ชื่อวิทยานิพนธ์	กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารของไคโตแซน จากเปลือกหัวกุ้งกุลาดำ
ผู้เขียน	นางสาว อรพรรณ ริยาพันธ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2545

บทคัดย่อ

การเตรียมไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำโดยกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติลด้วย 50% NaOH ภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ เป็นเวลา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง พบว่า ไคโตแซนที่ได้จะมีน้ำหนักโมเลกุล 384, 1500, 2470; 4200, 4900 และ 5260 kDa ตามลำดับ และมีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (%DD) เป็น 35.67, 74.80, 74.19; 63.91, 65.41 และ 68.28 ตามลำดับ ไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงที่สุด คือ 74.80 ขณะที่ไคโตแซนที่ได้จากสภาวะสุญญากาศที่เวลา 1 ชั่วโมง เท่ากัน จะมีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 65.41

เมื่อนำไคโตแซนทั้งหมดที่เตรียมได้จากทั้ง 2 สภาวะบรรยากาศ ไปใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* โดยใช้ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เป็นเกณฑ์วัดและเปรียบเทียบประสิทธิภาพผลการยับยั้ง ความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซนที่นำมาพิจารณาจะอยู่ในช่วง 39.06 ถึง 1250 พีพีเอ็ม ซึ่งผลการทดสอบพบว่า ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล โดยไคโตแซนที่เตรียมภายใต้บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือ มีค่า MIC ต่ำสุดคือ 625 พีพีเอ็ม สำหรับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* และ 312.5 พีพีเอ็ม สำหรับยีสต์ *C. albicans*

การใช้วิธีการทางเคมี คือ ใช้ H_2O_2 ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ ย่อยไคโตแซนจะทำให้ได้ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 3260, 157, 3.17 และ

0.236 kDa ตามลำดับ ซึ่งไคโตแซนที่ได้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ *C. albicans* ได้สูงขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลง ในขณะที่ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ของโอลิโกเมอร์ไคโตแซนไม่แตกต่างกับไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย ส่วนการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสายโซ่ไคโตแซนให้มีขนาดเล็กลง พบว่า เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด อันได้แก่ เอนไซม์ไลโซไซม์, ไคติเนสและเอนไซม์ปาเปน มีผลช่วยลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนได้โดยพิจารณาจากค่าความหนืดที่ลดลง ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน แต่ต้องใช้เวลาค่อนข้างนานถึง 1 สัปดาห์จึงจะเห็นผลความแตกต่างของค่าความหนืดได้ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามค่า MIC ของการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (*E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans*) ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ต่างๆ ดังกล่าวก็ยังคงไม่ดีกว่าหรือแตกต่างไปจากค่า MIC ของ native chitosan

การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน พบว่า กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ขณะที่ DMSO และ propylene glycol เป็นตัวทำละลายที่ไม่สามารถละลายไคโตแซนได้ กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจะเกิดขึ้นได้ดีที่สภาวะพีเอชเป็นกรด ช่วง 4.5-6.0 และกระบวนการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 72 (pasteurization), 100 (boiling) และ 121 องศาเซลเซียส (sterilization) เป็นเวลา 15 นาที ก็ไม่มีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนเสียไปเลย

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร 9 ชนิด (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *P. fluorescens*, *Salmonella* sp., *Lactobacillus* sp., *C. albicans*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp.) ของ native chitosan และไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 70, 80 และ 90 พบว่า ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 90 จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 9 ชนิดโดยรวมดีที่สุด รองลงมาคือ ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 80, native chitosan ที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 74.80 และไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 70 ตามลำดับ โดยค่า MIC ที่ได้จะมีหลากหลายแตกต่างๆ กันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราจะถูกยับยั้งโดยไคโตแซนได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลอง พบว่า *Penicillium* sp. จะไวต่อการ

ยับยั้งโดยไคโตแซนมากที่สุด ค่า MIC ที่ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้เท่ากับ 39.06 พีพีเอ็ม ขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* sp. จะมีความทนทานต่อการยับยั้งของไคโตแซนได้ดีที่สุด ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซน >1250 พีพีเอ็ม จึงจะยับยั้งได้

การศึกษาภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชันของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังเติมไคโตแซน พบว่า ก่อนเติมไคโตแซนเซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่ง ปกติเซลล์แต่ละเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน (Homogeneous) แม้จะมีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 0.06 อยู่ด้วยก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในขณะที่หลังการเติมไคโตแซนความเข้มข้น 625 พีพีเอ็มลงไป พบว่า เซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเปลี่ยนแปลง บางเซลล์จะเห็นผนังเซลล์เกิดรูรั่วและมีปริมาณไซโตพลาสซึมหรือสารบางอย่างภายในเซลล์รั่วไหลออกมานอกเซลล์และบางเซลล์ปริมาณไซโตพลาสซึมจะเกิดการกระจายแยกออกจากชั้นผนังเซลล์ พื้นผิวเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* โดยวิธีการนับจำนวนด้วยวิธี plate count ที่ความเข้มข้นของไคโตแซน (native chitosan) เป็น 156.25-1250 พีพีเอ็ม พบว่า ทุกความเข้มข้นของไคโตแซนที่ทดสอบสามารถลดจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วและไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์เลยในเวลา 6 ชั่วโมงหลังการบ่ม ส่วนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell line ของไคโตแซนที่ความเข้มข้นช่วง 0.1-1.5 มก/มล ผลที่พบยืนยันได้ว่าไคโตแซนที่ใช้ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.1-1.5 มก/มล ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ใหญ่ของคน

Thesis Title	Antimicrobial Activity of Chitosan from Black Tiger Shrimp Carapace (*Penaeus monodon*) Against Food-Related Microorganisms
Author	Miss Oraphan Riyaphan
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2002

Abstract

Chitosan was prepared from black tiger shrimp carapace by deacetylation process performing in 50% NaOH at 100±20 °C under atmosphere and vacuum. The reaction was carried on under such conditions for 0.5, 1.0 and 2.0 hours. Chitosan obtained from 0.5, 1.0 and 2.0 hours of deacetylation under vacuum, atmosphere and nitrogen flux had exhibited molecular weights of 384, 1500, 2470; 4200, 4900 and 5260 kDa; respectively. The percentages of degree of deacetylation (%DD) of chitosans were 35.67, 74.80, 74.19; 63.91, 65.41 and 68.28%, respectively. Chitosan obtained from deacetylation under atmosphere for 1 hour showed the highest %DD of 74.80, whereas those prepared under vacuum exhibited 65.41.

Antimicrobial activities of all chitosans obtained under conditions above were evaluated against *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and presented in terms of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values. The antimicrobial activities of chitosans were examined at concentrations of 39.06 to 1250 ppm. The inhibitory activity increased when degree of deacetylation increased. Chitosan obtained from

1.0 hour of deacetylation under atmosphere showed the lowest MIC value of 625 ppm against *E. coli* and *S. aureus* while *C. albicans* was inhibited at MIC value of 312.5 ppm. The hydrolyzed chitosans obtained from reaction with 0, 5, 10 and 25 mM H_2O_2 had exhibited molecular weight of 3260, 157, 3.17 and 0.236 kDa; respectively. These hydrolyzed chitosans were not as inhibitory against *E. coli* and *S. aureus* as the native one, yet the inhibitory activity against *C. albicans* increased with the reduction of MW. Degradation of chitosan by enzymes (lysozyme, chitinase and papain) can be decreased the MW, but must used a long time for hydrolysis. However, chitosan hydrolysates obtained from reaction with all enzymes were not as inhibitory as native chitosan.

As a chitosan solvent, 1% acetic acid was effective in inhibiting the growth of all microorganism tested. The antimicrobial activity of chitosan was also effected by pH, with the greatest activity being found at acidic pH values (4.5-6.0). Temperature at 72 ^{o}C (pasteurization), 100 ^{o}C (boiling) and 121 ^{o}C (sterilization) for 15 min had not influence on the antimicrobial activity of chitosan, so can be used chitosan as a food preservative in foods that must passing these heat processes.

Comparision of antimicroial activity of native chitosan with commercial chitosan found that commercial chitosan with 90%DD showed the greatest activity followed by commercial chitosan with 80%DD, native chitosan and commercial chitosan with 70%DD; respectively. The MIC of both native chitosan and commercial chitosan were various depending on type of organisms, chitosan antimicrobial action is more on fungi than bacteria.

TEM analysis of *E. coli* before and after treatment with chitosan found that the cell surface and cytoplasm in control cells appeared uniform and homogeneous. Cells treated with 625 ppm of chitosan had marked morphological changes. In several cells, the cytoplasmic contents appeared to separate from the cell envelope. In the other cells, breakage of the cell envelope and leakage of cytoplasmic contents were observed.

Studying numbers of viable cells (*E. coli, S. aureus* and *C. albicans*) were determined for final chitosan concentrations of 1250, 625, 312.5 and 156.25 ppm. Compared to control, the growth of *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* were inhibited by all levels of chitosan. The numbers of viable cells quickly decreased and the organisms were completely inactivated after 6 h of incubation. Cytotoxic assay of chitosan was evaluated towards HT-29 human colon adenocarcinoma cell line at various concentrations (0.1-1.5 mg/ml). All the chitosan tested (native chitosan and commercial chitosan with 90%DD) displayed significantly non- toxic.