

การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสกัดไคโตซานจากขยะเปลือกกุ้ง Isolation and Selection of Bacteria Capable of Extracting Chitosan from Shrimp Shell Waste

ณัฐพร จันทร์ฉาย* พรตารา ศรีทอง และอัญญา บุญประจวบ

Nuttaporn Chanchay*, Phorndara Sritong and Ansaya Boonprajaub

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่ 54140

Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Phrae, Thailand 54140

*Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

Received: May 25, 2020

Revised: August 30, 2021

Accepted: February 25, 2022

Abstract

Isolation and selection of bacteria capable of extracting chitosan from shrimp shell. Three isolates of microorganisms were found; PC-08 of chitosan liquid fertilizer, NC-04 of chitosan ferment from shrimp shells and SC-08 of shrimp shell chitosan ferment from Thai style barbecue restaurant. Then run the test in MMCT, it was found that NC-04 isolate had the best enzyme activity of 16.746 ± 0.019 units/mg/min. After that, compared with chemical methods, it was found that the chitosan production digested with sodium hydroxide had the higher removal values of the acetyl group, water solubility, percentage yield of chitosan, and pH than method for bacterial separation from shrimp shell. The isolated bacteria were analyzed for morphological characteristics and found that NC-04 isolate was morphologically consistent with 99% *Acinetobacter baumannii*. However, the method of bacterial isolation and selection of bacteria for extraction of chitosan from shrimp shells still need to be developed on an industrial scale.

Keywords: chitosan, chitin, bacteria, isolation, shrimp shell

บทคัดย่อ

การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสกัดไคโตซานจากขยะเปลือกกุ้ง พบว่ามีจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 3 ไอโซเลท คือ PC-08 จากปุ๋ยน้ำไคโตซาน NC-04 จากน้ำหมักไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และ SC-08 จากน้ำหมักไคโตซานจากขยะเปลือกกุ้งร้านหมูกระทะ เมื่อทำการทดสอบในอาหารเหลว MMCT พบว่าไอโซเลท

NC-04 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีทีเอสสูงสุด เท่ากับ 16.746 ± 0.019 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที จึงนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมี พบว่าการผลิตไคโตซานที่ย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มีค่าการกำจัดหมู่อะซิทิล การละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของไคโตซาน และค่า pH มากกว่าวิธีการแยกด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากแหล่งขยะเปลือกกุ้ง เมื่อนำเชื้อที่สามารถแยกได้ไปวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า ไอโซเลท NC-04 มีลักษณะ

สัณฐานวิทยาตรงกับ *Acinetobacter baumannii* ร้อยละ 99 อย่างไรก็ตามวิธีการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียในการสกัดโคโตซานจากเปลือกกุ้งยังคงต้องมีการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ: โคโตซาน โคติน แบคทีเรีย การคัดแยก เปลือกกุ้ง

คำนำ

ปัจจุบันกระแสความตื่นตัวในด้านการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมมีมากขึ้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมต่าง ๆ นิยมใช้สารตั้งต้นหรือวัตถุดิบทางชีวภาพมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยโคโตซานที่นิยมนำวัตถุดิบทางชีวภาพ เช่น แขนหมีก หรือเปลือกกุ้งมาใช้ในการผลิตซึ่งโคโตซานเป็นสารอนุพันธ์โคตินที่เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยอนุพันธ์เอ็น-อะซิetylกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และเมื่อทำการกำจัดหมู่อะซิetylของโคตินแล้วได้พอลิเมอร์เรียกว่าโคโตซาน (Patil and Paknikar, 2000) การนำ แขนหมีกหรือเปลือกกุ้งมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโคโตซานนับว่าเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหามลภาวะสิ่งแวดล้อมในการกำจัดของเสียในอุตสาหกรรมอาหารทะเล และยังช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นในรูปของโคตินหรือโคโตซาน อย่างไรก็ตามคุณภาพและมาตรฐานของการผลิตโคโตซานในการผลิตทางเคมียังคงเป็นปัญหาในด้านการกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยเนื่องจากการใช้สารเคมีในการผลิตมีการใช้ทั้งกรดแก่และด่างแก่ในการสกัดจึงทำให้มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและโคโตซานที่ผลิตด้วยวิธีการทางเคมีนั้นอาจมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถขึ้นทะเบียนสินค้าอินทรีย์ได้จากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคตินให้เป็นโคโตซานนั้น อาจยกรีดแก่และเบสแก่ที่อุณหภูมิสูง ซึ่ง

กรดแก่ทำหน้าที่ดึงโปรตีนออกจากโคตินเพื่อกำจัดหมู่อะซิetyl (Deacetylation) จึงได้สารโคโตซาน ปัจจุบันจึงนำเอาวิธีการทางชีวภาพมาใช้ โดยอาศัยแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคตินเนสในการช่วยดึงหมู่อะซิetyl และมีบทบาทในการย่อยสลายสายโพลีเมอร์ของโคตินเพื่อช่วยในการผลิตโคโตซานได้ ซึ่งพบว่า Chatdumrong (1996) สามารถคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โคตินเนสในการย่อย สลายสายโพลีเมอร์ของโคติน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรีย และประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถสกัดโคโตซาน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโคโตซานระหว่างกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ ทั้งนี้เพื่อเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่สามารถเพิ่มมูลค่าของขยะเปลือกกุ้ง และยังเป็น การนำเอาของเสียในอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์ เพื่อให้การผลิตโคโตซานด้วยวิธีทางชีวภาพได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสกัดโคโตซานจากขยะเปลือกกุ้ง

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสกัดโคโตซาน

นำตัวอย่างปุ๋ยน้ำโคโตซาน (PC) และน้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้ง (NC) จากบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอฟอส จำกัด อำเภอวังทอง และน้ำหมักโคโตซานจากขยะเปลือกกุ้งจากร้านหมูกระทะเวรณีบาร์บิคิว (SC) อำเภอวังทอง จังหวัดแพร่ มาทำการเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นปิเปตสารละลายในแต่ละความเจือจาง 0.1 มล. แล้วเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เลือกลำโคโลนีเชื้อแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ (Streak plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

การทดสอบเชื้อในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบ ในอาหารแข็งโดยวิธี Combined disc

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Chitin selective agar โดยใช้ Loop และเชื้อแบคทีเรีย อายุ 72 ชั่วโมง วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Chitin selective agar โดยวางห่างจากขอบจาน 2 ซม. วางให้ได้ 1-2 ตำแหน่ง ในหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่า pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการตรวจสอบการทำงานของเชื้อแบคทีเรียจากวงใสที่เกิดขึ้น และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (Gomez *et al.*, 2004)

การทดสอบการย่อยไคตินในอาหารเหลวโดยใช้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเหลว Nutrient broth (NB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มล. ถ่ายลงในฟลasks ขนาด 250 มล. ซึ่งมีอาหาร Minimal medium (MMCT) โดยวิธีของ Souza *et al.* (2009) ปริมาตร 90 มล. วางบนเครื่องเขย่าผสม สารความเร็ว 150 รอบ บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ. เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง มาทดสอบโดยนำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ผสมสารละลาย Dipotassiumtetraborate ความเข้มข้น ร้อยละ 0.8 ปริมาตร 0.1 มล. ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที แล้วทำให้เย็นทันที เติมสารละลาย p-Dimethylaminobenzaldehyde ปริมาตร 3 มล. (สารละลายสีเหลือง) บ่มที่ 37°ซ. เป็นเวลา 20 นาที (สารละลายสีม่วงแดง) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ภายในเวลา 10 นาที เทียบกับกราฟมาตรฐาน N-acetyl-D-glucosamine และคำนวณตามสูตรกิจกรรมของเอนไซม์ (Brzezinska and Donderski, 2001)

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกและคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรีย เช่น สี โครงสร้าง ขนาด และรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยทำการย้อมสีแกรม

การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิคอนุชีววิทยา

นำแบคทีเรียที่มีความจำเพาะของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด มาทำการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยวิธี Sanger sequencing โดยการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย และทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA) ของยีนตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ไพรมเมอร์ที่ใช้ คือ 27F: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; 1429R: 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; 785F: 5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3'; 970R: 5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3' หลังจากทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ได้ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) (Tomee *et al.*, 1997) ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องภายใต้รังสี UV ตรวจสอบขนาดของยีนโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb+ (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder) และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนส่วนยีนที่ประมวลผลรหัส 16s rRNA gene โดยวิธี Direct sequencing (Macrogen Inc., Korea)

การเปรียบเทียบโคโตซานที่สกัดด้วยกระบวนการ ทางเคมีและทางชีวภาพ

โดยแบ่งเป็น 3 ตัวอย่างที่จะทำการเปรียบเทียบ ได้แก่ A) โคโตซานที่สกัดด้วยกระบวนการทางเคมี โดยสกัดด้วย NaOH B) โคโตซานที่สกัดด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยการใช้เชื้อที่ทำการคัดแยกได้ในการสกัด C) ปุ๋ยน้ำโคโตซานที่ทำการผลิตจากบริษัทซีอาร์-วันไบโอพอสส์ จำกัด

การเตรียมตัวอย่างโคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ

A) ทางเคมี โดยนำเปลือกกุ้งที่เป็นขยะเหลือทิ้งจากร้านหมูกะทะ เต็มโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 50 (มวล/ปริมาตร) โดยใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 100 กวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100°ซ. และเปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาส่วนเหลวออก และล้าง NaOH ด้วยน้ำกลั่น โดยการเติมน้ำกลั่นลงในภาชนะที่มีเปลือกกุ้งที่ผ่านการกรองเอา NaOH ออกแล้ว และคนผสมกัน แล้วกรองน้ำกลั่นออก ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง แล้วจึงนำเปลือกกุ้งที่ผ่านขั้นตอนดังกล่าวแล้วอบแห้งที่ 60°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Pensiri, 2011)

B) ทางชีวภาพ นำเปลือกกุ้งที่เป็นขยะเหลือทิ้งจากร้านหมูกะทะหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMCT ร่วมกับแบคทีเรียที่แยกได้ บ่มที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองเอา NaOH ออก และล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 60°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Chatdamrong, 1996)

C) ปุ๋ยน้ำโคโตซานที่ทำการผลิตจากบริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด ทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการย่อยด้วยเชื้อแบคทีเรียว่ามีประสิทธิภาพการย่อยได้ดีกว่าการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการศึกษาสภาวะในการผลิตโคโตซานของการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีอิทธิพลต่อร้อยละการกำจัดหมู่อะซิทิล ร้อยละการละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของโคโตซาน และค่า pH

ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิทิล

$$\text{ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิทิล} = \left[1 - \left(\frac{A}{\left(\frac{(10 \times W) - (204A)}{161} \right) + A} \right) \right] \times 100$$

โดย A คือ ความเข้มข้นของ N-acetyl-D-glucosamine ของโคโตซาน วัดได้ (กรัม/ลิตร) ทหารด้วย 204

W คือ น้ำหนักตัวอย่างโคโตซาน (กรัม) ใน 100 มล.

204 คือ น้ำหนักโมเลกุลของ N-acetyl-D-glucosamin

161 คือ น้ำหนักโมเลกุลของ D-glucosamine

ร้อยละการละลายน้ำ

$$\text{ร้อยละการละลายน้ำ (W/W)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

โดย A คือ น้ำหนักโคโตซานเริ่มต้น

B คือ น้ำหนักโคโตซานคงเหลือ

ร้อยละผลผลิตของโคโตซาน

$$\text{ร้อยละผลผลิตของโคโตซาน} = \frac{\text{น้ำหนักโคโตซานหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเปลือกกุ้งเริ่มต้น}}$$

การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทดสอบข้อมูลทางสถิติแบบ F-test เพื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งของเสียในจังหวัดแพร่

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ด้วยเทคนิค Spread plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 39 ไอโซเลท แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากปุ๋ยน้ำโคโตซาน 11 ไอโซเลท น้ำหนักโคโตซานจากเปลือกกุ้ง 12 ไอโซเลท และน้ำหนักขยะเปลือกกุ้งจากร้านหมูกะทะ 15 ไอโซเลท (Figure 1)

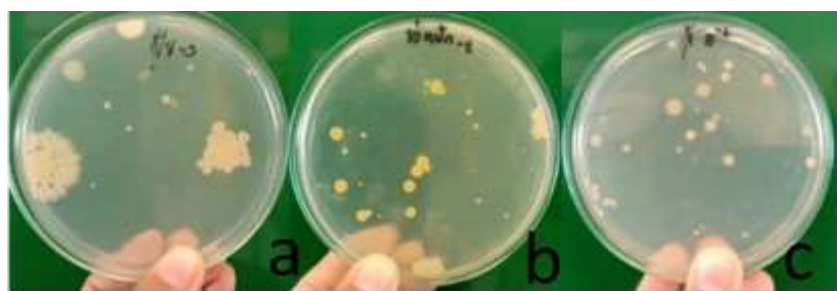


Figure 1 Colony characteristics of bacteria isolated from chitosan liquid fertilizer; PC (a) chitosan fermented broth from shrimp shells; NC (b) and chitosan fermented broth from shrimp shells waste of pork pan shop; SC (c) on nutrient agar medium

ผลการทดสอบเชื้อในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส

โดยวิธี Combined disc

การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์จากวงใสที่ปรากฏ และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสในการตัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากปุ๋ยน้ำไคโตซาน น้ำหมักไคโตซานจาก

เปลือกกุ้ง และน้ำหมักไคโตซานขยะเปลือกกุ้งจากร้านหมูกระทะ สามารถสร้างวงใสและวัดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางและพบว่า เชื้อแบคทีเรียมีการเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C. pH 6.0

Table 1 The ratio of clear colony diameter (CZ) to colony diameter (CS) from bacterial activity in digestion of chitin selective agar medium

Source	Number of isolates	Isolates	CZ/CS
Chitosan liquid fertilizer (PC)	5	PC-05	1.143±0.021 ^e
		PC-08	1.645±0.148 ^a
		PC-09	1.470±0.000 ^b
		PC-10	1.425±0.035 ^c
	F-test= ns	PC-11	1.290±0.056 ^d

Table 1 (Continued)

Source	Number of isolates	Isolates	CZ/CS
Chitosan fermented broth from shrimp shells (NC)	6	NC-02	1.040±0.184 ^e
		NC-03	1.220±0.056 ^b
		NC-04	1.410±0.056 ^a
		NC-05	1.290±0.056 ^b
		NC-07	1.250±0.001 ^c
	F-test= ns	NC-10	1.150±0.014 ^d
Chitosan fermented broth from shrimp shells waste of pork pan shop (SC)	4	SC-01	1.250±0.028 ^c
		SC-08	1.405±0.063 ^a
		SC-10	1.310±0.014 ^b
	F-test= ns	SC-13	1.145±0.035 ^d

Mean ± standard deviation; ns = There was no significant difference at the level of confidence ($p \leq 0.05$).

The mean values indicated by different characters were statistically different from the DMRT methods.

ผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสสกัดหยาบในอาหารเหลว

จากผลการแยกแบคทีเรียในอาหารเหลว โดยนำจุลินทรีย์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสรอบโคโลนีต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่ดีที่สุดของแต่ละแหล่งตัวอย่าง ซึ่งคัดเลือกจากการทำงานของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยบน Chitin

selective agar แล้วนำมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMCT พบว่าสีของอาหารมีความใสขึ้นเมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างในช่วงเวลาเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีการย่อย Colloidal chitin ที่เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ MMCT ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

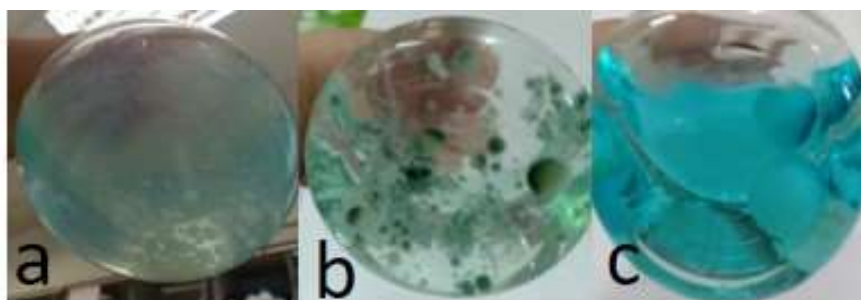


Figure 2 Enzyme activity from bacteria producing chitinase crude extract from liquid chitosan fertilizer (a), chitosan fermentation broth from shrimp shell (b) and shrimp shell waste fermentation waste from pork pan shop (c) in MMCT medium

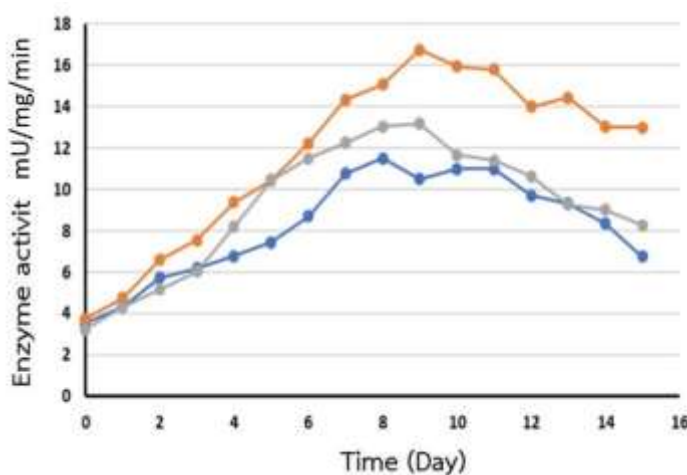


Figure 3 Effect of enzyme activity values from crude extracted chitinase bacteria in MMCT liquid medium

Mark red, gray and blue indicate the NC-04, SC-08 and PC-08 isolate enzyme activity, respectively.

จาก Figure 3 เห็นได้ว่า การทำงานของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMCT ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยวิเคราะห์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้ง ไอโซเลท NC-04 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 16.746 ± 0.0197 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ เชื้อแบคทีเรียที่ได้

จากปุ๋ยน้ำโคโตซาน ไอโซเลท SC-08 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดในวันที่ 9 เท่ากับ 13.173 ± 0.098 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ และเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากน้ำหมักขยะเปลือกกุ้งจากร้านหมูกระทะไอโซเลท PC-08 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดในวันที่ 8 เท่ากับ 11.493 ± 0.003 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของกิจกรรมในแต่ละไอโซเลท

ผลของลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรีย เช่น สี โครงสร้าง ขนาด และรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการย้อมสีแกรม จากลักษณะลักษณะสัณฐานวิทยาของ

แบคทีเรียที่แยกได้จากไอโซเลท NC-04 พบว่าแบคทีเรียจากไอโซเลท NC-04 มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแดงซึ่งเป็นสีของ Safranin เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (Figure 4)

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct. (%)
NR_117677.1	Acinetobacter baumannii	1515	6	1473	96	2628	0.0	1455/1468	99

Figure 4 Isolation results of bacteria isolated from NC-04 isolates

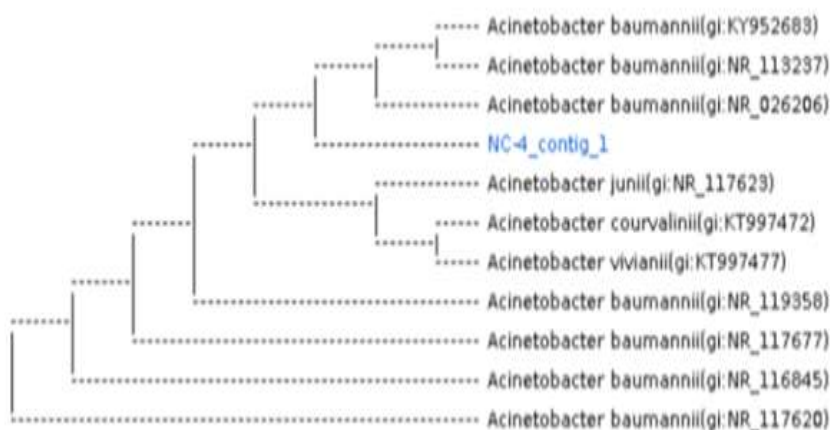


Figure 5 Phylogenetic tree chart bacteriological classification of bacteria isolated from NC-04 isolates

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยคัดเลือก จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด มาสกัด DNA สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อในส่วน 16S rDNA ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (Agarose gel electrophoresis) ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) โดยใช้ Primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') กับ 1522R (5'-AAGGAGGTGAT CCRCCGCA-3') นำ PCR Product ที่ได้ มาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น จากนั้นนำ PCR product ของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วย GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit และ นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน ของ ยีน 16S rRNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์รหัส

NC-04 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ร้อยละ 99 ซึ่ง *Acinetobacter baumannii* มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่นมันวาว เป็นแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ เรียงต่อกัน (Figure 4 and 5)

ผลการเปรียบเทียบการสกัดโคโคซานด้วยวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียกับวิธีการทางเคมี

การเปรียบเทียบกระบวนการสกัดทางชีวภาพ ที่อาศัยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งน้ำหมักโคโคซาน (B) กับกระบวนการทางเคมีที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (A) และปุ๋ยน้ำโคโคซานที่ทำการผลิตจากบริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอฟอส จำกัด (C) โดยเปรียบเทียบระหว่างค่าร้อยละการกำจัดหน่อชะทิล ร้อยละการละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของโคโคซาน กิจกรรมเอนไซม์ และค่า pH

Table 2 Comparison of biological processes with bacteria and separated chemical processes using sodium hydroxide digestion method

Method	Condition	Acetic group Removal	Water solubility (W/W)	Percentage of yield (%W/W)	Enzyme activity (mU/mg/min)	pH
A	Control (NaOH)	0.997±0.000	35.592±1.166 ^a	3.974±0.001	0.032±0.005 ^d	4.6
B	<i>A. baumannii</i> (NC-04)	0.957±0.208	6.426±3.545 ^c	3.962±0.002	0.043±0.017 ^a	3.7
C	Chitosan liquid fertilizer	0.987±0.125	16.961±1.130 ^b	3.963±0.001	0.028±0.001 ^c	4.7
F-test		ns	*	ns	*	

Mean ± standard deviation; * = There was no significant difference at the level of confidence (p≤0.05).

The mean values indicated by different characters were statistically different from the DMRT methods.

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการเปรียบเทียบกระบวนการทางชีวภาพด้วยวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียกับกระบวนการทางเคมีด้วยวิธีการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปุ๋ยน้ำไคโตซานเทพขจีออร์แกนิกจากบริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด (Table 2) ร้อยละการกำจัดหุ่อะซิทีล ร้อยละการละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของไคโตซาน กิจกรรมเอนไซม์ และ pH ($p \leq 0.05$) พบว่าร้อยละการกำจัดหุ่อะซิทีลสูงที่สุดในวิธีการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 0.997 ± 0.000 รองลงมาเป็นปุ๋ยน้ำไคโตซานที่ทำการผลิตตามวิธีของบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด เท่ากับ 0.987 ± 0.125 และวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อไอโซเลท NC-04 ที่ให้ค่าเอนไซม์มากที่สุดในการทดสอบในอาหารเหลว ซึ่งให้ค่าร้อยละการกำจัดหุ่อะซิทีล เท่ากับ 0.9570 ± 0.2081 เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ร้อยละการละลายน้ำสูงที่สุดในวิธีการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 35.592 ± 1.166 น้ำหนัก/น้ำหนัก รองลงมาเป็นวิธีของบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด เท่ากับ 16.961 ± 1.130 น้ำหนัก/น้ำหนัก และวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อไอโซเลท NC-04 ซึ่งให้ค่าสถานะร้อยละการละลายน้ำ เท่ากับ 6.426 ± 3.545 น้ำหนัก/น้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ร้อยละการผลิตของไคโตซานสูงที่สุดในวิธีการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 3.974 ± 0.001 น้ำหนัก/น้ำหนัก รองลงมาเป็นวิธีของบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด เท่ากับ 3.963 ± 0.001 น้ำหนัก/น้ำหนัก และวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อไอโซเลท NC-04 ซึ่งให้ค่าร้อยละการผลิตของไคโตซาน เท่ากับ 3.962 ± 0.002 น้ำหนัก/น้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สถานะการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์วิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อไอโซเลท NC-04 ที่ให้ค่าเอนไซม์มากที่สุดในการทดสอบในอาหารเหลว เท่ากับ 0.043 ± 0.608 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ มีค่า pH

เท่ากับ 3.7 วิธีการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์มีสถานะของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.032 ± 0.301 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ มีค่า pH เท่ากับ 4.6 และวิธีของบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด มีสถานะของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.028 ± 0.400 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที่ มีค่า pH เท่ากับ 4.7 เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งในกระบวนการทางเคมีด้วยวิธีการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปุ๋ยน้ำไคโตซานเทพขจีออร์แกนิกจากบริษัทซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด มีอิทธิพลต่อร้อยละการกำจัดหุ่อะซิทีล ร้อยละการละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของไคโตซาน และ pH ที่ใกล้เคียงกัน และมีอิทธิพลได้มากกว่ากระบวนการทางชีวภาพด้วยวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากแหล่งขยะเปลือกกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในการสกัดไคโตซาน พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 39 ไอโซเลทจากปุ๋ยน้ำไคโตซาน (จากบริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด) 11 ไอโซเลท น้ำหมักไคโตซานจากเปลือกกุ้ง (บริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด) 12 ไอโซเลท และน้ำหมักเปลือกกุ้งจากร้านหมูกระทะ (ร้านหมูกระทะเวรณิบาร์บิคว) 15 ไอโซเลท และนำมาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Chitin selective agar เพื่อทดสอบการทำงานของเชื้อแบคทีเรียจากวงสไลต์ที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ทำการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของวงสไลต์ที่สุดพบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลท ซึ่งพบว่าในการใช้เปลือกกุ้งมาทำการการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากของเสีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Chatdamrong (1996) ที่สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินแหล่งต่าง ๆ ได้เชื้อ 69 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

และสามารถสกัดโคโตซานโดยการย่อยโคตินบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวได้ดีที่สุดมี 3 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกเป็น *Pseudomonas saccharophila*, *Bacillus* sp. และ *Serratia* sp. ตามลำดับ การคัดเลือกเก็บโคโลนีเชื้อแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการ Steak plate ลงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37°C.

การศึกษาลักษณะการสกัดของแบคทีเรียในการสกัดโคโตซาน โดยทำการทดสอบในอาหารเหลว MMCT ผลการทดสอบพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลทมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งตัวอย่างทั้ง 3 แหล่ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้ง (บริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด) รหัส NC-04 ให้ค่าเฉลี่ยในการย่อยโคตินได้ดีที่สุด และมีประสิทธิภาพในการสกัดโคโตซานได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jongjeen (2010) และทำการคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. จากดินบริเวณที่ทิ้งขยะ เขตอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี ทำการทดสอบการผลิตโปรตีนและโคตินบนอาหารจำเพาะสูตร Chitin selective agar pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์จากวงใสที่ปรากฏ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส พบว่า *Bacillus* spp. สามารถเจริญได้ดี

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโคโตซานระหว่างกระบวนการทางเคมีด้วยวิธีการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกระบวนการทางชีวภาพ พบว่าสถานะในการผลิตร้อยละการกำจัดหมู่อะซิทธิล สถานะของร้อยละการละลายน้ำ สถานะร้อยละการผลิตของโคโตซาน วิธีการทางเคมีได้ผลดีกว่าวิธีการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแบคทีเรียรหัส NC-04 แต่การทดสอบด้วยเอนไซม์ในอาหารเหลวด้วยวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เชื้อแบคทีเรียรหัส NC-04 สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อทำการนำเชื้อที่สามารถแยกได้ไป

วิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยาพบว่า เชื้อแบคทีเรียรหัส NC-04 มีลักษณะพื้นฐานวิทยาดูตรงกับ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะของโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน มีรูปทรงก้านสั้น

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสกัดโคโตซานจากขยะเปลือกกุ้ง พบจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากน้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุด เท่ากับ 16.746 ± 0.019 ยูนิต/มิลลิกรัม/นาที เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมีพบว่า การผลิตโคโตซานที่น้อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าการกำจัดหมู่อะซิทธิล การละลายน้ำ ร้อยละผลผลิตของโคโตซาน และค่า pH มากกว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแหล่งขยะเปลือกกุ้งอื่นๆ (ปุ๋ยน้ำโคโตซาน น้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้ง และน้ำหมักโคโตซานจากขยะเปลือกกุ้งร้าน หมูกระทะ) เมื่อนำไอโซเลทที่คัดแยกได้จากน้ำหมักโคโตซานจากเปลือกกุ้งไปวิเคราะห์ลักษณะพื้นฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะของโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน มีรูปทรงก้านสั้น และเมื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยวิธี Sanger sequencing พบว่าไอโซเลทดังกล่าวตรงกับ *Acinetobacter baumannii* ร้อยละ 99 อย่างไรก็ตามวิธีการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียในการสกัดโคโตซานเพื่อเพิ่มมูลค่าของขยะเปลือกกุ้ง และยังเป็น การนำเอาของเสียในอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์ตามหลัก BCG model เพื่อให้การผลิตโคโตซานด้วยวิธีทางชีวภาพยังคงต้องมีการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น้ำหมักโคโตซาน ปุ๋ยน้ำโคโตซาน จากบริษัท ซีอาร์-วัน ไบโอพลัส จำกัด และขยะเปลือกกุ้ง

จากร้านหมูกระทะเวรณีย์บาร์บีคิว ในอำเภอรองขวาง จังหวัดแพร่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการศึกษานี้ ทำให้การวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Brzezinska, M.S. and W. Donderski. 2001. Occurrence of chitinolytic bacteria in water and bottom sediment of Eutrophic lakes in ławskie lake district. **Polish Journal of Environmental Studies** 10(5): 331-336
- Chatdamrong, W. 1996. **Isolation and Selection of Microorganisms for Production of Chitinolytic Enzymes.** Master Thesis. Prince of Songkla University. 191 p. [in Thai]
- Gomez, P., R. Ratcliff, A. Thapar, G. McKoon. and L. Aging. 2004. CRR1, a gene encoding a putative transglycosidase, is required for proper spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology** 150(10): 3269-3280.
- Jongjeen, J. 2010. Screening of proteolytic and Chitinolytic *Bacillus* spp. isolated from soil. **Agricultural Sci. J.** 41(3): 317-320. [in Thai]
- Patil, T. and L. Paknikar. 2000. First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. **Microbiological Research** 167(5): 262-269.
- Pensiri, S. 2011. **Chitosan Extraction Using Chemical Methods.** Nontaburi: School of Science and Technology Department, Sukhothai Thammathirat University. 15 p. [in Thai]
- Souze, C., E.M. Burbano-Rosero, B. Almeida, G. Martins, L. Albertini and I.G. Rivera. 2009. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25(11): 2079-2082.
- Tomee, J.F., A.T. Wierenga, P.S. Hiemstra and H.K. Kauffman. 1997. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. **J. Infect. Dis.** 176: 300-303. DOI: 10.1086/517272.