บทที่ 3
ผลและวิจารณ์

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ, ไคตินและไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

วัตถุดิบเริ่มต้นที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ให้ผลผลิตเท่ากับ 4.60% ของน้ำหนักเปียกจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ หรือคิดเป็น 10.75% ของน้ำหนักเปียกจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำหลังแกะเนื้อทำความสะอาด และคิดเป็น 36.51% ของน้ำหนักแห้งจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำหลังอบ สำหรับการเตรียมไคตินจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ พบว่า ให้ผลผลิตเท่ากับ 19.31% ของน้ำหนักแห้งจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำบด ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลผลิตจากการเตรียมวัตถุดิบเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ

Table 5 Production yield of black tiger shrimp head material from raw material preparation

Steps of preparation	Wet weight (kg)	% yield
Raw material	50.00	100.00
Evisceration	21.40	42.80
Drying	6.30	12.60[a] 29.44[b]
Sizing	2.30	4.60[a] 10.75[b] 36.51[c]
Chitin	0.44	0.89[a] 2.05[b] 7.04[c] 19.31[d]

[a] Base on weight percentage of black tiger shrimp head material.

[b] Base on weight percentage of evisceration.

[c] Base on weight percentage of drying. [d] Base on weight percentage of sizing.

ส่วนไคโตแซนที่เตรียมได้จากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำภายใต้สภาวะบรรยากาศและเวลาต่างๆ กัน พบว่า ให้ปริมาณผลผลิตที่แตกต่างกัน โดยไคโตแซนที่เตรียมได้จากสภาวะบรรยากาศปกติ และสุญญากาศ เป็นเวลา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเท่ากับ 88.73, 69.70, 78.34; 74.94, 71.47 และ 72.47% ตามลำดับ จากการคิดคำนวณต้นทุนการผลิตไคโตแซนที่สภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ เป็นเวลา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง โดยคิดจากปริมาณสารเคมีที่ใช้ ราคาของต้นทุน (บาท)/กรัมของไคโตแซนที่ได้เท่ากับ 1.65, 2.10, 1.87; 1.95, 2.05 และ 2.04 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลผลิตไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำภายใต้สภาวะบรรยากาศและเวลาต่างๆ กัน

Table 6 Production yield of chitosan prepared from *P. monodon* under various conditions of deacetylation process

Deacetylation conditions	Time (h)	% yield (dry basis)*	Capital (Bath)/g of chitosan
atmosphere	0.5	88.70 ± 3.21^{A}	1.65
	1.0	69.70 ± 2.75^{C}	2.10
	2.0	78.34 ± 1.91^{B}	1.87
vacuum	0.5	74.94 ± 0.98^{C}	1.95
	1.0	71.47 ± 0.84^{C}	2.05
	2.0	72.47 ± 1.93^{C}	2.04

[A-C] Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

* Mean $\pm$SD from triplicate determinations.

3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีบางประการของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิติล จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะ

บรรยากาศและเวลาต่างๆ กัน พบว่า ไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะสุญญากาศจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ ซึ่งเมื่อใช้ระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะสุญญากาศนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อใช้เวลา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้ขัดกับการรายงานของ Bough และคณะ (1978; อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2536) และของ Wu และ Bough (1978; อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2536) ที่พบว่า การใช้ระยะเวลากำจัดหมู่อะซิติลมากขึ้นจะส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนลดลง

เมื่อนำไคโตแซนที่เตรียมได้ทั้งหมดจากภายใต้สภาวะบรรยากาศและเวลาต่างๆ กันๆไปวิเคราะห์หาระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (%DD) พบว่า ไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ จะมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สุญญากาศ โดยไคโตแซนที่เตรียมจากสภาวะบรรยากาศปกติ 1.0 ชั่วโมง จะให้ค่าร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงที่สุด คือ 74.80 ขณะที่ไคโตแซนที่เตรียมจากสภาวะสุญญากาศที่เวลา 1.0 ชั่วโมงเท่ากันจะมีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 65.40

ตารางที่ 7 น้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำภายใต้สภาวะต่างๆ

Table 7 Molecular mass and degree of deacetylation of chitosan prepared under various conditions

Deacetylation conditions	Time (h)	Molecular weight* (kDa)	Degree of deacetylation (%DD)*
atmosphere	0.5	345±67.85 ^{C}	35.67±0.438^{C}
	1.0	1500±269.12^{B}	74.80±1.029^{A}
	2.0	2470±611.19^{B}	74.19±0.53^{A}
vacuum	0.5	4200±513.05^{A}	63.91±0.83^{B}
	1.0	4950±1189.71^{A}	65.41±0.62^{B}
	2.0	5260±1490.74^{A}	68.28±0.24^{B}

$^{A-C}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

* Mean ±SD from triplicate determinations.

3.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศและเวลาต่างๆ กัน ให้ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) อยู่ในช่วง >1250 ถึง 312.5 พีพีเอ็ม โดยไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ เป็นเวลา 1.0 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ ให้ค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะอื่นๆ (ดังแสดงในรูปที่ 6) ค่า MIC ของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* ที่ได้คือ 625, 625 และ 312.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุที่อาจส่งผลให้ไคโตแซนที่เตรียมได้จากสภาวะดังกล่าว มีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือ การที่มีคุณสมบัติทางเคมี อันได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิติลที่เหมาะสมต่อการยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่าไคโตแซนที่เตรียมได้จากสภาวะบรรยากาศและเวลาอื่นๆ ซึ่งจากตารางที่ 8 จะเห็นว่าไคโตแซนที่เตรียมใน

สภาวะบรรยากาศปกติที่เวลา 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง มีค่าร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลที่ต่างกันเล็กน้อยคือ 74.80 และ 74.19 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะสุญญากาศที่เวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปกติ ที่เวลา 1.0 ชั่วโมง สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะเดียวกันที่เวลา 2.0 ชั่วโมง ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากขนาดโมเลกุลไคโตแซนที่แตกต่างกัน

แต่อย่างไรก็ตาม ต้องมีการศึกษากันต่อไป เพื่อยืนยันผลและหาเหตุผลมาสนับสนุนข้อสมมุติฐานนี้ ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงทำการศึกษาผลของการลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำโดยวิธีทางเคมีและวิธีการใช้เอนไซม์ต่างๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อหาความสัมพันธ์ของน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ โดยจะเลือกใช้ไคโตแซนที่เตรียมได้จากสภาวะบรรยากาศปกติ เป็นเวลา1.0 ชั่วโมง เป็นไคโตแซนเริ่มต้น (native chitosan)

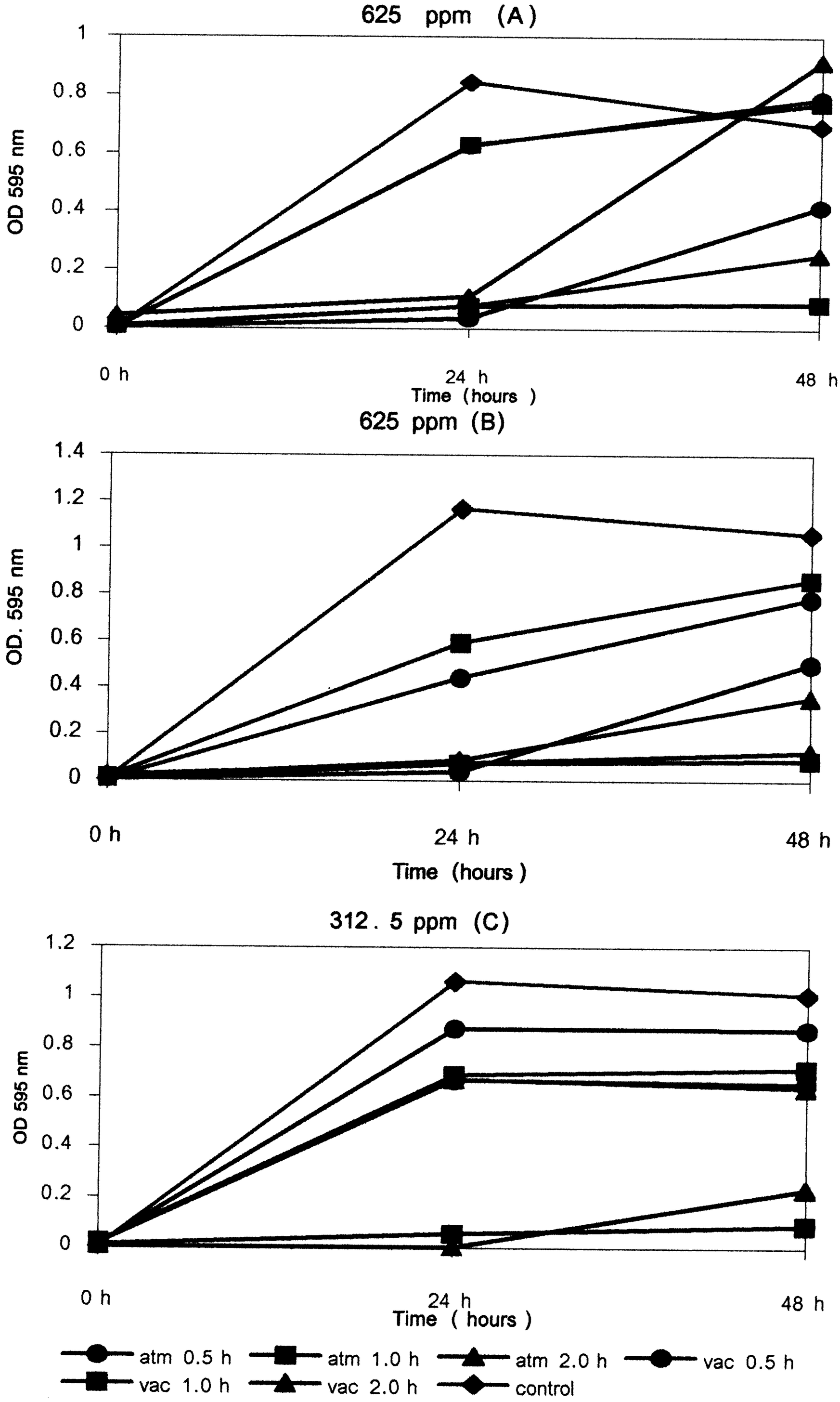
ตารางที่ 8 ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศและเวลาต่างๆ

Table 8 Antimicrobial effects of chitosans prepared under various deacetylation processes on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

Deacetylation conditions	Time (h)	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
atmosphere	0.5	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$
	1.0	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{C,b}$
	2.0	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{C,c}$
vacuum	0.5	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$
	1.0	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$
	2.0	$625^{B,b}$	$625^{B,b}$	$>1250^{A,a}$

$^{A-C}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-c}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).



รูปที่ 6 ผลของไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ(ชมพู) และสุญญากาศ (เขียว) ที่เวลา 0.5 (●), 1.0 (■) และ 2.0 (▲) ชม. ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ (A) *E. coli,* (B) *S. aureus* และ (C) *C. albicans* โดยมีชุดควบคุมเป็น 0.06% กรดอะซิติก (ส้ม), (◆)

Figure 6 Effect of chitosan deacetylated under atmosphere (pink) and vacuum (green) for 0.5 (●), 1.0 (■) and 2.0 (▲) hour on (A) *E. coli,* (B) *S. aureus* and (C) *C. albicans*. Control was 0.06% acetic acid (orange), (◆)

3.4 การศึกษาผลของการลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนโดยวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ต่างๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ

3.4.1 วิธีทางเคมี: ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเหล็กไอออน

จากผลการศึกษาการลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนโดยวิธีทางเคมี โดยใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเหล็กไอออน พบว่า การใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถย่อยไคโตแซนไปเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลงได้อย่างเห็นผลชัดเจนภายในเวลา 18 ชั่วโมง โดยน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้

ไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ จะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 3260 , 157, 3.17 และ 0.236 kDa ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9 ส่วนผลของกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า ไคโตแซนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงสามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้ดีขึ้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Hirano และ Nagao (1989) ที่พบว่า ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะให้ผลการยับยั้งเชื้อราและยีสต์ดีกว่าไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E. coli* และ *S. aureus* ผลที่ได้จะไม่มีความแตกต่างกับ native chitosan อย่างไรก็ตามการย่อยไคโตแซนด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นการย่อยแบบสุ่ม โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันส่งผลให้การย่อยเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ แต่อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซนได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกลุ่มคาร์บอกซิลหรือการกำจัดหมู่เอมีนออกจากสายโซ่ไคโตแซน (Nordtveit *et al.*, 1994)

ดังนั้นการย่อยไคโตแซนโดยวิธีทางเคมีจึงไม่ได้รับความนิยมมากนักที่จะนำมาใช้จริง เนื่องจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการย่อยอาจมีผลทำให้เกิดโรคหรือเป็นพิษต่อมนุษย์ได้หากได้รับเข้าไป (Chang *et al.*, 2001) และแนวโน้มความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงศักยภาพของกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็มีขีดจำกัดและมีความหลากหลาย เนื่องจากไม่สามารถควบคุมหรือกำหนดให้เกิดการย่อยได้อย่างจำเพาะเจาะจงและได้ขนาดของน้ำหนักโมเลกุลของ

ไคโตแซนที่เท่ากันทุกครั้งตามต้องการ ด้วยเหตุผลนี้จึงได้ทำการทดลองย่อยไคโตแซนด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ต่างๆ เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง และมีความจำเพาะมากกว่า อีกทั้งไม่เกิดผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการด้วย (Rhoades and Roller, 2000)

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Table 9 Antimicrobial effect of hydrolyzed chitosan prepared by using H_2O_2 on *E. coli* *S. aureus* and *C. albicans*

Concentration of H_2O_2	Molecular weight (kDa) *	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0 mM	3260 ± 734.95^{A}	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	$312.5^{A,b}$
5 mM	157 ± 64.94^{B}	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	$156.25^{B,b}$
10 mM	3.17 ± 0.21^{C}	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	$78.125^{C,b}$
25 mM	0.236 ± 0.06^{D}	$1250^{A,a}$	$625^{A,b}$	$78.125^{C,c}$

$^{A-D}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

$^{a-c}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P < 0.05$).

* Mean ±SD from triplicate determinations.

3.4.2 วิธีการใช้เอนไซม์ต่างๆ : เอนไซม์ไลโซไซม์

ผลของค่าความหนืด (intrinsic viscosity) และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ในสภาวะพีเอชเป็น 5.0 พบว่า ความหนืดของไคโตแซนที่ถูกย่อยจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของเวลาที่ใช้ในการย่อย ความหนืดของไคโตแซนที่ถูกย่อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ค่าความหนืดของไคโตแซนจะลดลงอย่างเห็นผลได้ชัด โดยไคโตแซนที่ใช้เวลาย่อย 1 สัปดาห์ จะมีค่า intrinsic viscosity เป็น 2.45 แตกต่างจากที่เวลา 0 นาทีอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ในส่วนของฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดของไคโตแซน พบว่า ไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* และ *C. albicans* ไม่ต่างจากไคโตแซนที่ผ่านการย่อยด้วยไลโซไซม์

อย่างไรก็ตามไคโตแซนที่ผ่านการย่อยด้วยไลโซไซม์เป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีขึ้นเล็กน้อย คือลดค่า MIC จาก 1250 พีพีเอ็ม เป็น 625 พีพีเอ็ม ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากค่า intrinsic viscosity ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือจากการย่อยมากกว่า 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0)

Table 10 Antimicrobial effect of hydrolyzed chitosan prepared by using lysozyme on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans* (buffer pH 5.0)

Time of Hydrolysis	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0 min	11.13 ± 0.18^{A}	$625^{A,b}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
5 min	10.55 ± 0.02^{B}	$625^{A,b}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
10 min	9.96 ± 0.01^{C}	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
30 min	9.56 ± 0.07^{D}	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
24 hour	9.06 ± 0.03^{E}	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
48 hour	5.82 ± 0.05^{F}	$625^{A,b}$	$625^{C,b}$	$>1250^{A,a}$
72 hour	5.65 ± 0.06^{F}	$625^{A,b}$	$625^{C,b}$	$>1250^{A,a}$
96 hour	4.95 ± 0.02^{G}	$625^{A,b}$	$625^{C,b}$	$>1250^{A,a}$
1 week	2.45 ± 0.02^{H}	$625^{A,b}$	$625^{C,b}$	$>1250^{A,a}$

$^{A-H}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-c}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

* Mean $\pm$SD from triplicate determinations.

3.4.3 เอนไซม์ไคติเนส

จากตารางที่ 11 ผลการใช้เอนไซม์ไคติเนสย่อยสลายสายโมเลกุลของไคโตแซน พบว่า เอนไซม์ไคติเนสสามารถตัดสายโมเลกุลของไคโตแซนได้ โดยพิจารณาจากค่าความหนืด (intrinsic viscosity) ที่ลดลง แต่ผลการย่อยเกิดขึ้นได้มากช้าต้องใช้เวลาถึงสัปดาห์ ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ไคติเนสมีความจำเพาะต่อการตัดสายโมเลกุลตรงตำแหน่งพันธะไกลโคซิดิก ชนิด β (1,4) ที่ลำดับการเรียงตัวของ GlcNAc-GlcNAc หรือ GlcNAc-GlcN แต่ไม่จำเพาะต่อการตัดพันธะนี้ตรงลำดับการเรียงตัวของ GlcN-GlcN ในโมเลกุลของไคโตแซน

ส่วนผลการลดขนาดสายโมเลกุลด้วยเอนไซม์ไคติเนสต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน พบว่า ไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่เวลา 0, 5, 10 และ 30 นาที จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกับ native chitosan แต่เมื่อเพิ่มเวลาการย่อยเป็น 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจะลดน้อยลง และมีค่า MIC สูงขึ้นจาก 625 พีพีเอ็ม เป็น 1250 พีพีเอ็ม สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ 625-1250 พีพีเอ็ม สำหรับยีสต์ *C. albicans* ทั้งๆ ที่ค่าความหนืด (Intrinsic viscosity ,η) ของไคโตแซนลดลงตามการเพิ่มขึ้นของเวลาที่ใช้ในการย่อย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าน่าจะมีปัจจัยอื่นที่เข้ามามีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน โดยอาจจะเป็นปัจจัยของอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยไคโตแซนเพราะการใช้เอนไซม์ไคติเนสย่อยไคโตแซนในการทดลองนี้จะกระทำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลาการย่อย 24 ชั่วโมงขึ้นไป พบว่าจะมีตะกอนลอยอยู่ที่ผิวของสารละลายไคโตแซน ซึ่งอาจเป็นตะกอนของไคโตแซนที่เสื่อมสภาพไปหลังจากที่ใช้เวลาการย่อยนานเกินไปที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หรืออาจเป็นผลของการลดลงของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานได้ที่พีเอชช่วง 4-5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสโดยมี stability อยู่ที่ช่วงเวลาแค่ 20- 40 นาทีแรกหลังการบ่ม จากนั้นกิจกรรมจะลดลง และหากการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์มีผลทำให้พีเอชของสารละลายสูงขึ้นมากกว่าค่า pI ของไคติเนส (4-6) (Ilyina *et al.*, 1999) จะทำให้เกิดสภาวะที่มีประจุลบที่สามารถจับกับประจุบวกของ

ไคโตแซนแล้วเกิดตะกอนขึ้นได้จึงมีผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนลดลงกว่า native chitosan

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส

Table 11 Antimicrobial effect of hydrolyzed chitosan prepared by using chitinase on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

Time of Hydrolysis	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0 min	2.70 ± 0.07^{A}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{C,b}$
5 min	$2.60\pm0.10^{A,B}$	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{C,b}$
10 min	2.38 ± 0.05^{B}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{C,b}$
30 min	1.83 ± 0.45^{C}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{C,b}$
24 hour	0.76 ± 0.09^{D}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$312.5^{C,b}$
48 hour	$0.69\pm0.0.1^{D}$	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$
72 hour	0.67 ± 0.06^{D}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$
96 hour	0.57 ± 0.02^{D}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$
1 week	0.56 ± 0.08^{D}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$

[A-D] Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

[a-b] Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

* Mean $\pm$SD from triplicate determinations.

3.4.4 เอนไซม์ปาเปน

นอกจากเอนไซม์ไลโซไซม์และเอนไซม์ไคติเนสแล้ว เอนไซม์ปาเปนก็เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะทางด้านเภสัชวิทยาและทางด้านการแพทย์ เพราะนอกจากราคาถูกแล้ว (Terbojevich *et al.*, 1996) ยังสามารถหาได้ง่ายจากธรรมชาติอีกด้วย (เช่น เอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอ) แม้ว่าเอนไซม์ปาเปนจะเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส ไม่มี

ความจำเพาะต่อสับเสรทที่เป็นไคตินและไคโตแซน แต่จากการศึกษาของ Muzzarelli และคณะ (1994) ที่ศึกษาการลดขนาดสายโซ่ (depolymerization) ของไคโตแซน โดยใช้เอนไซม์ปาเปน พบว่า ปาเปนมีประสิทธิภาพในการย่อยไคโตแซนได้ด้วย โดยมีปฏิกิริยาที่ตำแหน่งการจับกันระหว่างหน่วยของ glucosamine และ N-acetylglucosamine ด้วย และในการทดลองนี้จะใช้ปาเปนย่อยไคโตแซนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมินี้ก็จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีให้เกิดการย่อยสลายโมเลกุลของไคโตแซนโดยปาเปนได้เช่นกัน

จากผลการทดลอง พบว่า การย่อยไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำโดยเอนไซม์ปาเปนทั้งที่สภาวะพีเอชบัฟเฟอร์เป็น 4.5 และ 5.0 สามารถลดขนาดสายโมเลกุลของไคโตแซนได้ทั้ง 2 สภาวะ โดยพิจารณาจากค่าความหนืด (Intrinsic viscosity, η) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน แต่อัตราการลดของค่าความหนืด (Intrinsic viscosity, η) เกิดขึ้นได้อย่างช้ามาก ต้องใช้เวลาในการย่อยเป็นเวลาถึง 1 สัปดาห์จึงจะเห็นความแตกต่างของค่าความหนืดได้อย่างชัดเจน (ดังแสดงในตารางที่ 12-13)

สำหรับกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่สภาวะพีเอชบัฟเฟอร์ 4.5 พบว่า การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ให้ค่า MIC เท่ากับ 625 และ 312.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ไคโตแซนที่ย่อยแล้วยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่าไคโตแซนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย

ส่วนกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนในสภาวะพีเอชบัฟเฟอร์ 5.0 พบว่า ไคโตแซนที่ถูกปาเปนย่อยเป็นเวลา 5, 10 และ 30 นาที ให้ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกับไคโตแซนที่ยังไม่ถูกย่อย คือ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* มีค่า MIC เท่ากับ 625, 625 และ 312.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ แต่ไคโตแซนที่ถูกย่อยเป็นเวลานานตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* จะลดลง โดยจะมีค่า MIC เป็น 1250 พีพีเอ็ม ทั้ง 2 เชื้อ แต่สำหรับ *C. albicans* แล้วผลการยับยั้งไม่เปลี่ยนแปลง จากตารางที่ 12 และ 13 แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน โดยที่กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พีเอช 4.5 จะสูงกว่าที่พีเอช 5.0

จากการศึกษาผลของการลดขนาดสายโมเลกุลของไคโตแซนทั้งวิธีทางเคมีและวิธีการใช้เอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำที่ผ่านมาทั้งหมด พบว่า การลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนทั้งโดยวิธีการทางเคมีและการใช้เอนไซม์ไม่สามารถที่จะพัฒนาหรือปรับปรุงศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ให้ดีไปกว่า native chitosan ได้ แม้ว่าในวิธีการทางเคมีจะให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *C. albicans* ดีขึ้นกว่า native chitosan ก็ตาม แต่เนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ ดังนั้นการทดลองในหัวข้อต่อไปจึงเลือกไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปกติ 1.0 ชั่วโมง (native chitosan) ไปใช้เป็นไคโตแซนเริ่มต้นในการทดสอบ

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน วิธีการที่ 1 (บัฟเฟอร์พีเอช 4.5)

Table 12 Antimicrobial effect of hydrolyzed chitosan prepared by using papain on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans* in method I (buffer pH 4.5)

Time of Hydrolysis	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0 min	8.42 ± 0.05^{A}	$>1250^{A,a}$	$1250^{A,b}$	$312.5^{A,c}$
5 min	2.21 ± 0.02^{B}	$>1250^{A,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
10 min	2.05 ± 0.03^{B}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
30 min	1.94 ± 0.14^{C}	$1250^{B.a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
24 hour	1.92 ± 0.08^{C}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
48 hour	1.45 ± 0.04^{D}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
72 hour	1.44 ± 0.06^{D}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
96 hour	1.32 ± 0.06^{D}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
1 week	1.13 ± 0.08^{E}	$1250^{B,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$

$^{A-E}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-c}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

* Mean $\pm$SD from triplicate determinations.

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน วิธีการที่ 2 (บัฟเฟอร์พีเอช 5.0)

Table 13 Antimicrobial effect of hydrolyzed chitosan prepared by using papain on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans* in method II (buffer pH 5.0)

Time of Hydrolysis	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (ppm)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0 min	1.96 ± 0.59^{A}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{A,b}$
5 min	1.79 ± 0.08^{A}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{A,b}$
10 min	1.50 ± 0.12^{A}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{A,b}$
30 min	1.43 ± 0.11^{A}	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{A,b}$
24 hour	1.30 ± 0.05^{A}	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$	$312.5^{A,c}$
48 hour	0.97 ± 0.07^{B}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$312.5^{A,b}$
72 hour	0.97 ± 0.10^{B}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$312.5^{A,b}$
96 hour	0.45 ± 0.21^{B}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$312.5^{A,b}$
1 week	0.28 ± 0.11^{C}	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$312.5^{A,b}$

$^{A-C}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-c}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

* Mean $\pm$SD from triplicate determinations.

3.5 การศึกษาการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ละลายด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ 1% กรดอะซิติก, 1% กรดฟอร์มิก, 1% กรดแลกติก, 1% DMSO และ 1% โพรพิลีนไกลคอล ซึ่งพบว่า การใช้ 1% กรดอะซิติกละลายไคโตแซนจะมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้ดีกว่า1% กรดฟอร์มิก และ 1% กรดแลกติก ที่เป็นสารประเภทกรดอินทรีย์เจือจางเหมือนกัน โดยไคโตแซนที่ละลายด้วย1% กรดอะซิติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ได้โดยมีค่า MIC เป็น 625, 625 และ 312.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

อะซิติก, 1% กรดฟอร์มิก, 1% กรดแลกติก, 1% DMSO และ 1% โพรพิลีนไกลคอล ซึ่งพบว่า การใช้ 1% กรดอะซิติกละลายไคโตแซนจะมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้ดีกว่า1% กรดฟอร์มิก และ 1% กรดแลกติก ที่เป็นสารประเภทกรดอินทรีย์เจือจางเหมือนกัน โดยไคโตแซนที่ละลายด้วย1% กรดอะซิติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ได้โดยมีค่า MIC เป็น 625, 625 และ 312.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ในขณะที่1% กรดฟอร์มิก และ 1% กรดแลกติก ต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซน >1250 พีพีเอ็ม จึงจะสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ส่วนเชื้อยีสต์ *C. albicans* พบว่าทั้งกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกให้ผลการยับยั้งที่เท่ากัน คือ มีค่า MIC เท่ากับ 312.5 พีพีเอ็ม แต่ 1% กรดแลกติก ต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายไคโตแซนเป็น 1250 พีพีเอ็ม จึงจะยับยั้งเชื้อยีสต์นี้ได้ แม้ว่าจากการศึกษาผลของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.03-1% โดยปริมาตรต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะพบว่า กรดฟอร์มิกมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้สูงกว่ากรดอะซิติก (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ข-ค) แต่ก็ไม่มีผลส่งเสริมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

ในส่วนตัวทำละลายอีก 2 ชนิด คือ 1% DMSO และ 1% โพรพิลีนไกลคอล ไม่ได้นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่สามารถละลายไคโตแซนได้ ทั้งในรูปสารเข้มข้นหรือเจือจาง ทั้งนี้เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารประเภทสารอนินทรีย์ จึงเป็นตัวยืนยันได้ว่าไคโตแซนไม่สามารถละลายได้ในสารประเภทอนินทรีย์ และจากการทดสอบครั้งนี้ พบว่า 1% กรดอะซิติก และ 1% กรดฟอร์มิก สามารถละลายไคโตแซนได้ดีและเร็วพอๆ กัน แต่ 1% กรดแลกติก ต้องใช้เวลานานกว่าจึงจะสามารถละลายไคโตแซนได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chung และคณะ (2003) ที่กล่าวไว้ว่า ตัวทำละลายกรดอินทรีย์เจือจางที่มีจำนวนโมเลกุลของไฮโดรเจนยิ่งมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายไคโตแซนลดลง

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ

Table 14 Effect of chitosan solvents on antimicrobial activity of chitosan against *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

Solvents	pH	Solubility levels (+, ++, +++)	MIC (ppm)		
			E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
Acetic acid	6.20[1], 5.08[2]	+++	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$312.5^{B,b}$
Formic acid	5.26, 4.07	+++	$>1250^{A.,a}$	$>1250^{A,a}$	$312.5^{B,b}$
Lactic acid	6.44, 5.15	++	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$
Propylene glycol	-	-	ND	ND	ND
DMSO	-	-	ND	ND	ND

ND = Not determined, +++ = readily soluble, ++ = soluble after stirring for 30 min, - = insoluble.

[1] Final pH of MHB.

[2] Final pH of PDB.

[A-B] Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

[a-b] Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

3.6 การศึกษาปัจจัยต่างๆ ของสภาวะแวดล้อมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

3.6.1 ค่าพีเอชต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากตารางที่ 15 ผลของค่าพีเอช (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0) ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจะมีประสิทธิภาพดีเมื่อมีค่าพีเอชต่ำในช่วง 4.5-6.0 โดยจะให้ค่าการยับยั้ง (MIC) ของสารละลาย ไคโตแซนต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (*E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans*) เป็น 156.25 พีพีเอ็ม แต่ที่พีเอชช่วง 3.5-4.0 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้เนื่องจากระดับพีเอชต่ำสุด (minimum pH) ที่แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญได้จะอยู่ในช่วง 4.3-4.7 (Banwart, 1983) ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของ

ไคโตแซนมีแนวโน้มที่จะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอช ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของผู้วิจัยหลายท่าน ที่กล่าวไว้ว่า สภาวะพีเอชเป็นกรดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนได้ แต่อย่างไรก็ตาม แม้ที่ระดับพีเอช 6.5-7.0 จะมีผลทำให้ไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ เกิดความขุ่นขึ้นเล็กน้อย แต่ก็ยังคงมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียเป็น 625 พีพีเอ็ม และ 312.5 พีพีเอ็มต่อเชื้อยีสต์

Tsai และ So (1990) ศึกษาพีเอชในช่วง 5.0-9.0 พบว่า ที่พีเอช 5.0 จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และที่พีเอช 9.0 จะมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ได้น้อยที่สุด

Yun และคณะ (1999) ก็พบว่า ค่า MIC ของไคโตแซนที่สภาวะพีเอช 3.6-3.8 จะต่ำกว่าที่สภาวะพีเอช 5.9-6.0 ถึง 1.4-1.7 เท่า

Wang และคณะ (1992) พบว่า กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนต่อจุลินทรีย์ก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli , S. aureus,Y. enterocolitica L. monocytogenes* และ *S. typhimurium* เกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 5.5 มากกว่า ที่พีเอช 6.5 และจากการทดลองจะสังเกตพบว่า เมื่อค่าพีเอชยิ่งสูงขึ้น ($\geq$7.0) ไคโตแซนจะละลายได้น้อยลงและเกิดการตกตะกอนขึ้น ทั้งนี้เพราะว่าค่า pKa ของไคโตแซนจะอยู่ที่ช่วง 6.1-6.7 และไคโตแซนส่วนมากจะละลายได้ดีในสารละลายกรดอินทรีย์เจือจางที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.0 โดยเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่าค่า pKa จะทำให้กลุ่มเอมีน (NH_2 groups) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C_2) ของ glucosamine residues มีประจุเป็นบวกเกิดการทำปฏิกิริยากับประจุลบบนตำแหน่งพื้นผิวเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ผลที่พบเหล่านี้บ่งบอกได้ว่า การนำไคโตแซนไปประยุกต์ใช้กับอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดจะช่วยให้ประสิทธิภาพของไคโตแซนมีมากขึ้นและดีพอที่จะถูกใช้เป็นสาร natural preservative ได้ การทดลองในหัวข้อต่อๆไปจะเลือกศึกษาที่ระดับพีเอช 5.5 เนื่องจากอาหารโดยทั่วไปมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงนี้

ตารางที่ 15 ผลของค่าพีเอชต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน

Table 15 Effect of pH on antimicrobial activity of chitosan against *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

pH	MIC (ppm)		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
3.5	NG	NG	NG
4.0	NG	NG	$156.25^{B,a}$
4.5	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$
5.0	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$
5.5	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$
6.0	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$	$156.25^{B,a}$
6.5	$625^{A,a}$	$625^{A,a}$	$312.5^{A,b}$
7.0	$625^{A,a}$	$625^{A,a}$	$312.5^{A,b}$

NG = No Growth.

$^{A-B}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-b}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

3.6.2 อุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่ 16 แสดงผลของกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของสารละลายไคโตแซนที่ถูกผ่านความร้อนด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (pasteurization) 100 องศาเซลเซียส (boiling) และ 121 องศาเซลเซียส (sterilization) 15 นาที ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ถูกผ่านความร้อนไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นไคโตแซนที่ไม่ผ่านความร้อน โดยค่า MIC ของไคโตแซนต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดเป็น 156.25 พีพีเอ็ม เท่ากันกับชุดควบคุม ผลที่ได้นี้บ่งบอกได้ว่าอุณหภูมิเหล่านี้ไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน ดังนั้นไคโตแซนจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่ต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนเหล่านี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Roller และ Covill (1999) ที่เคยกล่าว

ไว้ว่ากระบวนการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่า 30 นาทีไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน เช่นเดียวกับ Jarry และคณะ (2001) ที่ศึกษาผลของไอน้ำจากหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ในช่วงเวลาสั้นๆเพียง 10 นาที ต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. stearothermophilus* ของไคโตแซน ก็พบว่ากระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (heat sterilization) ไม่มีผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนลดลง

ตารางที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่างๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน

Table 16 Effect of temperature on antimicrobial activity of chitosan against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*

Temperature (^{o}C)	MIC (ppm)		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
control (no heating)	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$
72	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$
100	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$
121	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$	$156.25^{A,a}$

[A] Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

[a] Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

3.7 การศึกษาผลของไคโตแซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เปรียบเทียบกับไคโตแซนทางการค้า

3.7.1 เปรียบเทียบผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหารของไคโตแซนที่เตรียมได้ (native chitosan) และไคโตแซนบริสุทธิ์ทางการค้าที่มี %DD = 70, 80 และ 90

หลังจากศึกษาและปรับปรุงคุณสมบัติของ native chitosan ให้มีความเหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* แล้ว พบว่าไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมี

1% กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายที่สภาวะพีเอช 5.5 หรือต่ำกว่าให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงนำไคโตแซนที่ได้นี้ไปทดลองดูฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับอาหารอีก 6 ชนิดได้แก่ *B. cereus, P. fluorescens, Salmonella* sp., *Lactobacillus* sp., *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. พร้อมทั้งทำการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 9 ชนิด ของ Native Chitosan กับไคโตแซนทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70,80 และ 90% ด้วย ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 17

ในจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 9 ชนิด ที่นำมาทดลองฤทธิ์การยับยั้งของไคโตแซนทั้ง ชนิด native chitosan และ commercial chitosan พบว่า เชื้อราจะถูกยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shahidi และคณะ (1999) และ Cuero (1999) native chitosan สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* และ *Penicillium* sp. ได้ที่ความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น 78.12 พีพีเอ็ม ยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้ที่ค่า MIC 156.25 พีพีเอ็ม และแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้ที่ค่า MIC เป็น 156.25 พีพีเอ็ม ส่วนแบคทีเรียอีก 4 ชนิดได้แก่ *B. cereus, P. fluorescens, Salmonella* sp. และ *Lactobacillus* sp. ต้องใช้ไคโตแซนความเข้มข้นสูงกว่า 1250 พีพีเอ็ม จึงจะสามารถยับยั้งได้ หากเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารทั้ง 9 ชนิดของไคโตแซน 4 ชนิด อันได้แก่ native chitosan, ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70, 80 และ 90 แล้วพบว่าประสิทธิภาพผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยรวมของไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 90>ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 80> native chitosan ที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 74.80> ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นได้ว่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนมากกว่าขนาดของโมเลกุล ซึ่งยืนยันได้จากการทดลองข้างต้นในหัวข้อ 2.2 (ตารางที่ 9-13) จากรายงานของ Simpson และคณะ (1997) ที่ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนต่อการเจริญของเชื้อ *E.coli* พบว่าไคโตแซนที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 92.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตการเจริญของ *E.coli* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 85 ความเข้มข้นของไคโตแซนทาง

การค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 90 ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีอยู่ในช่วง 39.06-625 พีพีเอ็ม ยกเว้นกรณีของเชื้อ *Salmonella* sp.ที่ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซน >1250 พีพีเอ็ม จึงจะสามารถยับยั้งได้ ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับผลการทดลองของ Wang (1992) ที่พบว่า สารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.5% (5000 พีพีเอ็ม) ไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhimurium* ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซน >0.5% จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า *Salmonella* sp.เป็นจุลินทรีย์กรัมลบที่มีผนังเซลล์ที่มีระบบกลไกที่สามารถป้องกันการเข้าออกของสารแปลกปลอมได้ดี เนื่องจากจะสังเกตเห็นว่าไม่ว่าจะเป็น native chitosan หรือไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70, 80 หรือ 90 ก็ตามต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนสูงกว่า >1250 พีพีเอ็ม จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ ส่วนเชื้ออื่นๆ จะมีค่า MIC ที่หลากหลายกันไป โดยเชื้อรา *Penicillium* sp. จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อฤทธิ์การยับยั้งของไคโตแซนมากที่สุด โดยมีค่า MIC เป็น 39.06 พีพีเอ็ม ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเชื้อรา *Penicillium* sp. มีผนังเซลล์ที่สามารถดูดซึมสารละลายไคโตแซนได้รวดเร็ว ทำให้เซลล์เกิดการบวมขึ้นและเซลล์แตกได้ในที่สุด (Sagoo *et al.*, 2002)

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหารของไคโตแซนที่เตรียมได้ (native chitosan) และไคโตแซนทางการค้าที่มี %DD = 70, 80 และ 90

Table 17 Antimicrobial activity of native chitosan and commercial chitosans with 70%DD, 80%DD and 90%DD against tested microorganisms

Microorganisms	MIC (ppm)			
	Native chitosan	Com. Chitosan (%DD = 70)	Com. Chitosan (%DD = 80)	Com. Chitosan (%DD = 90)
E. coli	$156.25^{B,b}$	$625^{C,a}$	$156.25^{D,b}$	$78.12^{D,c}$
S. aureus	$156.25^{B,b}$	$1250^{B,a}$	$156.25^{D,b}$	$156.25^{C,b}$
P. fluorescens	$>1250^{A,a}$	$625^{C,b}$	$312.5^{C,c}$	$78.12^{D,d}$
B. cereus	$>1250^{A,a}$	$1250^{B,b}$	$312.5^{C,c}$	$78.12^{D,d}$
Salmonella sp.	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
Lactobacillus sp.	$>1250^{A,a}$	$625^{C,b}$	$625^{B,b}$	$625^{B,b}$
A. niger	$78.12^{C,a}$	$39.06^{E,b}$	$78.12^{E,a}$	$78.125^{D,a}$
Penicillium sp.	$78.12^{C,a}$	$39.06^{E,b}$	$78.12^{E,a}$	$39.06^{E,b}$
C. albicans	$156.25^{B,b}$	$312.5^{D,a}$	$156.25^{D,b}$	$156.25^{C,b}$

$^{A-E}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P< 0.05$).

$^{a-d}$ Means with different superscripts within the same row indicate significant difference ($P< 0.05$).

3.7.2 ศึกษาอัตราการตายของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบโดยนับจำนวนด้วยวิธี plate count

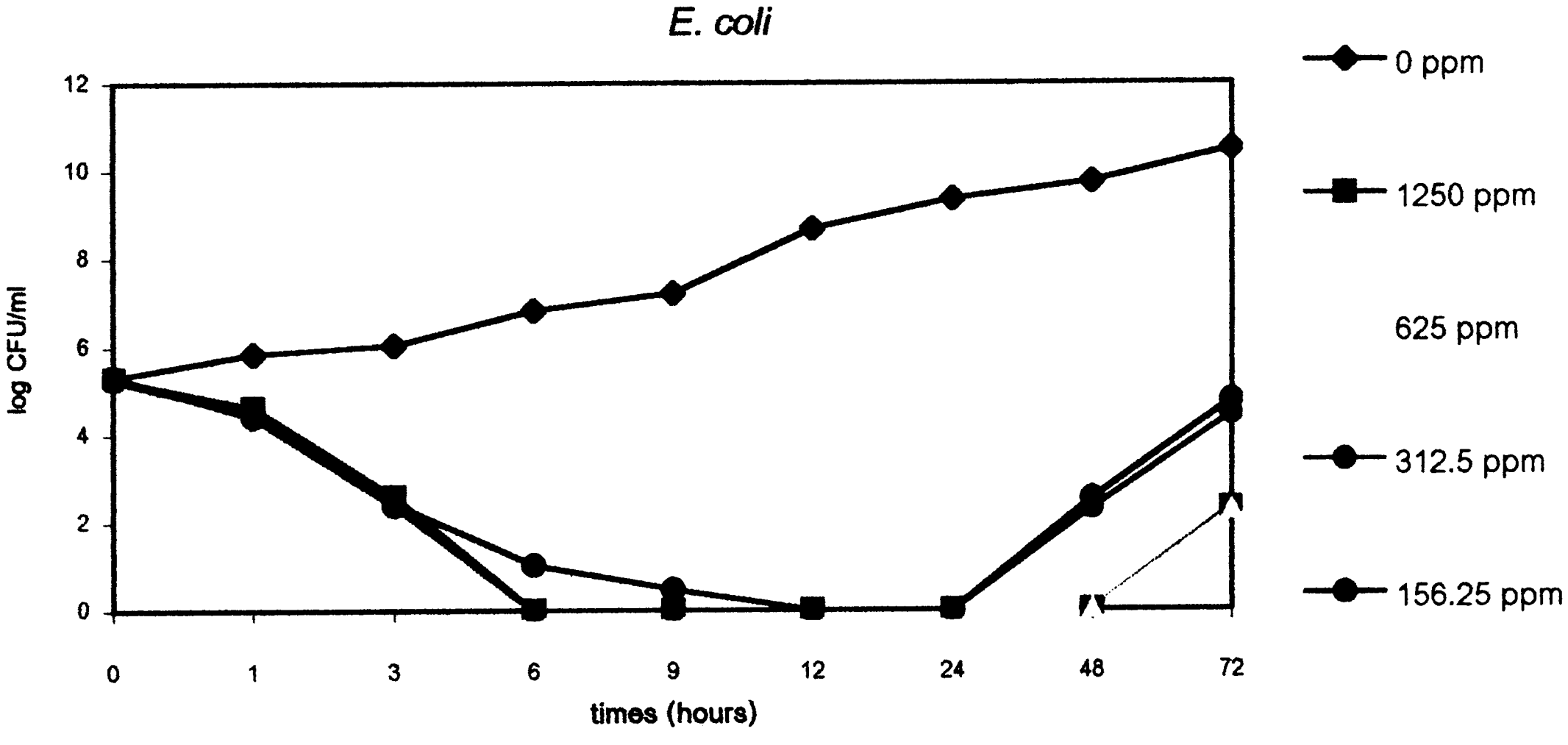
การศึกษาอัตราการตายของจุลินทรีย์ *E.coil*, *S.aureus* และ *C. albicans* เนื่องจากไคโตแซน โดยการนับเชื้อที่รอดตายด้วยวิธี plate count (ข้อมูลรายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค, ตารางที่ 19-21) พบว่าหลังจากเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0, 1250, 625, 312.5 และ 156.25 พีพีเอ็ม ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ PDB ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^5CFU/ml แล้วปล่อยให้ไคโตแซนทำปฏิกิริยากับเซลล์จุลินทรีย์ เก็บ

ตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เจริญด้วยวิธีการ pour plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเชื้อที่เจริญ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดจะถูกยับยั้งได้ด้วยสารละลายไคโตแซนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ โดยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์จะลดลงอย่างรวดเร็วและมีเซลล์ที่รอดชีวิต $<10^2$CFU/ml ภายในเวลา 6 ชั่วโมง แรกหลังจากการบ่ม (ดังรูปภาพที่ 7-9)

อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นไคโตแซนต่ำกว่า 625 พีพีเอ็มจะพบการเจริญของจุลินทรีย์ภายหลังจาก 24 ชั่วโมงผ่านไป ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่าพบการเจริญของจุลินทรีย์หลังจาก 48 ชั่วโมง ยกเว้นกรณีของเชื้อยีสต์ *C. albicans* ซึ่งไคโตแซนทุกความเข้มข้นที่ทดสอบสามารถยับยั้งได้นานถึง 72 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไคโตแซนอาจมีผลยับยั้งการเจริญของ *E.coil* และ *S.aureus* ได้เพียงชั่วระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น โดยที่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ทั้งหมดยังคงมีเซลล์แบคทีเรียบางส่วนที่ไม่ถูกทำลายหลงเหลืออยู่ ซึ่งข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของแบคทีเรียในการปรับตัวให้สามารถต้านต่อฤทธิ์ของไคโตแซนได้ ในขณะที่เซลล์ยีสต์ถูกทำลายได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งขัดกับการทดลองของ Helander และคณะ (2001) ที่รายงานว่า แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งหรือทำลายเซลล์โดยไคโตแซน ไม่สามารถซ่อมแซมเซลล์และพัฒนาให้มีการเจริญเติบโตขึ้นได้อีก โดย Helander ได้ศึกษาการรบกวนของไคโตแซนต่อผนังเซลล์ชั้น outer membrane ของแบคทีเรีย *E. coli* และ *Salmonella* sp โดยบ่มเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ในอาหารที่มีไคโตแซนความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารใหม่ที่ไม่มีไคโตแซน และนับจำนวนเชื้อที่เจริญที่เวลา 4 และ 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกัน พบว่าจำนวนเชื้อที่เจริญมีปริมาณเท่ากัน Helander เลยสรุปว่าไม่มีเซลล์ใหม่ที่สามารถซ่อมแซมเซลล์ให้เจริญเพิ่มขึ้นได้

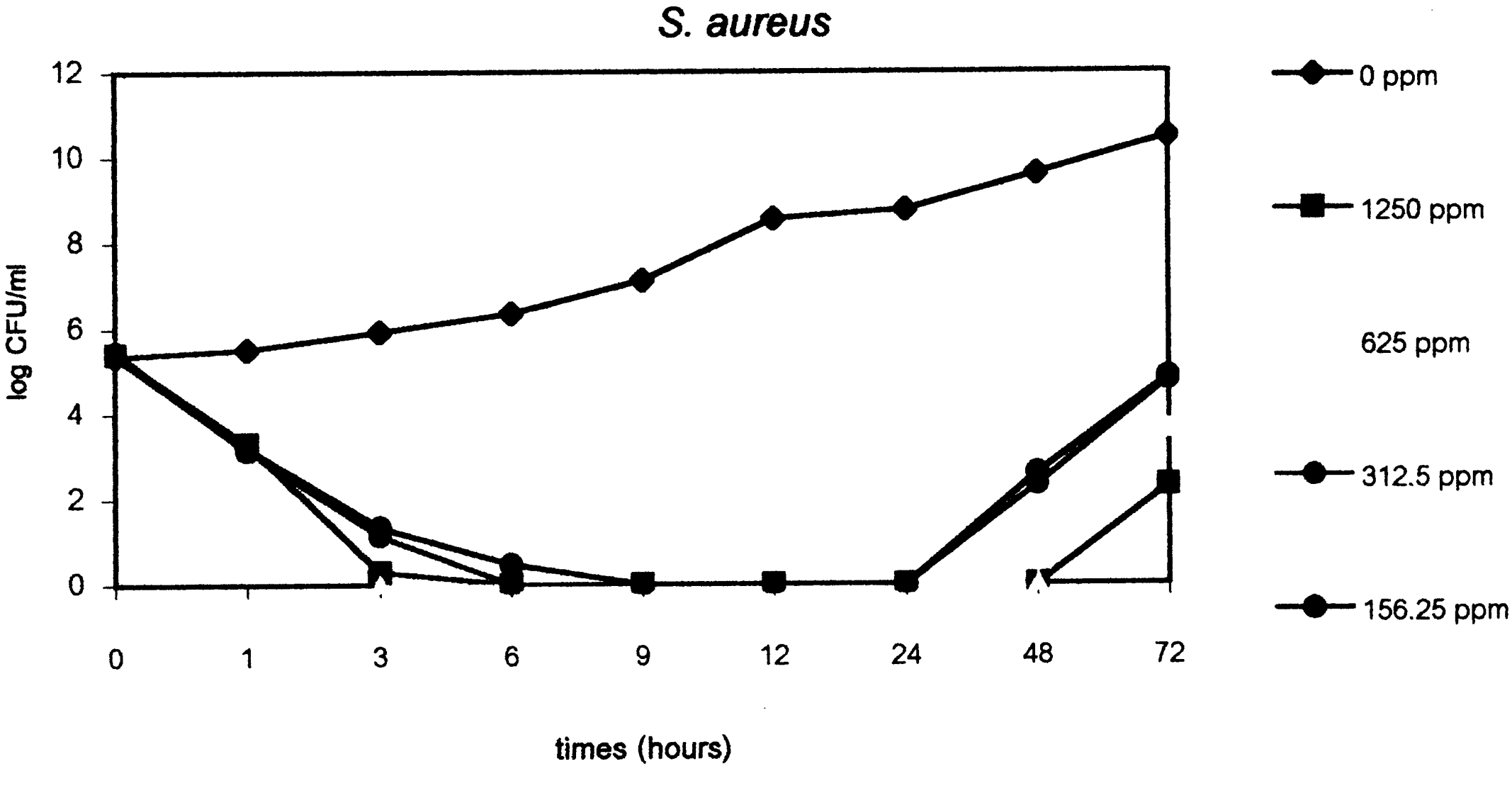
อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียกรัมลบสามารถซ่อมแซมชั้นผนังเซลล์แล้วกลับมาเจริญเพิ่มจำนวนใหม่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีไคโตแซน ทำนองเดียวกับการใช้สารประกอบ chealating agent เช่น EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ซึ่งสามารถทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบ เนื่องจากไปจับกับ divalent cation ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยในการรักษาความเสถียรของโครงสร้างผนังเซลล์กรัมลบ ทำให้

โครงสร้างผนังเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งพบว่า เมื่อนำจุลินทรีย์ไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี EDTA จุลินทรีย์สามารถสร้างผนังเซลล์กลับมาใหม่ได้ (Chilton *et al.*, 2001)



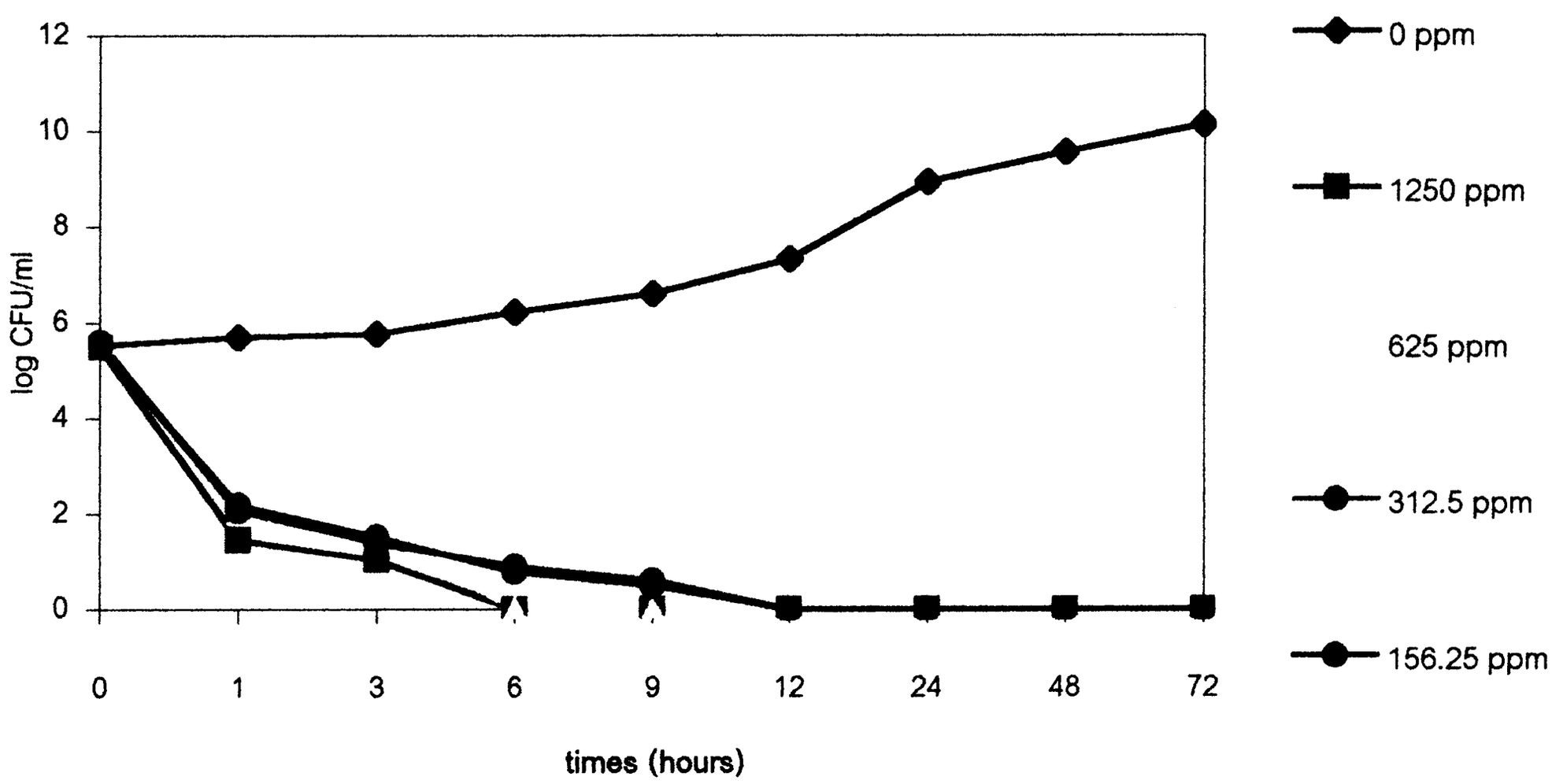
รูปที่ 7 การรอดชีวิตของ *E.coil* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1250 พีพีเอ็ม

Figure 7 Survival curve of *E.coli* in the absence and presence of chitosan at concentration of 0 to 1250 ppm



รูปที่ 8 การรอดชีวิตของ *S. aureus* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1250 พีพีเอ็ม

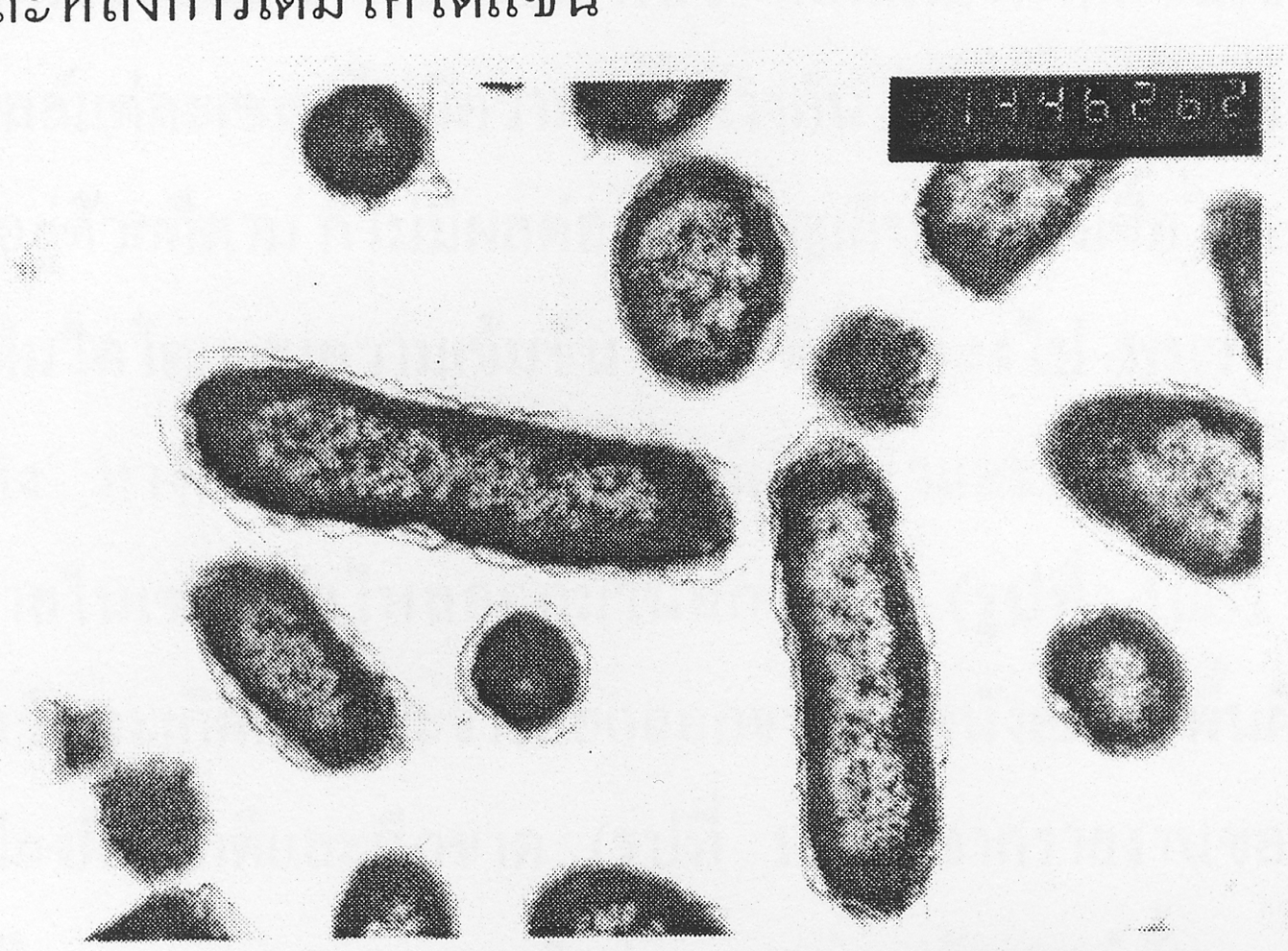
Figure 8 Survival curve of *S.aureus* in the absence and presence of chitosan at concentration of 0 to 1250 ppm



รูปที่ 9 การรอดชีวิตของ *C. albicans* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1250 พีพีเอ็ม

Figure 9 Growth curve of *C. albicans* in the absence and presence of chitosan at concentration of 0 to 1250 ppm

3.7.3 การศึกษา transmission electron microscopy (TEM) ของเซลล์จุลินทรีย์กรัมลบ *E. coli* ก่อนและหลังการเติมไคโตแซน



(A) กำลังขยาย x14,000

(B) กำลังขยาย x20,000

(C) กำลังขยาย x14,000

รูปที่ 10 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชันเชื้อ *E. coli* (A) ชุดควบคุมเติม 0.06% กรดอะซิติก และ (B-C) ชุดทดสอบเติมไคโตแซนเข้มข้น 625 พีพีเอ็ม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 6 ชั่วโมง

Figure 10 TEM images of *E. coli* (A) Control treated with 0.06% acetic acid for 6 hours at 37 °C and (B-C) treated with 625 ppm chitosan for 6 hours at 37 °C

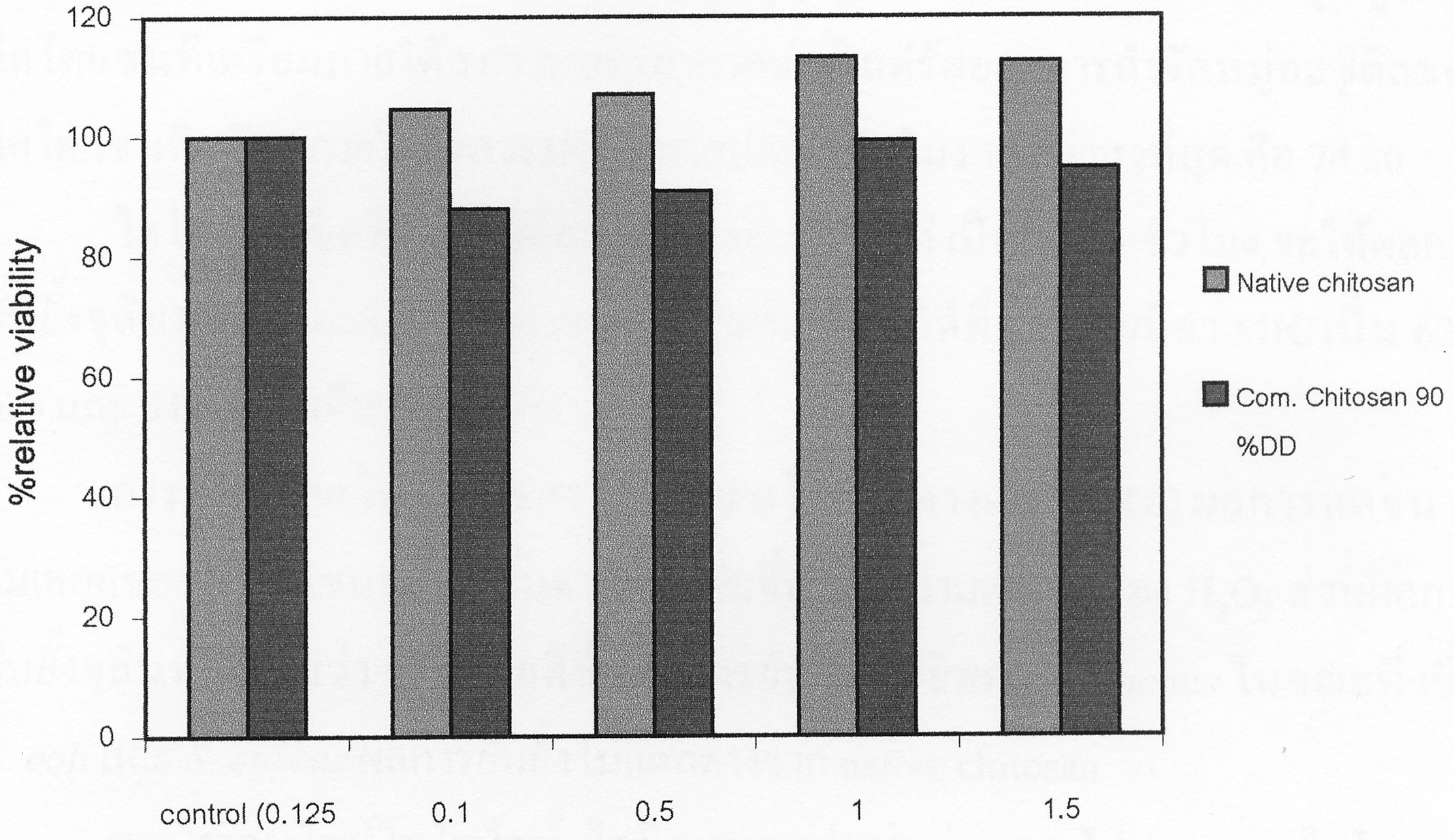
ผลการศึกษาภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชันของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังเติมไคโตแซน พบว่า ก่อนเติมไคโตแซนเซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่งปกติเซลล์แต่ละเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน (Homogeneous) แม้จะมีกรดอะซิติกเข้มข้น 0.06% อยู่ด้วยก็ตาม ก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* (รูปที่ 10A) ในขณะที่หลังการเติมไคโตแซนความเข้มข้น 625 พีพีเอ็มลงไป พบว่า เซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเปลี่ยนแปลง บางเซลล์จะเห็นผนังเซลล์เกิดรูรั่วและมีปริมาณไซโตพลาสซึมหรือสารบางอย่างภายในเซลล์รั่วไหลออกมานอกเซลล์ (รูปที่ 10B) และบางเซลล์ปริมาณไซโตพลาสซึมจะเกิดการกระจายแยกออกจากชั้นผนังเซลล์ พื้นผิวผนังเซลล์เกิดลักษณะที่เปลี่ยนแปลงผิดปกติและฉีกขาด (รูปที่ 10C) จากรายงานของ Helander และคณะ (2001) ที่ศึกษาการรบกวนของไคโตแซนต่อผนังเซลล์ชั้น outer membrane ของแบคทีเรีย *E. coli* และ *Salmonella* sp. กล่าวว่า ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 250 พีพีเอ็มจะมีผลทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลง พื้นผิวผนังเซลล์เกิดการชำรุด แต่ไม่เห็นการฉีกขาดและมีไซโตพลาสซึมไหลออกมา

3.7.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic assay)

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารละลายไคโตแซนทั้งชนิดทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 90 และ native chitosan ที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 74.80 พบว่า ไคโตแซนทั้ง 2 ชนิด ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1-1.5 มก/มล (100, 500, 1000 และ 1500 พีพีเอ็ม) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell line ดังแสดงในรูปที่ 10

อัตราการรอด (%survival) ของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเซลล์ทดสอบครั้งนี้ไม่ได้รับผลกระทบหรือพบเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการเติมสารละลายไคโตแซนลงไปเลย โดยมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะร็งใกล้เคียงกันกับชุดการทดลองที่ไม่เติมไคโตแซนแต่มีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 0.125 อยู่ ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์นี้สามารถยืนยันได้ว่า สารละลายไคโตแซนเป็นสารที่ไม่มีความเป็นพิษ (non-toxic) จึงสามารถนำไปใช้กับมนุษย์ได้โดยไม่มีผลกระทบใดๆ เกิดขึ้น หากมีการนำไปใช้อย่างถูก

วิธีและใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่มีการศึกษาซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เป็นพิษต่อผู้ใช้แน่นอน



รูปที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell line หลังเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.1-1.5 มก/มล.

Figure 11 Cell viability rate of HT-29 human colon adenocarcinoma cell line in the presence of chitosan concentration of 0.1 to 1.5 mg/ml.