*-Acetylchitohexaose and Chitohexaose", *Carbohydr. Res.*, **1986**, *151*, 403-408.

7) Yamada, A.; Shibuya, N.; Kodama, O.; Akatsuka, T., "Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-Cultured Rice Cells by *N*-Acetyl-chitooligosaccharides", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, *57*, 405-409.

8) Vander, P.; Vrum, K. M.; Domard, A.; Eddine, N.; Gueddari, E.; Moerschbacher, B. M., "Comparison of The Ability of Partially *N*-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves", *Plant Physiol.*, **1998**, *118*, 1353-1359.

9) Hiroshi, H., "Disaccharide as Starting Materials for The Synthesis of Valuable Compounds", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2000**, *12*, 185-190.

10) Rupley, J. A., "The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme", *Biochem. Biophys. Acta*, **1964**, *83*, 245-255.

11) Izume, M.; Nagae, S.; Kawagishi, H.; Ohtakara, A., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1992**, *56*, 1327-1328.

12) Muzzarelli, R. A. A.; Peter, M. G., *Chitin Handbook*, *Atec Edizioni: Grottammare AP*, Italy, **1997**, 147-151.

13) Izume, M.; Ohtakara, A., "Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosan", Agric. *Biol. Chem.*, **1987**, *51*(4), 1189-1191.

14) Rattanakit, N.; Yano, S.; Wakayama, M.; Plikomol A.; Tachiki, T.; "Sacharification of Chitin Using Solid-State Culture of *Aspergillus* sp S1-13 with Shellfish Waste as a Substrate", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2003**, *95*(4), 391-396.

15) Auyunirudronkul, K.; "Production of amino sugar from squid pen chitin by fungal biocatalyst" A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science Faculty of Science Chulalongkorn University Academic Year **2003**, ISBN 974-17-3724-6.

16) Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, V.; Sandhya, C.; Szakács, G.; Pócsi, I.; Pandey, A.; "Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation", *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, *36*, 880-887.

17) Ramírez, C. L.; Marín-Cervantes, M. C.; Huerta, S.; Revah, S.; Shirai, K.; "Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases", *Process Biochemistry*, **2005**, *41*, 1106-1110.

18) Patidar, P.; Agrawal, D.; Banerjee, T.; Patil, S., "Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation", *Process Biochemistry*, **2005**, *40*, 2962–2967.

19) Reguera, G.; Leschine, S., "Chitin degradation by cellulolytic anaerobes and facultative aerobes from soils and sediments", *FEMS Microbiology Letters*, **2001**, *204*, 367-374.

20) Pichyangkura, R.; Kudan, S.; Kuttiyawong, K.; Sukwattanasinitt, M.; Aiba, S., "Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase", *Carbohydrate Research*, **2002**, *337*, 557–559.

21) Ramírez, G.; Avelizapa, R.; Avelizapa, R.; Camarillo, C., "Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R® a useful substrate to select chitinolytic microorganisims and to evaluate chitinase", *Microbiological Methods*, **2004**, *56*, 213-219.

22) Yuli, P.; Suhartono, M. T.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K.; Pyun, Y. R., "Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus* sp. 13.26", *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, *35*, 147-153.

23) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y.; Park, R. D., "Selective preparation of *N*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using a crude enzyme preparation from *Aeromonas* sp.", *Biotechnology Letters*, **2004**, *27*, 7-11.

24) Kuk, J. H.; Jung, W. J.; Jo, G. H.; Ahn, J. S.; Kim, K. Y.; Park, R. D., "Production of *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin using temperature-sensitive chitinolytic enzyme preparations of *Aeromonas* sp. GJ-18", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2005**, *22*, 135-139.

25) Purchase, R.; Braun, E., "D-Glucosamine Hydrochloride", *Org. Syn.*, **1946**, *26*, 36-37.

26) Novikov, V.Yu.; et al., "Synthesis of (+)-glucosamine hydrochloride", *Russian Journal of Applied Chemistry.*, **1997**, 70, 1467-1470.

27) Gandhi, N.; Laidler, J. K., "Preparation of glucosamine hydrochloride", *US patent 6,486,307 B1*, **2002**.

28) Nivikov V. Y., "Acid hydrolysis of chitin and chitosan", *Russian Journal of Applied Chemistry*, **2004**, 77, 484-487.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ ดร.มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์
   (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank Dr.Mongkol Sukwattanasinitt
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
   3101800407665
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ตำแหน่งทางวิชาการ (ศ./รศ./ผศ./อื่นๆ (โปรดระบุ) รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

โทรศัพท์ 0-2218-7620

โทรสาร 0-2218-7598

E-mail smongkol@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี พ.ศ. 2534 สาขาวิชา เคมี จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาเอก พ.ศ. 2539 สาขาวิชา Organic Chemistry จาก Iowa State University, USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Polymer Chemistry

Supramolecular Chemistry

Chitin-Chitosan Chemistry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1) Smith, A. V.; Lane P. A.; Shinar, J; **Sukwattanasinitt, M.**; Barton, T. J. "Optical Absorption, Luminescence, and UV-Excited Optically Detected Magnetic Resonance (UV-ODMR) Study of Poly(*p*-Phenyleneethynyleneaniline) (PPEA) Derivatives." *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *256*, 685.

2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Li, L.; Jiang, X.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Functionalizable Self-Assembling Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 27.

3) Sandman, D. J. ; **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Lee, D.-C.; Kim, M.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K. "Submicron Photomanipulation of Self-Assembled Polydiacetylenes" *Synthetic Metals* **1999**,*102*,1546.

4) **Sukwattanasinitt, M.**; Lee, D.-C.; Kim, M.; Wang, X.; Li, L.; Yang, K.; Kumar, J.; Tripathy, S. K; Sandman, D. J. "New Processible Functionalizable Polydiacetylenes" *Macromolecules* **1999**, *32*, 7361.

5) Sukontpanish, U.; Boonyawan, S; Boonsong, P.; Pimpa, N.; Chantarasiri, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Well-defined Soluble Polymers Containing Chiral Salen" *J. Sci. Res. Chula. Univ.* **1999**, *24*, 115.

6) Veravong, S.; Ruangpornvisuti, V.; Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Tuntulani, T. "Synthesis of Tetraalkylated Calix[4]arenes and Studies of Their Conformational Behaviors." *Science Asia* **2000**, *26*, 163-170.

7) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "New Azobenzene Crown *p-tert*-Butylcalix[4]arenes as Switchable Receptors for Na^+ and K^+ ions: Synthesis and Isomerization Studies." *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2000**, *21*, 867-874.

8) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "Preparation of New Azobenzene Crown Ether *p-tert*-Butylcalix[4]arenes and Their Roles as Switchable Ionophores for Na^+ and K^+ Ions." *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9095-9100.

9) Jaiboon, N.; Chaichit, C.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Crystal Structure of Diethoxynitrobenzene-*p*-tert-Butylcalix[4]areneo$_2$$(CH_3)_2C=O$: Evidence of Intra- and Intermolecular CH/p Interactions Forced by Crystal Packing" *J. Chem. Cryst.* **2000**, *30*, 717-720.

10) **Sukwattanasinitt, M.**; Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Sritana-anant, Y.; Ruangpornvisuti, V. "Synthesis of stilbene crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arenes" *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5291-5293.

11) **Sukwattanasinitt, M.**; Zhu, H.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Utilization of commercial non-chitinase enzymes from fungi for preparation of 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose from β-chitin" *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 133-137.

12) Pichyangkura, R.; Kudan, S.; Kuttiyawong, K.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Quantitative production of *N*-Acetyl-*D*-glucosamine from crystalline chitin by chitinase" *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 557-559.

13) **Sukwattanasinitt M.**; Rojanathanes, R.; Jiwpanich, S., Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. "Selective Oxidation of 25,27-Bis-(3′-formylphenoxylethoxy)-*p-tert*-butylcalix[4]arene" *Science Asia* **2002**, *28*, 25-28.

14) **Sukwattanasinitt M.**; Rojanathanes, R.; Jiwpanich, S., Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. "Selective oxidation of 25,27-Bis-(3′-formylphenoxylethoxy)-*p-tert*-butylcalix[4]arene" *Science Asia* **2002**, *28*,25-28.

15) Sashiwa, H.; Fujishima, S.; Yamano, N.; Kawasaki, N.; Nakayama, A.; Muraki, E.; **Sukwattanasinitt, M.**; Pichyangkura R.; Aiba, S. "Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of *N*-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes" *Carbohydr. Polym.* **2003**, *51*, 391-395.

16) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "An Electrochemical Sensor from a Soluble Polymeric Ni-salen Complex" *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4337-4339.

17) Klaikherd, A.; Jayanta S.; Boonjawat, J.; Aiba, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Depolymerization of b-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the para rubber tree, Hevea brasiliensis" *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2799-2804.

18) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; Bhanthumnavin, W.; Orton, J. B.; Cole, S. J.; Hursthouse, M. B.; Grossel, M. C.; Sukwattanasinitt, M. Comparative study of azobenzene and stilbene bridged crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arene *Tetrahedron* **2004**, *61*, 1317-1324.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมนานาชาติ

1) **Sukwattanasinitt, M.;** Ijadi-Maghsoodi, S.; Barton, T. J. "A Convenient Introduction of NLO Chromophores into Electron-Rich Acetylenic Polymers." *Polymer Preprints.* **1995**, *36*, 497.

2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Lee, D.-C.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Self-Assembling Functionalizable Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 677.

3) Chittibabu, K. G.; Li, L.; Balasubramanian, S.; Wang, X.; **Sukwattanasinitt, M.**; Yang, K.; Kumar, J.; Sandman, D. J.; Tripathy, S. K.; "Design, Methodology and Preparation of Novel Polymers for Nonlinear Optics" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 795.

4) Tripathy, S.K.; Kumar, J.; Kim, D.-Y.; Jiang, X.; Wang, X.; Li, L.; **Sukwattanasinitt, M.**; Sandman, D.J. "Photofabrication of Surface Relief Grating Using Post Functionalized Azo Polymers" *Mater. Res. Soc. Conf. Proc.* **1998**, *488*, 141.

5) Lee, D. C.; **Sukwattanasinitt, M**; Wang, X.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K.; Sandman, D. J. "Synthesis, Optical Properties and Self-Assembly of Water Soluble Polydiacetylenes" *Polymer Preprints* **1998**, *39*, 554.

6) **Sukwattanasinitt, M.**; Klaikherd A.; Skulnee, K.; Aiba, S. Chitosan as A Releasing Device for 2,4-D Herbicide" *Proc. of 8th International Chitin and Chitosan Conference*, Yamaguchi, Japan, September 21-23, 2000, Kondansha Scientific Ltd., Tokyo **2001**, 142-143.

7) Zhu, H.; **Sukwattanasinitt, M.**; Pichayangkura, R.; Miyaoka, S. Yunoue, M; Muraki, M.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Chitin and Chitosan in Life Science: Proceedings for 8th International Chitin and Chitosan Conference*, Yamaguchi, Japan, September 21-23, 2000, Kondansha Scientific Ltd., Tokyo **2001**, 330-331.

8) **Sukwattanasinitt, M.**; Prakobkij, W.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Abstracts for 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition*, Bangkok, Thailand, March 13-15, **2002**, 40.

9) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of The Novel Soluble Polymeric Metal-salen complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 73.

10) Boonwan, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of Chitosan Beads Containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and Their Releasing Profiles" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 191.

11) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Calixarene Based Photo-switchable Ionophores" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 200.

12) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "Polymeric Metal-salen Complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th Pacific Polymer Conference*, Bangkok, Thailand, November 24-27, **2003**, 60.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมระดับประเทศ

1) **Sukwattanasinitt, M.**; Ijadi-Maghsoodi, S.; Barton, T. J. "A Convenient Introduction of NLO Chromophores into Electron-Rich Acetylenic Polymers" *Abstracts for 23rd Congress on Science and Technology of Thailand*, Chiang Mai, Thailand **1997**, 304.

2) **Sukwattanasinitt, M.**; Wang, X.; Li, L.; Jiang, X.; Kumar, J.; Tripathy, K.; Sandman, D. J. "Synthesis of Functionalizable Polydiacetylenes and Their Optical Properties" *Abstracts for 24th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **1998**, 122.

3) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Tuntulani, T. "Preparation and Isomerization Properties of Azobenzene Crown p-tert-Butylcalix[4]arene" *Abstracts for 24th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **1998**, 124.

4) Boonyawan, S; Sukontpanish, U.; Chantarasiri, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Well-defined Soluble Polymers Containing Chiral Salen" *Abstracts for 25th Congress on Science and Technology of Thailand*, Pitsanuloke, Thailand **1999**, 304.

5) Pipoosananakaton, B.; **Sukwattanasinitt, M.**; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Tuntulani, T. "Photoisomerization Studies of Azobenzene Crown Ether Calix[4]arenes for Applications in Alkali Metal Ion Extraction" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand* , Bangkok, Thailand **2000**, 190.

6) Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V.; **Sukwatanasinitt, M.** "Selective Oxidation of 25,27-Di-(3-formylphenoxyethoxy)-p-tert-butylcalix[4]arene" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand* , Bangkok, Thailand **2000**, 199.

7) Klaikherd, A.; Skulnee, K.; Ajawakom, A.; Chavasiri, W.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Control Release of 2,4-D Herbicide by Chitosan" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **2000**, 697.

8) Mansawat, W.; Vilaivan, T. Bhanthumnavin, W.; Boonsong, P.; Jewpanich, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of α-Aminonitriles Using Novel Catalysis" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 204.

9) Boonsong, P.; Pimpa, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Chiral Salens Containing Alkyl Chain and Ethylene Glycol Chains" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 226.

10) Rojanathanes, R.; Tuntulani, T.; Ruangpornvisuti, V. **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of stilbene crown ether *p-tert*-butylcalix[4]arenes and Their Isomerization" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 230.

11) Potisatityuenyong, A.; Sae-lim, C.; **Sukwattanasinitt, M.**; Ruangpornvisuti, V. "Synthesis and Determination of Acidic Constant for Salen Derivative by Potentiometric Titration" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 253.

12) Ruangpornvisuti, V.; Sae-lim, C.; Potisatityuenyong, A.; **Sukwattanasinitt, M.** "Determination of Protonation Energies and Protonation Constants of Salen Derivative" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand*, 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 254.

13) Klaikherd, A.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Enzymatic Hydrolysis of Chitin for Production of N-Acetyl-D-glucosamine" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 548.

14) Jiwpanich, S.; Sirichartchai, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Novel Soluble Polymer Containing Metal Complexes of Salen" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 845.

15) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.**; Sato, H. "Synthesis of Soluble Fluorescent Polymers Containing Vinylene Linked Triphenylamine" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 846.

16) Boonwan, S.; Jaiyu, A.; Limruangroj, I.; **Sukwattanasinitt, M.** "Utilization of Chitosan for controlled Release of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid with Polyphosphoric acid and Glutaraldehyde as Crosslinking Agents" *Abstracts for 27th Congress on Science and Technology of Thailand,* 16-18 October 2001, Songkla, Thailand **2001**, 858.

17) **Sukwattanasinitt, M.**; Prakobkij, W.; Sashiwa, H.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose from Chitin by Enzymatic Hydrolysis" *Abstracts for 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibition,* Bangkok, Thailand, March 13-15, **2002**, 40.

18) Nantalaksakul, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of The Novel Soluble Polymeric Metal-salen complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 73.

19) Boonwan, S.; **Sukwattanasinitt, M.** "Preparation of Chitosan Beads Containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and Their Releasing Profiles" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 191.

20) Rojanathanes, R.; Pipoosananakaton, B.; Tuntulani, T.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Calixarene Based Photo-switchable Ionophores" *Abstracts for 8th International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry*, Bangkok, Thailand, May 29-31, **2002**, 200.

21) **Sukwattanasinitt, M.**; Nantalaksakul, A.; Potisatityuenyong, A.; Tuntulani, T.; Chailapakul, O.; Prapairaksit, N. "Polymeric Metal-salen Complexes and Their Electrochemical Properties" *Abstracts for 8th Pacific Polymer Conference*, Bangkok, Thailand, November 24-27, **2003**, 60.

22) Jaiyu, A.; Klaikherd, A. Jayanta, S.; **Sukwattanasinitt, M.**; Boonjawat, J.; Aiba, S. "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and Chitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Chitin with Serum from Para Rubber" *Abstracts for 29th Congress on Science and Technology of Thailand,* 20-22 October 2003, Khon Kean, Thailand, SC88.

23) Lim, C.; Boonsong, P. Sritana-anant, Y.; **Sukwattanasinitt, M.** "Synthesis of Salen Complexes Containing Ethylene Glycol Chains and Their Catalytic Properties" *Abstracts for 29th Congress on Science and Technology of Thailand,* 20-22 October 2003, Khon Kean, Thailand, SC89.

24) Jaiyu, A.; **Sukwattanasinitt, M.**; Kongsaeree, P.; Prabpai, S. "Synthesis and Complexation Study of Calix[4]arene Containing Stilbene and Crown Ether" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand,* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, C0194.

25) Lim, C.; **Sukwattanasinitt M.** "Synthesis and Properties of New Calix[4]arene Tube Containing Diacetylene" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, C0195.

26) Hansuthirakul, K.; Ajavakom A.; **Suwattanasinitt, M.** "Synthesis of aziridine derivatives" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, C0247.

27) Maneekul, T.; Auynirundronkul, K.; Prakobkij, W.; Klaikherd, A.; Pichyangkura, R.; Punnapayak, H., **Sukawattanasinitt, M.** "Preparation of *N*-Acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-Diacetylchitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Chitin" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand.* 19-21 October 2004, Bangkok, Thailand, L0015.

รางวัลและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **2530-2534** ทุนการศึกษาระดับปริญญาตรีในประเทศ โครงการ พสวท.
- **2534** เกียรตินิยมเหรียญทอง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- **2534-2539** ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกต่างประเทศ โครงการ พสวท.
- **2540-2542** ทุนนักวิจัยใหม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โครงการวิจัยเรื่อง "การสังเคราะห์พอลิเมอร์ละลายได้ชนิดใหม่ที่มีสารประกอบเชิงซ้อนซาเลนของโลหะเป็นส่วนประกอบ"
- **2541-2543** ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการวิจัยเรื่อง "การสังเคราะห์สติลบีนคราวน์อีเธอร์คาลิก[4]เอรีนเพื่อใช้เป็นเครื่องมือระดับโมเลกุลในการแยกไอออนหรือใช้เป็นไอออนเซนเซอร์"
- **2542-2543** ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2543 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โครงการวิจัยเรื่อง "การเตรียมและการศึกษาสมบัติของเกลือของไคโตซานกับสารกำจัดวัชพืชที่เป็นกรด"
- **2543** ITIT fellowship, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan; Research area: *Enzymatic Hydrolysis of Chitin and Chitosan;* Host: Dr. Sei-ichi Aiba
- **2544** STA fellowship, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Osaka, Japan; Research area: *Enzymatic Hydrolysis of Chitin and Chitosan;* Host: Dr. Sei-ichi Aiba
- **2545** รางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ประจำปี 2545 มูลนิธิส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในพระบรมราชูปถัมภ์
- **2545-2548** ทุนพัฒนานักวิจัย (เมธีวิจัย สกว.) เรื่อง การสังเคราะห์และศึกษาเปรียบเทียบอนุพันธ์คาลิกซ์[4]เอรีนที่มีไดเอโซเบนซีนและสติลบีนสำหรับการพัฒนาสารจับไอออนแบบสวิทช์ได้

งานวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ (โปรดกรอกข้อความในตาราง)

ชื่อโครงการ	แหล่งเงินทุน	ระยะเวลาโครงการ	สัดส่วนของงานวิจัยที่เสร็จแล้ว(%)
1) การสังเคราะห์และศึกษาเปรียบเทียบอนุพันธ์คาลิกซ์[4]เอรีนที่มีไดเอโซเบนซีนและสติลบีนสำหรับการพัฒนาสารจับไอออนแบบสวิทช์ได้	เมธีวิจัย สกว.	2545-2548	80%
2) การย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อผลิต เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส	National Metal and Materials Center	2546-2548	50%

2. ผู้วิจัย

1. ชื่อนักวิจัย/ผู้ช่วยวิจัย

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) (นาย/นาง/นางสาว, ดร.) อนวัช อาชวาคม

   (ภาษาอังกฤษ) (Mr./Mrs./Miss, Dr.) Anawat Ajavakom

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน

   3101700302799

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

   ตำแหน่งทางวิชาการ (ศ./รศ./ผศ./อื่นๆ (โปรดระบุ) อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

   ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   ที่อยู่ ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

   โทรศัพท์ 0-2218-7623

   โทรสาร 0-2218-7598

   E-mail anawat77@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

   ปริญญาตรี พ.ศ. 2539 สาขาวิชา เคมี จาก มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

   ปริญญาโท พ.ศ. 2541 สาขาวิชา เคมี จาก มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น

   ปริญญาเอก พ.ศ. 2546 สาขาวิชา เคมีอินทรีย์ จาก มหาวิทยาลัยเซาธ์แฮมป์ตัน ประเทศอังกฤษ

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   Organic Synthesis

   Radical Chemistry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Supramolecular Chemistry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1) Akiyama, T.; Imahori, H.; **Ajawakom, A.;** Sakata, Y., "Synthesis and self-assembly of porphyry-linked fullerene on gold surface using S-Au linkage." *Chem. Lett.*, **1996**, *10*, 907-908.
2) Imahori, H.; Ozawa, S.; Ushida, K.; Takahashi, M.; Azuma, T.; **Ajavakom, A.;** Akiyama, T.; Hasegawa, M. ; Taniguchi, S.; Okada, T.; Sakata, Y., "Organic Photoelectrochemical Cell Mimicking Photoinduced Multistep Electron Transfer in Photosynthesis: Interfacial Structure and Photoelectrochemical Properties of Self-Assembled Monolayers of Porphyry-Linked Fullerenes on Gold Electrodes", *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1999**, *72*, 485-502.
3) Imahori, H.; Azuma, T.; Ozawa, S.; Yamada, H.; Ushida, K.; **Ajavakom, A.;** Norieda, H.; Sakata, Y., "Photoinduced electron transfer at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of fullerene" *Chem. Comm.*, **1999**, *6*, 557-558.
4) Imahori, H.; Azuma, T.; **Ajavakom, A.;** Norieda, H.; Yamada, H.; Sakata, Y., "An Investigation of Photocurrent Generation by Gold Electrodes Modified with Self-Assembled Monolayer of C60", *J. Phys. Chem., Series B, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical*, **1999**, *103*, 7233-7237.
5) Kitkulnumchai, Y.; **Ajavakom, A.;** Sukwattanasinitt, M., "*Treatment of oxidized cellulose fabric with chitosan and its surface activity towards anionic reactive dyes*", *Cellulose*, **2008**, *15*, 599-608.

ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมนานาชาติ

1) Klaikherd, A.; Skulnee, K.; **Ajawakom, A.**; Chavasiri, W.; **Sukwattanasinitt, M.**; Aiba, S. "Control Release of 2,4-D Herbicide by Chitosan" *Abstracts for 26th Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand **2000**, 697.
2) Hansuthirakul, K.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.**, "Synthesis of Aziridine Derivatives" *Abstracts for 30th Congress on Science and Technology of Thailand*, 19-21 October **2004**, Bangkok, Thailand, C0247.
3) Hansuthirakul, K.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.**, "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamide Derivatives" *Abstracts for 31th Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-21 October **2005**, Bangkok, Thailand, C0065.
4) Hansuthirakul, K.; Sirijindalert, T.; **Ajavakom, A.**, "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamide Derivatives and Synthesis of Pyrrolidine *trans*-Lactams" *Proceeding for 4th International Symposium on Advanced Materials in Asia-Pacific Rim (ISAMAP)*, 13-15 July **2007**, Niigata, Japan, IL06, 21.
5) Boonchit, S.; Sukwattanasinitt, M.; **Ajavakom, A.**, "Separation and Morphology of PDA from Self-assembly of Diacetylene Lypid" *Abstracts for 33th Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-20 October **2007**, Nakornsritammarat, Thailand, E0015.

6) Hansuthirakul, K.; Sirijindalert, T.; **Ajavakom, A.** "Acid-promoted Intramolecular Cyclisation of Enamine and Enamide Derivatives" *Proceeding for International Symposium on Catalysis & Fine Chemicals (C&FC)*, 16-21 December **2007**, Singapore, NMP-A0400.

รางวัลและทุนวิจัยที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

- **2533-2535** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับมัธยมปลาย โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น
- **2535-2539** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับปริญญาตรี มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น
- **2539-2541** ทุนการศึกษาของ ก.พ. ระดับปริญญาโท มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น
- **2539-2541** ทุน ORS (Overseas Research Scholarship) จากประเทศอังกฤษ ระดับปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเซาธ์แฮมป์ตัน ประเทศอังกฤษ
- **2546-2547** ทุนรัชดาภิเษกสมโภช สำหรับนักวิจัยใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- **2549-2552** ทุนสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาโครงการพัฒนากลุ่มสถาบันอุดมศึกษาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ "ศูนย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและราเอนโดไฟท์"
- **2549-2551** ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

งานวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ (โปรดกรอกข้อความในตาราง)

ชื่อโครงการ	แหล่งเงินทุน	ระยะเวลาโครงการ	สัดส่วนของงานวิจัยที่เสร็จแล้ว(%)
1) โครงการพัฒนากลุ่มวิจัยในสถาบันอุดมศึกษาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถการแข่งขันของประเทศ	ทุนสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา	2549-2552	20%
2) โครงการผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล	ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	2549-2552	50%

รายงานการวิจัย "การผลิตอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมจากเปลือกอาหารทะเล"

1.บทนำ

1) มูลเหตุจูงใจและปัญหา

ไคติน (chitin) เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีคือ poly(β-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose) หรือเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลักในสายพอลิเมอร์ ส่วนไคโตซาน (chitosan) ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ดังนั้นไคโตซานจึงประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่เป็น poly(β-(1-4)-2-amino-2-deoxy-*D*-glucose) หรือดี-กลูโคซามีน (*D*-glucosamine) เป็นหน่วยซ้ำหลัก ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเซลลูโลส แตกต่างกันที่หมู่แทนที่บนคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลสโดยหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ของเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิลแต่ของไคตินเป็นหมู่อะซิทาไมด์ (NHAc) ส่วนไคโตซานเป็นหมู่อะมิโน (NH_2)

ไคติน-ไคโตซานที่ผลิตขึ้นภายในประเทศส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปของวัตถุดิบราคาถูก (กิโลกรัมละ 400-1000 บาท) ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น จึงเป็นการช่วยเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งให้กลายเป็นทรัพยากรที่มีค่าของประเทศ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่มั่นคงและยั่งยืน เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ขายในรูปสารเคมีปัจจุบันมีราคากว่า 57,700 บาท/กิโลกรัม ส่วนไดเมอร์ของไคตินคือ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส มีราคาสูงกว่า 900,000 บาท/กรัม และโอลิโกเมอร์ที่มีขนาด 3-7 หน่วยนั้นมีราคาสูงขึ้นไปอีกตามลำดับ[1] ซึ่งสารเหล่านี้ใช้เป็นส่วนผสมหลักในยารักษาอาการเจ็บปวดตามข้อกระดูกสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคออสทีโออาร์ไทรทีส (osteoarthritis)[2] โครงการวิจัยนี้จึงอาจถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปรรูปวัถดุดิบคือไคติน และไคโตซานให้เป็นสารเคมีโมเลกุลขนาดเล็กลงที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมที่มีราคาสูงขึ้น

ในงานวิจัยที่ผ่านของเราพบว่าเอนไซม์จาก Burkoderia cepacia สามารถใช้ผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน จาก ไคติน มากกว่า 90% ในเวลา 1 วัน โดยอัตราค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการจะอยู่ที่ประมาณ 800-1500 บาท/กิโลกรัม และถ้าขยายขนาดการผลิตก็จะสามารถลดราคาการผลิตต่อกิโลกรัมลงอย่างมีนัยสำคัญได้อีก อย่างไรก็ตามจุดเด่นของการวิจัยนี้ไม่ได้อยู่ที่ต้นทุนการผลิตต่ำแต่เพียงอย่างเดียวแต่อยู่ที่ความปลอดภัยและความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมที่มีมากกว่าวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีซึ่งมีกระบวนการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน

2) วัตถุประสงค์

2.1) เพื่อศึกษาการย่อยไคตินด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าวออกจากของผสมในปฏิกิริยาสารมาตรฐาน

2.2) เพื่อศึกษาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคโดยมีคลื่นอัลตราโสนิกช่วยเพื่อเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์และ ศึกษาหาวิธีแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าวออกจากของผสมในปฏิกิริยาสารมาตรฐาน

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

1) การย่อยด้วยเอนไซม์

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. จัดหาสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็น
c. นำ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 ที่คัดเลือกสายพันธุ์แล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ จากดร. รัฐ พิชญางกูร ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อนำไปศึกษาต่อ และเก็บเป็น stock เชื้อ
d. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของ *Aeromonas hydrophila* MOK-1 หาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก เช่น
   - การใช้แอลฟาและเบต้าไคตินที่ระดับ 0.5, 1, 1.5 และ 2% เป็นแหล่งคาร์บอน
   - อุณหภูมิที่ 30 – 50°C
e. หาสภาวะที่เหมาะสมกับการย่อยของเอนไซม์
   - อุณหภูมิที่เหมาะสมแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ 30 – 45°C และ 45 - 60°C
   - พีเอชที่เหมาะสมโดยศึกษาในช่วง pH 3.5 - 8
f. ย่อยไคตินด้วยเอนไซม์ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแอมิโนโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ โดยใช้วิธีการหมักแบบครั้งเดียว, แบบกึ่งต่อเนื่อง และแบบต่อเนื่อง
g. ทำการแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้บริสุทธิ์
h. วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนเขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือ จดสิทธิบัตร

2) การย่อยด้วยกรด

a. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
b. จัดหาสารเคมีและวัตถุดิบที่จำเป็น
c. ศึกษาการย่อยไคตินจากเปลือกกุ้งบดขนาด 200 mesh ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (12 M) ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้โซนิเคเตอร์ช่วย
d. ทำการแยกผลิตภัณฑ์เกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) พร้อมทั้งคำนวณหาเปอร์เซนต์ผลผลิต เปรียบเทียบกับการย่อยโดยไม่ใช้คลื่นโซนิเคเตอร์
e. หา activity ของการย่อยโดยใช้ โซนิเคเตอร์เป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย
f. ศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างปริมาณไคตินกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่มีต่อเปอร์เซนต์ผลผลิตแบบใช้โซนิเคเตอร์
g. หาค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อย
h. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วย HPLC
i. แยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วย การตกตะกอน หรือโครมาโทกราฟฟี
j. เขียนรายงาน และเตรียมบทความเพื่อลงตีพิมพ์ หรือ จดสิทธิบัตร

3. ผลการวิจัย

1) การย่อยด้วยเอนไซม์

เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคติน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40°C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน

การย่อยไคติน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37°C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซนต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยขบวนการที่พัฒนาแล้วความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้สูง

2) การย่อยด้วยกรด

การย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยการใช้และไม่ใช้คลื่นอัลตราโซนิคเพื่อให้ได้เกลือกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเกลือ GlcNHCl คืออัตราส่วนไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1:1 (w/w)

4. สรุปและเสนอแนะ

ในขั้นต่อไปจะศึกษาการย่อยโดยใช้โซนิเคเตอร์เป็นจุดหมายต่อไปซึ่งเราจะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการศึกษาปฏิกิริยาการย่อย ณ อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน นอกจากนั้นยังต้องพัฒนาการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วย HPLC

รวมไปถึงการปรับปรุงขบวนการที่แสดงไว้ให้ดีขึ้นโดยปรับเปลี่ยนปริมาณของรีเอเจนต์หรือ ปัจจัยอื่นๆต่อไป จากนั้นรวบรวมข้อมูลและผลการทดลองที่ได้มาเขียนรายงาน และดำเนินการตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้ต่อไป

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยนี้คือการพัฒนากรรมวิธีการในการย่อยไคตินที่มีประสิทธิภาพสูงให้ได้ โมโนเมอร์ (GlcNAc), ไดเมอร์ $[(GlcNAc)_2]$ รวมทั้งเกลือโมโนเมอร์ (Glc) ของไคตินที่สามารถนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารเสริมป้องกันโรคข้อกระดูกเสื่อมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญญาเลขที่ GRB_๒๖_๕๐_๒๓_๐๒

โครงการวิจัยเรื่อง แผนงานวิจัยนวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่

การรายงานความก้าวหน้าผลการดำเนินงาน (ครั้งที่ 5)

รายงานช่วงระยะตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2550 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2551

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์

หน่วยงาน: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

๑. การดำเนินงาน: [✓] ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้ คือ .....

๒. สรุปผลการดำเนินงาน

สามารถย่อยไคตินด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* เพื่อเตรียม เอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และ เอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโตไบโอส $(GlcNAc)_2$ ไปได้ในระดับที่น่าพอใจ เหลือแต่รายละเอียดในการทำให้ผลิตภัณฑ์ทั้งสองบริสุทธิ์ ซึ่งขบวนการนี้อยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

ในขณะเดียวกันเราได้เริ่มศึกษาการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพื่อเตรียมเกลือกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (GlcNHCl) โดยการย่อยนี้เราได้นำเอาโซนิเคเตอร์เข้ามาช่วยในการย่อยด้วยซึ่งเป็นขบวนการใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

๓. การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- ศึกษารายละเอียดของการย่อยไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพื่อเตรียม GlcNHCl โดยใช้โซนิเคเตอร์เข้ามาช่วยในการย่อย
- ในอนาคตจะมีการนำเอาไมโครเวฟมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยาการย่อยไคติน

๔. อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

ในช่วงแรกเงินอุดหนุนทุนวิจัยที่ได้รับค่อย ๆมาเป็นงวด ๆและล่าช้า จึงเป็นผลทำให้การวิจัยเป็นไปได้อย่างไม่ต่อเนื่อง แต่ขณะนี้เงินอุดหนุนทุนวิจัยได้เริ่มมีการจ่ายเข้ามาทำให้การวิจัยดำเนินได้ราบรื่นขึ้น และช่วงระยะเวลาในการรายงานความก้าวหน้าถี่เกินไปทำให้มีเวลาให้กับการวิจัยไม่เพียงพอ ระยะเวลาของการรายงานความก้าวหน้าควรปรับให้เป็น 6 เดือนต่อครั้ง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์)
หัวหน้าโครงการวิจัย
17 / 02 / 52