บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันแนวโน้มการขยายตัวของอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมาประเทศไทยเป็นผู้นำด้านการผลิตและส่งออกกุ้งทะเลแช่เยือกแข็งมากที่สุด โดยมีผลผลิตประมาณ 230,000 เมตริกตันในปี พ.ศ. 2542 (ชะลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543) จากกระบวนการแปรรูปกุ้งจะเกิดวัสดุเศษเหลือทิ้งประมาณ 40-80% (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2542) ได้แก่ หัว เปลือก และหางกุ้ง ซึ่งของเหลือทิ้งเหล่านี้เน่าเสียได้ง่ายและมีกลิ่นเหม็น ถ้าไม่มีการนำกลับไปใช้ประโยชน์ใหม่ก็จะก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษได้

การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกและหัวกุ้ง เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์จากกุ้งที่ได้รับความสนใจจากผู้ประกอบการอุตสาหกรรมอาหารทะเลในปัจจุบัน โดยธรรมชาติเปลือกกุ้งประกอบด้วยสารพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งเรียกว่า ไคติน อยู่ประมาณ 14-27% (โดยน้ำหนักแห้ง) (วิสิฐ จะวะสิต และ วันทนีย์ วรวงศ์ทัต, 2535) ไคตินเองอาจไม่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากนัก เนื่องจากเป็นสารพอลิเมอร์ไร้ประจุทำให้ยากต่อการละลายในสารละลายทั่วไป แต่สารอนุพันธ์ของไคตินซึ่งเรียกว่า ไคโตแซน มีศักยภาพที่จะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้มากกว่า ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ออกจากโมเลกุลของไคติน เกิดเป็นหมู่อะมิโน ได้จากการนำไคตินมาต้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มข้นมากๆ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดึงเอาหมู่อะซิติล (CH_3CO) บางส่วนออกกลายเป็นหมู่อะมิโน (NH_2) ที่สามารถรับโปรตอนและจัดเป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดเดียวในท้องตลาดที่มีประจุเป็นบวก ด้วยเหตุนี้ไคโตแซนจึงสามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิดในช่วงพีเอชต่ำกว่า 5.5 ได้แก่ สารละลายกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดออกซาลิก กรดมาโลนิก กรดซัคซินิก กรดแลคติก กรดไพรูวิก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรด ซิตริก นอกจาก

นี้ยังสามารถละลายได้ในกรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง และกรดเปอร์คลอริก และละลายได้เล็กน้อยในกรดฟอสฟอริก แต่ไม่ละลายในกรดซัลฟูริก ไคโตแซนไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ในรูปเกลือของกรดหลายชนิด ยกเว้น เกลือซัลเฟตและเกลือซัลไฟด์ ไคโตแซนไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่ละลายในสารพอลิออล (polyol) ที่มีสภาพเป็นกรด (acidified polyols) เช่น ละลายในส่วนผสมระหว่างกลีเซอรอลและน้ำ (3:1) ที่มีกรดเข้มข้นร้อยละ 10 (Filar and Wirick, 1978; Kienzle-Sterzer *et al.*, 1982; Anonymous, 1989 อ้างโดยอรุณ ลิลาพันธ์สิทธิ, 2536) ไคโตแซนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการแพทย์ เภสัชวิทยา การเกษตร ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเคมี กระดาษ และการบำบัดน้ำเสีย

ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ปัจจุบันความต้องการใช้สารจากธรรมชาติ เพื่อมาช่วยปรุงแต่งอาหารมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้มีการศึกษาวิจัยสารธรรมชาติอย่างมากมาย ไคติน-ไคโตแซนและอนุพันธ์เป็นสารธรรมชาติที่ปราศจากพิษ จึงได้ถูกนำมาทดลองใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เพื่อยืดอายุการเก็บและเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหารและหลีกเลี่ยงการใช้สารกันบูดหรือสารปรุงแต่งอาหารอื่นๆ ที่อาจมีโทษต่อผู้บริโภคได้ แต่กิจกรรมหรือกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตแซนยังมีปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้องและมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้ง อาทิเช่น ชนิดของจุลินทรีย์และวัตถุดิบที่ใช้ (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544), น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน (No *et al.*, 2002), ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (Tsai and Huey, 1999), ตัวทำละลาย (No *et al.*, 2002) และพีเอชของอาหาร (Tsai and Huey, 1999) เป็นต้น

การศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนมีการศึกษากันมาอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะไคโตแซนที่ผลิตจากเปลือกและหัวกุ้ง (Shahidi *et al.*, 1999) ไคโตแซนให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในวงกว้าง คือ ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียกรัมบวกและกรัมลบ, รา และยีสต์ (Yalpani *et al.*, 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรามักถูกยับยั้งโดยไคโตแซนได้ดีกว่าแบคทีเรีย (Shahidi *et al.*, 1999)

No และคณะ (2002) ศึกษาถึงผลของความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนและโอลิโกเมอร์ไคโตแซน

(oligomerchitosan) ที่ได้จากเปลือกกุ้ง พบว่า ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1671, 1106, 746, 470, 224 และ 28 kDa สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าโอลิโกเมอร์ไคโตแซนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 22, 10, 7, 4, 2 และ 1 kDa โดยไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus cereus* ซึ่งผลการยับยั้งแตกต่างกันไปตามน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนและชนิดของแบคทีเรีย ไคโตแซนโดยทั่วไปจะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบที่ความเข้มข้น 0.1% (น.น. /ปริมาตร) และความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตแซน (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อยู่ในช่วง 0.05%->0.1% (น.น. /ปริมาตร) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน

ความแตกต่างของระดับการกำจัดหมู่อะซิติลก็มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน โดยไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงจะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่ำ Simpson และคณะ (1997) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนต่อการเจริญของเชื้อ *E. coli* พบว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 92.5% สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 85%

No และคณะ (2002) รายงานไว้ว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนคือ 1% acetic acid และค่าพีเอชที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนได้ดีจะอยู่ที่ 4.5 โดยได้ศึกษาผลของพีเอชในช่วง 4.5, 5.0, 5.5 และ 5.9 ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด (*E. coli, S. typhimurium, L. monocytogenes, S. aureus, Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis*) ของไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ระดับ (1671, 746 และ 470 kDa สำหรับเชื้อ 4 สายพันธุ์แรก และ 1106, 224 , 28 kDa สำหรับเชื้อ *Lactobacillus*) พบว่า การยับยั้งแบคทีเรียโดยไคโตแซนจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ โดยที่พีเอช 4.5 จะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด นอกจากนี้ Wang (1992) ก็พบว่า ไคโตแซนที่ความเข้มข้นเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% ที่อาหารพีเอช 5.5 และ 6.5 ทุกความเข้มข้นจะมีฤทธิ์ของการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ pH 5.5 จะดีกว่า pH 6.5

จากความหลากหลายของปัจจัยเหล่านี้มีผลให้ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนไม่แน่นอนยากต่อการนำไปใช้ได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นโครงการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงผลของกรรมวิธีการกำจัดหมู่อะซิติลและการลดขนาดของโมเลกุลของไคโตแซนโดยวิธีทางเคมีและการใช้เอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน และศึกษาปัจจัยแวดล้อม อันประกอบด้วย ค่าพีเอช และอุณหภูมิต่างๆที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเลือกไคโตแซนที่เตรียมได้ในสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุดไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารจำนวน 9 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนบริสุทธิ์ทางการค้า รวมทั้งศึกษาอัตราการตายของจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* โดยการนับด้วยวิธี plate count และทำ transmission electron microscopy (TEM) ของเซลล์จุลินทรีย์กรัมลบก่อนและหลังเติมไคโตแซน ท้ายสุดศึกษาดูความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ของไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไคโตแซนให้ได้คุณภาพและมีประสิทธิภาพสูงเหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหาร

บทตรวจเอกสาร

1. แหล่งของไคติน-ไคโตแซน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ธรรมชาติได้สร้างสรรให้กับสิ่งมีชีวิตมากมายในหลายรูปแบบ ไคตินได้รับการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ต่อมาในราวปี ค.ศ. 1823 พอลิเมอร์ชนิดนี้ถูกเรียกว่า ไคติน โดย Odier ซึ่งคำว่า ไคติน (Chitin) มาจากคำว่า “Chiton” ในภาษากรีก ที่มีความหมายว่า เกราะหุ้ม ไคตินเป็นสารอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่เกิดตามธรรมชาติ มีปริมาณมากเป็นที่ 2 ของโลก รองจากเซลลูโลส ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง ป้องกันและสร้างความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) โดยสามารถพบไคตินได้ทั้งในผนังเซลล์ของพืชบางชนิด สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ในพืช พบไคตินอยู่รวมกับเซลลูโลส ในสัตว์ พบไคตินอยู่ร่วมกับคอลลาเจน ส่วนในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวก กั้ง ปู กุ้ง เคย หอย แพลงค์ตอน และแมลง จะพบไคตินเป็นสารให้ความแข็งอยู่ที่ส่วนของเปลือกและกระดอง (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544) นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของเชื้อรา เห็ด ยีสต์ (ที่ใช้ทำเบียร์) สาหร่ายบางสายพันธุ์ และยังเป็นองค์ประกอบของชิ้นส่วนขากรรไกรและกระดูกสันหลังของสัตว์จำพวกไส้เดือนด้วย (ธีรพล ประมวลกิจจา, 2534) หรือแม้แต่แกนของแมงกะพรุน หมึก หรือดาวทะเล (ป๋วย อุ่นใจ, 2544) ตารางที่ 1 แสดงปริมาณไคตินที่พบในสัตว์ทะเลพวกครัสตาเซีย, แมลงและเชื้อรา

ตารางที่ 1 ปริมาณไคตินที่พบในสัตว์ทะเลพวกครัสตาเซีย, แมลงและเชื้อรา

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ปริมาณไคติน (%)	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ปริมาณไคติน (%)
Crustaces		**Insects**	
Cancer (crab)	72.1[c]	May beetle	16[b]
Carcinus (crab)	0.4 -3.3[b]	Diptera (true fly)	54.8[c]
	8.29[b]	Pieris (sulfur butterfly)	64[c]
	64.2[c]	Grasshopper	2-4[a]
Paralithodes (King crab)	35[b]		20[c]

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ปริมาณไคติน (%)	ชนิดของสิ่งมีชีวิต	ปริมาณไคติน (%)
Crustaces		**Insects**	
Pleuroncodes (Red crab)	1.3 – 1.8[b]	Bombyx (silk worm)	44.2[c]
Crangon (shrimp)	5.8[b]	Calleria (wax worm)	33.7[c]
	69.1[c]	Periplameta	2.0[c]
Alaskan shrimp	28[d]	(cockroach)	
Nephrops (lobster)	69.8[c]	Blatella	18.4[c]
	6.7[b]	(cockroach)	10[b]
Homarus (lobster)	60.8 - 77.0[c]		35[c]
Lepas (barnacles)	58.3[c]	Colcoptera (beetle)	5-15[b]
Fungi			27-35[c]
Aspergillus niger	42.0[e]	Tenebrio (beetle)	2.1[a]
Penicillium notatum	18.5[e]		4.9[b]
Penicillium chrysogenium	20.1[e]		31.3[c]
Saccharomyces cerevisiae	2.9[e]	**Molluscan Organs**	
(bakers yeast)		Clamshell	6.1
Mucor rouxii	44.5	Oyster shell	3.6
Lactarius vellereus	19.0	Squid, skeletalpen	41.0
(mushroom)		Krill, deproteinlzed	
		shell	40.2 ±5.2

[a] Wet body weight, [b] Dry body weight, [c] Organic weight of cuticle,

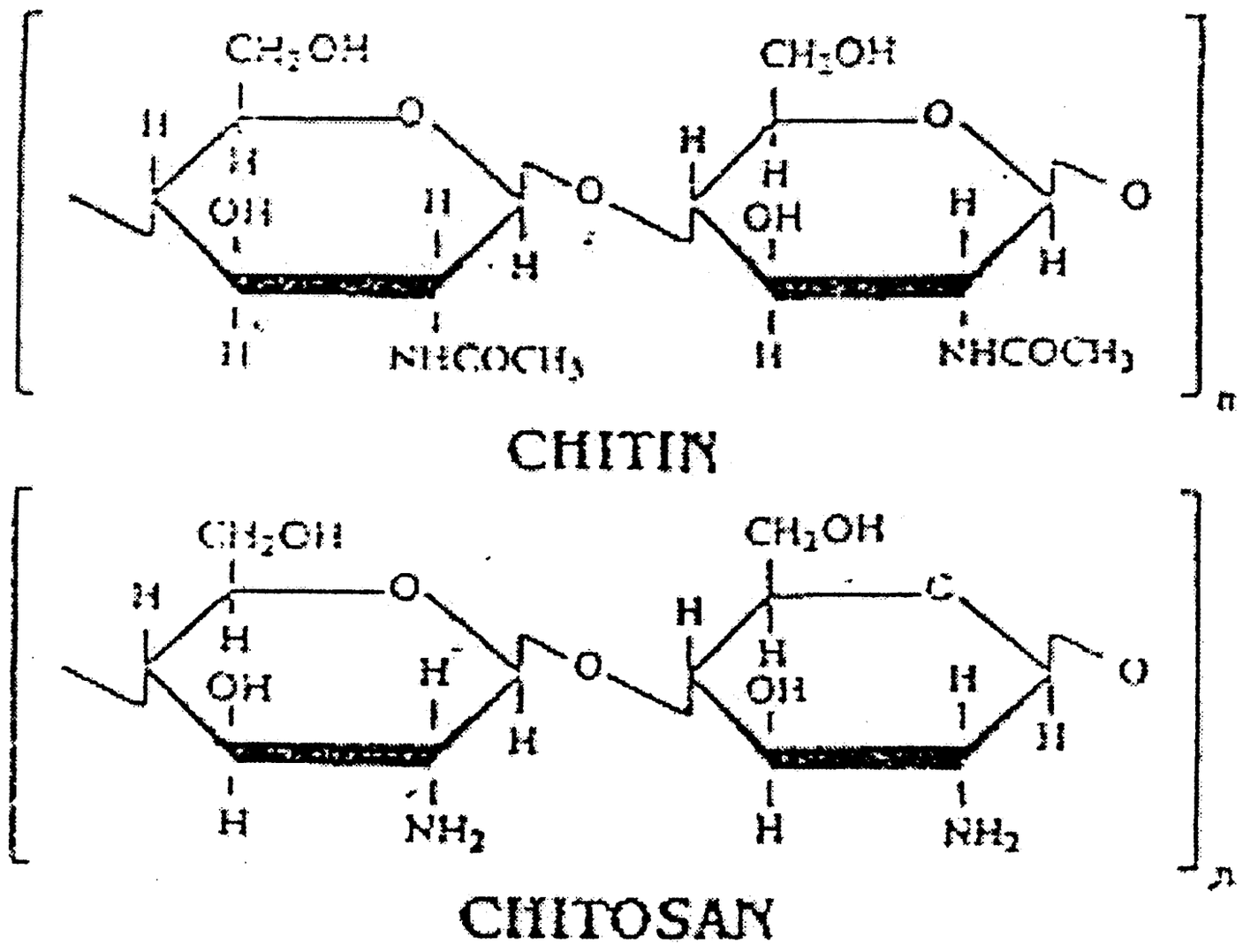
[d] Total dry weight of cuticle

ที่มา : Kong (1975) : Naczk และคณะ (1981)

2. ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตแซน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ชนิด β (1,4) เกิดเป็นโครงสร้างของโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาว เช่นเดียวกับเซลลูโลส ต่างกันตรงที่หน่วยย่อย (monomer) ของเซลลูโลสเป็น D-glucose ส่วนหน่วยย่อยของไคติน N-acety-D-glucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกลูโคส ชื่อทางเคมีของไคตินคือ Poly β-(1$\rightarrow$4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และตำแหน่งของคาร์บอนตัวที่สองของไคตินจะจับกับกลุ่มอะซิติลเอมีน ($-NHCOCH_3$) แทนที่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) ออกจากไคติน เกิดเป็นหมู่อะมิโนอิสระ โดยการนำไคตินมาทำปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เข้มข้น ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดึงเอาหมู่อะซิติล (CH_3CO) บางส่วนออกเหลือหมู่อะมิโน (NH_2) ที่สามารถรับโปรตอนและทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีประจุเป็นบวก ด้วยเหตุนี้ไคโตแซนจึงสามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิดในช่วงพีเอชต่ำกว่า 5.5 การใช้ประโยชน์จากไคโตแซนจึงสูงกว่าไคติน ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตแซน แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตแซน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Johnson และ Peniston (1982)

3. กระบวนการผลิตไคติน-ไคโตแซน

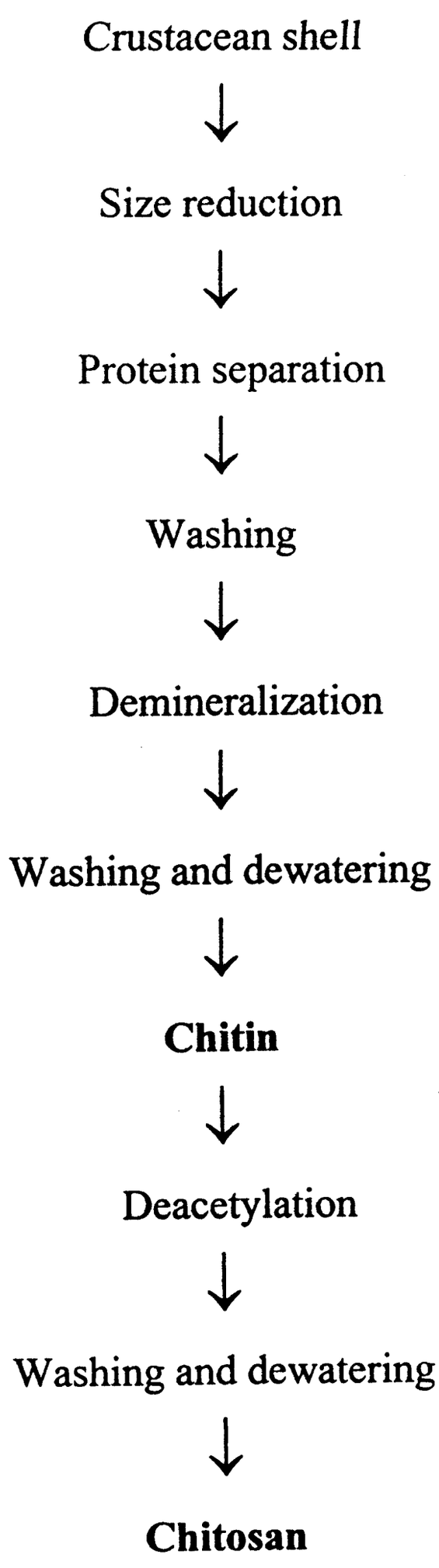
การผลิตไคตินและไคโตแซน อาจผลิตได้จากเปลือกกุ้งสดหรือเปลือกกุ้งที่ผ่านการอบแห้งและบด แต่วัตถุดิบที่นำมาใช้ควรผ่านการทำความสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ปะปนมา การผลิตไคติน-ไคโตแซน ประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ

3.1 การกำจัดโปรตีน (deproteination)

3.2 การกำจัดเกลือแร่ (demineralization)

3.3 การกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation)

ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แผนภูมิการผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Knorr (1984)

การกำจัดโปรตีน

ขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนออกจากไคติน สามารถทำได้ 2 วิธี คือ โดยการใช้ด่าง (alkali) กับการใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease)

1. การกำจัดโปรตีนโดยการใช้ด่าง

สารละลายด่างที่มีรายงานการใช้มาก คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เนื่องจากเป็นสารที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ หาง่ายในตลาดและราคาถูก (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) ทำการต้มวัตถุดิบกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1-10% ที่อุณหภูมิ 65-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ ½ ถึง 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายด่างและอุณหภูมิที่ใช้ (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544) เช่น ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3% (น.น. /ปริมาตร) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง (Bough *et al.*, 1978 อ้างโดยอรุณ ลิลาพันธ์สิทธิ, 2536), แช่วัตถุดิบในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3-5% (น.น. /ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เวลา 2-3 ชั่วโมง (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% (น.น. /ปริมาตร) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบและสารละลายด่างเท่ากับ 1:10 (น.น. /ปริมาตร) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล และไพรัตน์ โสภโณดร, 2533ก)

2. การกำจัดโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น เป็ปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้แยกโปรตีนออกจากวัตถุดิบได้ ปฏิกิริยาที่ใช้ในการแยกโปรตีนสามารถทำได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับการสกัดแยกโปรตีนโดยการใช้สารละลายด่าง ทำให้มีผลน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลและค่าระดับของการเกิดดีอะซิติเลชัน (deacetylation) ของไคติน แต่การใช้เอนไซม์อาจไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากวัตถุดิบได้ทั้งหมดและจะใช้เวลาในการย่อยนานกว่าการใช้ด่าง (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544)

การกำจัดเกลือแร่

นำวัตถุดิบที่ผ่านการกำจัดโปรตีนออกแล้วมาทำปฏิกิริยากับกรดเจือจาง เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) (อรุณ ลิลาพันธ์สิทธิ, 2536) ซึ่งส่วนมากจะใช้กรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 3-5% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน ทำให้สารละลายเกลือแร่ส่วนใหญ่ เช่น หินปูน ($CaCO_3$) ถูกกำจัดออกโดยเปลี่ยนเป็นเกลือแคลเซียมที่ละลายน้ำ ($CaCl_2$) และก๊าซคาร์บอนไดออุกไซด์ (CO_2) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) และเหลือไคตินที่ไม่ละลาย ล้างให้เป็นกลางแล้วอบให้แห้ง นอกจากกรดเกลือแล้วสารเคมีอื่น เช่น EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) สามารถนำมาใช้เพื่อกำจัดเกลือแร่ได้ ถึงแม้ว่า EDTA จะมีราคาค่อนข้างแพงแต่สามารถถูกนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Austin *et al.*, 1981 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) แต่วิธีนี้ไม่สามารถที่จะกำจัดสารประกอบอนินทรีย์ออกจากวัตถุดิบได้ทั้งหมด (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544)

การกำจัดหมู่อะซิติล

กระบวนการผลิตไคโตแซนจำเป็นต้องกำจัดหมู่อะซิติลออกจากหมู่เอมีนในโครงสร้างของไคติน โดยใช้สารละลายด่างเข้มข้นและอุณหภูมิสูง โดยปกติความเข้มข้นของสารละลายด่างที่ใช้จะอยู่ในช่วง 40-55% และอุณหภูมิในช่วง 100-150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Green *et al.*, 1979 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล และไพรัตน์ โสภโณดร, 2533ข) วิธีการที่ใช้ในการเตรียมไคโตแซนจากไคตินทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจะแตกต่างกันในรายละเอียด สามารถแบ่งวิธีการที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้เป็น 2 วิธี คือ

1. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับด่าง (จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี, 2544)

1.1 การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับด่างที่หลอมละลาย (alkali fusion)

เป็นการทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันในสภาวะที่รุนแรง โดยการหลอมละลายด่างที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับไคติน เช่น การหลอมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส โดยให้ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของ

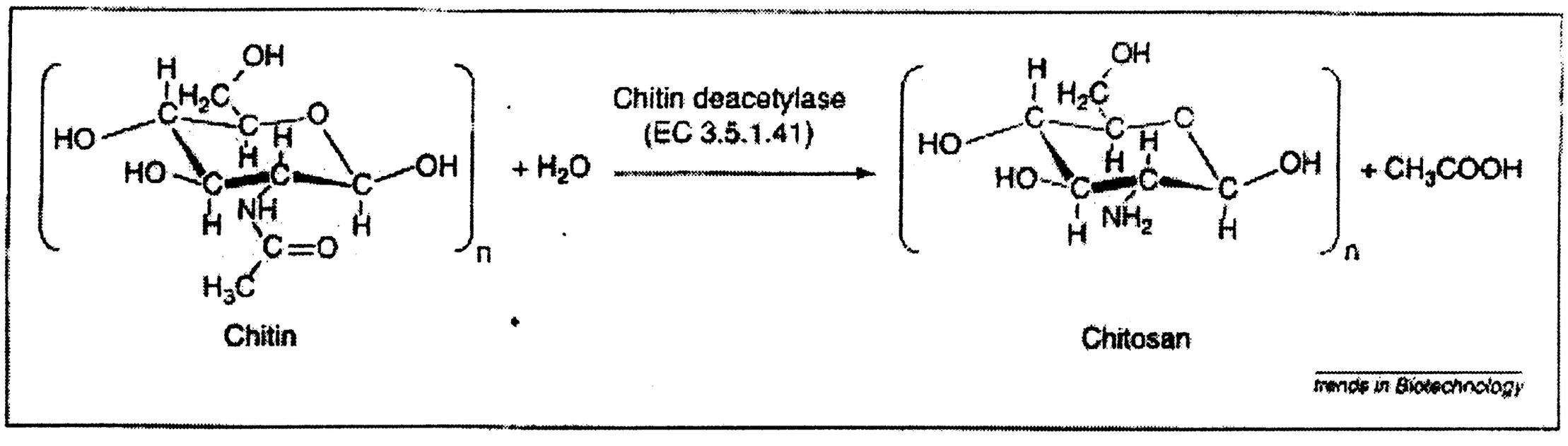
ไนโตรเจน ไคโตแซนที่เตรียมได้จากวิธีนี้จะมีเปอร์เซ็นต์ดีอะซิติเลชันสูงถึง 95% แต่สภาวะที่รุนแรงทำให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนที่ได้มีค่าต่ำ

1.2 การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับสารละลายด่าง

วิธีนี้ใช้ศึกษากันมาก โดยสารละลายด่างที่ใช้กันมาก คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ก็มีการใช้สารละลายด่างชนิดอื่นๆ เช่น โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH), ลิเทียมไฮดรอกไซด์ (LiOH) และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $Ca(OH)_2$ สภาวะที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายด่าง, อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5% (น.น. /ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมง หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (น.น. / ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมง

2. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับเอนไซม์ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

เป็นการลดหรือกำจัดหมู่อะซิติลของไคตินในปฏิกิริยาดีอะซิติเลชัน โดยใช้เอนไซม์ไคติน-ดีอะซิติเลส (Chitin- N – deacetylase; EC3.5.1.41) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การกำจัดหมู่อะซิติลของไคตินโดยใช้เอนไซม์ไคติน-ดีอะซิติเลส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tsigos และคณะ (2000)

4. สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคติน-ไคโตแซน

4.1 การละลาย (Solubility)

ไคตินไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ด่างทั้งเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอร์และตัว

ทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีพีเอชน้อยกว่า 6.0 และสามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) เข้มข้น กรดซัลฟูริก (กรดกำมะถัน) เข้มข้น กรดฟอสฟอริก (78-97%) กรดฟอร์มิก (anhydrous formic acid) และ DMAc-LiCl (N, N-Dimethylacetamide-Lithium chloride) ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่างๆ เป็นผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันอย่างหนาแน่น มีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน (หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อะซีตามิโด) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.2 ความร้อนในการกระตุ้นให้เกิดการสลายพันธะแบบไฮโดรไลซิส (Hydrolytic heat of activation)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นปฏิกิริยาการสลายพันธะที่มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้องโดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สายโซ่ของพอลิเมอร์ของไคตินมีลักษณะเช่นเดียวกันกับเซลลูโลส คือเป็นพันธะ glycosidic linkage แบบ β-(1$\rightarrow$4) Hydrolytic heat of activation ของไคตินประมาณ 29 kcal (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.3 ความสามารถในการตกตะกอน (Coagulating ability)

ไคโตแซนเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอน (flocculant and coagulating agent) ที่ดีเนื่องจากการมีหมู่อะมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวกและจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีย้อม และพอลิเมอร์อื่นๆ จากการวิจัยประสิทธิภาพของไคโตแซนในการแยกโปรตีนออกจาก cheese whey พบว่าความสามารถในการจับโปรตีนเป็นสัดส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน นอกจากนี้ไคโตแซนยังสามารถจับกับโลหะหนักได้ โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของ ไคโตแซนจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อน (coordinate) กับหมู่อะมิโนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่อะมิโนในไคโตแซนมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซิติลในไคติน ดังนั้นไคโตแซนที่มี degree of deacetylation สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะได้สูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตแซนยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น ความเป็นผลึก และความสามารถในการดึงดูดน้ำของไคโตแซน (Li *et al.*, 1992 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.4 รูปแบบของโมเลกุล (Molecular conformation)

ไคตินมีโครงสร้างผลึก (crystal structure) ที่แข็งแรงและมีระดับของผลึก (degree of crystallinity) สูง รูปแบบผลึกของไคตินแบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ α- chitin, β-chitin และ γ- chitin แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่การเกิดระบบของผลึก (crystal system) และปัจจัยของการเกิดแลตติชผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซลล์ (unit cell) ภายในโครงสร้างผลึก ความแตกต่างนั้นเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในแลตติชผลึกสายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินจะมีการเรียงตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกัน (pleated sheet) ในแลตติชผลึกของหน่วยเซลล์ ซึ่งอาจเรียงตัวกันได้ 2 แบบ คือ แบบขนานที่มุ่งไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกันแบบสวนทางกัน (anti- parallel pattern) α- chitin มีโครงสร้างการเรียงตัวแบบสวนทางกัน พบในไคตินของเปลือกกุ้ง และปู ส่วนไคตินที่พบในแกนปลาหมึกจะมีโครงสร้างที่เรียงตัวมุ่งไปทางเดียวกัน เกิดเป็น β- chitin การจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแบบ γ- chitin นั้นเกิดจากโครงสร้างเรียงสลับกันระหว่างสองแบบที่กล่าวมาแล้ว (Muzzarelli *et al.*, 1977 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

โดยธรรมชาติจะพบ α-form ของไคตินมากกว่า β- และ γ- form ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular and intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี (chemical stability) มากกว่าแบบอื่นๆ β- chitin มีเสถียรภาพทางเคมีรองลงมาจาก α- chitin ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า การมีเสถียรภาพที่น้อยทำให้มันมีโอกาสเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจาก β-form เป็น α-form ในสารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวร เป็นไคตินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrare) ได้อีกทางหนึ่ง (Muzzarelli *et al.*, 1977 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

ไคโตแซนเป็นโพลิอิเลคโตรไลท์ประเภทบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากในสารละลายกรดหมู่อะมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับโปรตอน แล้วอยู่ในรูป-NH^{+}_{3} conformation ของไคโตแซนโมเลกุลในสารละลาย สามารถบ่งชี้โดยค่า Mark-Houwink exponent (ค่า a) ถ้า a มีค่า ประมาณ 0, 0.5-0.8 และ 1.8 บ่งชี้ว่าพอลิเมอร์ขดตัวเป็นทรง

กลม (sphere) มีลักษณะเป็น random coil และมีลักษณะแท่ง (rod) ตามลำดับ conformation ของไคโตแซนโมเลกุลที่แตกต่างกันในสารละลายขึ้นอยู่กับ ionic strength ค่า pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของยูเรีย น้ำหนักโมเลกุล และ degree of deacetylation (Chen and Tsaih, 1998 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5 การย่อยสลาย (Degradation)

ไคติน-ไคโตแซนก็เหมือนกับพอลิเมอร์หรือโพลิแซคคาไรด์อื่นทั่วไป คือ เมื่อเกิดการย่อยสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่ เรียกว่า โมโนเมอร์ (monomer) หรือโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide)

โอลิโกเมอร์/โอลิโกแซคคาไรด์ของไคตินและไคโตแซน คือ N- Acetyl-chitooligosaccharide และ chitooligosaccharide ตามลำดับ ส่วนโมโนเมอร์ /โมโนแซคคาไรด์ของไคตินและไคโตแซน คือ N- Acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5.1 การย่อยสลายโดยกรด (Acid hydrolysis)

การย่อยสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตแซนเนื่องจากกรดจะเป็นแบบสุ่ม (random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และโมโนเมอร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของพอลิเมอร์ โดยไคตินจะสามารถต้านทานการย่อยสลายโดยกรดได้ดีกว่าไคโตแซน (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5.2 การย่อยสลายโดยด่าง (Alkaline degradation)

การย่อยสลายของสายโซ่โมเลกุลของโพลิแซคคาไรด์ในด่างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล การย่อยสลายแบบนี้เรียกอีกอย่างว่า peeling reaction (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5.3 การย่อยสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียง (Degradation by sonication)

การย่อยสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียงควบคู่กับการใช้กรด มีผลให้ได้โอลิโกเมอร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าการย่อยสลายโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5.4 การย่อยสลายโดยเอนไซม์ (Enzymic degradation)

การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้สารเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคติน-ไคโตแซน ได้แก่

Chitinase (EC3.2.1.14) หรือ poly-β 1,4 - (2 - acetamido- 2 - deoxy) – D - glucoside glucanohydrolase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคติน แบบสุ่มตรงตำแหน่งพันธะ 1, 4-linkage ได้เป็น N- Acetyl-chitooligosaccharide อย่างไรก็ตามยังพบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากจุลินทรีย์นอกจากจะสามารถย่อยไคตินได้แล้ว ยังสามารถย่อยสลาย partially- N- acetylated chitosan ได้อีกด้วย โดยเอนไซม์ไคติเนสจะใช้ partially- N- acetylated chitosan เป็นสับสเตรตและจะทำการย่อยสลายจำเพาะตรงตำแหน่ง GlcNAc-GlcNAc และ GlcNAc-GlcN bond เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็น hetero-chitooligosaccharides (Mitsutomi *et al.,* 1995) วิถีการเปลี่ยนแปลงของไคตินโดยเอนไซม์ไคติเนส แสดงดังรูปที่ 4

ไคติน

(poly β- (1,4)-N- acetylglucosamine)

⇓chitinase

oligomers

$(GlcNAc)_n$

⇓chitinase

N- acetylchitobiose

⇓ N- acetylglucosaminidase

N- acetylglucosamine

รูปที่ 4 วิถีการเปลี่ยนแปลงของไคติน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Cabib (1987)

Chitosanase (EC3.2.1.132) สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคโตแซนแบบสุ่ม ตรงตำแหน่งพันธะ 1, 4-linkage ได้เป็น chitooligosaccharide

Lysozyme (EC3.2.1.17) เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่คล้ายกับเอนไซม์ไคติเนส สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิด β (1,4) ของ N-acetylmuramic acid (NAM) ใน peptidoglycans และ N-acetylglucosamine (NAG) ในไคตินหรือบางส่วนของ N-acetylated chitosan ($PNAc_s$) ภายใต้สภาวะ homogeneous ได้ โดยการย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของระดับหมู่อะซิติล ไลโซไซม์เป็น mucopeptide N- acetylmuramylhydrolase ที่แยกได้จาก hen egg white และแหล่งอื่นๆ มีศักยภาพกว้างขวางในการใช้ทางอาหารและทางคลินิก ในด้านอุตสาหกรรมนม food grade additive lysozyme สามารถใช้เป็นสารป้องกันการเจริญเติบโตของ lactate-fermenting, gas forming *Clostridium* spp. ในนมได้ ส่วนในอุตสาหกรรมอื่นๆ ก็มีการนำไลโซไซม์ไปใช้เป็น lytic enzyme ย่อยโครงสร้างของผนังเซลล์ได้โดยไม่ทำลาย intracellular product อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการนำไลโซไซม์ไปใช้เป็น food preservative ได้บ้างแล้ว แต่ก็ไม่สามารถที่จะถูกใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ (a general antimicrobial agent) ได้ เนื่องจากมีขอบเขตจำกัดของการย่อยสลายเพียงแค่แบคทีเรียกรัมบวกเท่านั้น ส่วนแบคทีเรียกรัมลบซึ่งมี outer membrane ที่ประกอบด้วย lipopolysaccharide เป็นหลักจะสามารถทนทานต่อไลโซไซม์ได้ และยังเป็นสาเหตุทำให้อาหารเป็นพิษด้วย (Chen and Chen, 1997)

N-acetylglucosaminidase (EC3.2.1.30) และ N-acetylhexosaminidase (EC3.2.1.52) ทำหน้าที่ย่อยสลาย N-acetyl-chitooligosaccharides ให้เป็น N-acetyl-glucosamine โดยจะทำงานร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสและจะเริ่มย่อยสลายจากปลายสายโมเลกุล (non-reducing end) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

Papain (E.3.4.22.2) เป็นเอนไซม์อีกตัวหนึ่งที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อช่วยย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ทำให้เนื้อสัตว์มีความนุ่มขึ้น เอนไซม์ปาเปนจัดเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23,406 ดาลตัน มีโครงสร้างแบบปฐมภูมิถึงตติยภูมิ แต่ไม่ค่อยมีรายงานเกี่ยวกับการจับกันกับไคตินมากนัก ส่วนใหญ่จะเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะเจาะจง (unspecific action) เอนไซม์ปาเปนจะตัดสายโซ่ของไคโตแซนอย่างจำเพาะตรงตำแหน่งของลำดับ $GlcNAc\text{-}GlcNH_2$ ที่เรียงต่อกัน (Muzzarelli *et al.*, 1994)

4.5.5 การย่อยสลายโดยความร้อน (Thermal degradation)

ความร้อนมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของไคโตแซน จากการวิจัย พบว่า ความร้อนจากเตาอบซึ่งเป็นความร้อนแบบแห้ง (dry heat) ที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น Glass transition temperature (T_g) ลดลง ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ส่วนความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิสูง มีผลทำให้ไคโตแซนเกิดสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลา ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส ความสามารถในการละลายของไคโตแซนจะลดลง ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลานานกว่าหรือเท่ากับ 2 ชั่วโมง ไคโตแซนจะไม่ละลายในกรดอะซิติก (0.2 M) / โซเดียมอะซิเตต (0.1 M)

สำหรับการอบแห้งแบบใช้ไอร้อน (saturated stream) ไคโตแซนจะไม่สามารถละลายหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหลังการอบที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไคโตแซน (Lim *et al.* ,1999 อ้างโดย ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

4.5.6 Fenton reaction และการย่อยสลายโดย oxidizing agent

การย่อยสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตแซน โดยมีปฏิกิริยาที่เรียกว่า Fenton reactionและอนุมูลอิสระเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังแสดงในสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet} \qquad (1)$$

$$(GlcN)_m\text{——}(GlcN)_n + OH^{\bullet} \rightarrow (GlcN^{\bullet})_m\text{——}(GlcN)_n + H_2O \qquad (2)$$

$$(GlcN^{\bullet})_m\text{——}(GlcN)_n + H_2O \rightarrow (GlcN)_m + (GlcN)_n \qquad (3)$$

จากสมการที่ (1) เป็นปฏิกิริยา Fenton, m และ n เป็นตำแหน่งของกลูโคซามีนในสายไคโตแซน หลังจากเกิดการย่อยสลาย (สายโซ่โมเลกุลสั้นลง) ซึ่งโดยปฏิกิริยาที่เรียกว่า Fenton reaction จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl free radicals) ที่จะเข้าจับกับไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลของไคโตแซนและเกิดการย่อยสลายสายโมเลกุลไคโตแซนแบบสุ่มตรงตำแหน่ง β (1,4) glycosidic linkage (Chang *et al.*,2001)

4.6 ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา

ไคโตแซนประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชันที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ หมู่อะมิโน ($-NH_2$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C-2) หมู่ primary alcohol ($-CH_2OH$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (C-6) และหมู่ secondary alcohol (-CHOH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (C-3) การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี (chemical modification) ของทั้งสามหมู่ฟังก์ชันนี้สามารถก่อให้เกิดวัสดุต่างๆ ในการใช้งานที่แตกต่างกันมากมาย (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

5. ประโยชน์ของไคตินและไคโตแซน

ไคตินและไคโตแซนมีศักยภาพในการใช้ประโยชน์สูง สามารถนำไปใช้ได้หลายสาขา ได้แก่

5.1 ด้านการแพทย์และเภสัชวิทยา

เนื่องจากไคติน-ไคโตแซนเป็นสารธรรมชาติ ดังนั้นร่างกายมนุษย์จึงไม่ทำการต่อต้าน นอกจากนี้ไคติน-ไคโตแซนยังสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ Brzeski (1987) และ Anonymous (1989) ได้สรุปการใช้ประโยชน์ไคตินและไคโตแซนในด้านการแพทย์และเภสัชวิทยาดังต่อไปนี้ เช่น ใช้เป็นเลนส์สายตา เนื่องจากมีคุณสมบัติยอมให้ออกซิเจนผ่านเข้าออกได้ ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา อนุพันธ์ของไคโตแซนบางชนิด ใช้เป็นสารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นตัวจับคอเลสเตอรอลและใช้ในด้านทันตกรรมเป็นสารเชื่อมหรืออุดฟัน

5.2 ด้านการเกษตร

ได้มีการพัฒนาการนำไคติน-ไคโตแซนไปใช้ทางการเกษตรอย่างมากมาย เช่น การเคลือบเมล็ดพันธุ์ ส่วนผสมในอาหารสัตว์ ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าไส้เดือนดิน ยาฆ่า/ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ในสหรัฐอเมริกาใช้ไคโตแซนเคลือบเมล็ดข้าวสาลีเพื่อป้องกันเชื้อรา ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 20 ส่วนการใช้ไคตินในการเตรียมดินสำหรับเพาะปลูกสามารถลดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราในดิน นอกจากนี้มีการใช้ไคตินในการจับกับสารเคมีหรือยากำจัดโรคพืชชนิดต่างๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวช่วยปลดปล่อยสารเหล่า

นั้น ทำให้ลดการสูญเสียสารเคมีและยากำจัดโรคพืชซึ่งใช้ในทางเกษตรกรรมได้ (Brzeski, 1987) นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบผิวผลไม้ เพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงและทำให้ผลไม้มีลักษณะใกล้เคียงกับธรรมชาติและมีคุณภาพดีให้ได้นานที่สุด

5.3 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

มีการพัฒนาการใช้ไคโตแซนมากขึ้น เช่น นำมาทำมายองเนส เนยถั่ว และในอนาคตอาจถูกนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มอาหาร ซึ่งไม่เป็นพิษและมีความแข็งแรงสูง เช่น พวกปลอกหุ้มไส้กรอก วัสดุห่ออาหารเข้าเตาอบ และการบรรจุหีบห่อสำหรับอาหารต่างๆ การถนอมรักษาอาหาร ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร สารกันบูด เนื่องจากมีประจุบวกจึงมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียและเชื้อรา ไคติน-ไคโตแซนเป็นอาหารเสริม (nutritional additives) ที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าร่างกาย เนื่องจากคนไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไคติน-ไคโตแซน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนัก (diet food)(ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

5.4 ด้านอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ

ไคตินมีศักยภาพมากที่สุดในการผลิตกระดาษ เพราะการเพิ่มไคตินเพียง 1 % โดยน้ำหนักลงในการผลิตเยื่อกระดาษ จะเพิ่มความทนทานของกระดาษและเร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ และเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่เหลือ เมื่อทำเป็นแผ่นกระดาษแล้วทำให้สามารถผลิตเยื่อกระดาษที่ต้นทุนต่ำกว่า พร้อมทั้งประหยัดพลังงานที่ใช้ตีเยื่อกระดาษได้มากถึง 90% กระดาษที่ผสมไคตินจะมีความแข็งแรงขณะเปียกดีขึ้นอย่างมาก ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงช้อปปิ้งและกระดาษเช็ดมือ (ธีรพล ประมวลกิจจา, 2534) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพให้แก่กระดาษและพัฒนาผลิตภัณฑ์กระดาษชนิดพิเศษ เพื่อใช้ในด้านการพิมพ์ด้วยเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่ทันสมัย โดยใช้ร่วมกับหมึกพิมพ์ที่มีประจุลบ (anionic inks) ซึ่งส่งผลให้ได้งานพิมพ์ที่สวยงามคมชัดยิ่งขึ้น (Allan *et al.*, 1972; Hirano, 1996)

5.5 การทำเครื่องสำอาง

ไคติน-ไคโตแซนถูกใช้เป็นสารทำให้ข้น (thickening agent) และสารเติมแต่ง (additive) ในผลิตภัณฑ์ประเภท hair care, skin care และ oral care ญี่ปุ่นและเยอรมันได้พัฒนาเกลือไคโตแซนซึ่งละลายน้ำได้จากกระบวนการง่ายๆ คือ นำไคโตแซนมาทำ

Central Library
Prince of Songkla University

ปฏิกิริยากับกรดสำหรับใช้ในเครื่องสำอางประทินผิวและชุดบำรุงรักษาผม ไคโตแซนใช้เป็นสารเพิ่มความข้นเหนียวในครีมและคอนดิชั่นเนอร์ อนุพันธ์ของไคตินบางตัวถูกนำมาใช้แทนกรดไฮอะลูโลนิคที่เป็นส่วนผสมในครีมและโลชั่น ทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น แชมพู สบู่เหลว โฟมอาบน้ำ ยาสีฟัน และครีมทาหน้า (ธีรพล ประมวลกิจจา, 2534)

5.6 การใช้เป็นสารตกตะกอนในการบำบัดน้ำเสียและโลหะหนักในน้ำ

ในด้านนี้จะอาศัยสมบัติความเป็น polyelectrolyte และความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะหนักของไคโตแซน

<u>ใช้บำบัดน้ำเสีย</u>

มีการใช้สารที่มีประจุทั้งชนิดประจุบวกและประจุลบในการแก้ปัญหาน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งรวมถึงการลดปริมาณของแข็งทั้งหมด และการตกตะกอนโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอน ได้มีการนำไคโตแซนไปใช้ร่วมกันกับ cationic polymers หรือ multivalent inorganic salt เช่น อะลูมิเนียมซัลเฟต หรือเฟอริกซัลเฟต ทำให้ไคโตแซนสามารถลดของแข็งสารแขวนลอยในน้ำทิ้งได้ 70-80% และแยกโปรตีนได้ 13-68% นอกจากนี้ไคโตแซนยังสามารถใช้ลดปริมาณความชื้นใน sludge ที่เกิดจากการกำจัดน้ำเสียแบบ activated sludge ได้อย่างดีด้วย (Asano, 1978)

<u>ใช้กำจัดโลหะหนักและสารพิษ</u>

โลหะหนักเป็นสิ่งที่มีพิษต่อร่างกายเมื่อได้รับในปริมาณมากเกิน และอาจมีฤทธิ์สะสมก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้นจึงมีการใช้ไคตินและไคโตแซนในกระบวนการกำจัดน้ำเสีย เพื่อแยกโลหะหนักและโลหะมีพิษ เช่น Cu^{++}, Cr^{+++}, Ni^{++}, Zn^{++}, Fe^{+++} และ Mn^{++} เป็นต้น นอกจากนี้ไคตินและไคโตแซนยังสามารถจับกับสารกำจัดแมลง เช่น DDT และสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำ เช่น พลูโตเนียม เมทธิลเมอร์คิวรีอะซิเตท ซึ่งเกิดจากโรงงานผลิตอะเซทตัลดีไฮด์ ตลอดจนมีการใช้ไคโตแซนในการกำจัดปิโตรเลียมและผลิตภัณฑ์ในน้ำเสีย โดยความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตแซนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เวลาในการดูดซับ ขนาดหรือพื้นที่ผิวของไคโตแซน ความเข้มข้นของไอออนเริ่มต้น และคุณภาพของไคโตแซน เป็นต้น (Hirano, 1996)

5.7 อุตสาหกรรมทอผ้า

ความพยายามในการผลิตเส้นใยจากไคติน-ไคโตแซนได้มีมานาน โดยไคตินสามารถใช้ป้องกันการหดตัวของเนื้อผ้าได้ ส่วนไคโตแซนใช้กำจัดสีในน้ำเสียจากการย้อม บริษัทในประเทศญี่ปุ่นหลายแห่งได้ทำการผลิตเส้นใยสังเคราะห์ เช่น เส้นใยอะครีลิค เส้นใยพอลิยูริเทน ที่เคลือบด้วยไคติน-ไคโตแซน และทอผ้าใยสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยชั้นของไคโตแซน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีสมบัติในการควบคุมความชื้น ซับเหงื่อได้ดี ทำให้รู้สึกสวมใส่สบาย ทนต่อการซักล้าง สีติดทนนาน และยังป้องกันแบคทีเรียและเชื้อราด้วย นอกจากเส้นใยสังเคราะห์แล้วไคโตแซนยังถูกนำมาใช้กับเส้นใยธรรมชาติ (ฝ้าย) เพื่อปรับปรุงสมบัติต่างๆ เช่น ให้ยับยาก ง่ายต่อการดูแลรักษา และสีย้อมติดอย่างสม่ำเสมอ ไคโตแซนนอกจากจะถูกใช้ประโยชน์เป็นเส้นใยโดยตรงแล้ว ยังถูกใช้เป็นตัวเชื่อม (binder) ในหมึกพิมพ์ (anionic ink) และสีย้อม (dye) เพื่อให้สียึดติดดี แห้งเร็ว ทนต่อน้ำและตัวทำละลาย เป็น thickening agent และ dispersing agent ที่สามารถใช้ร่วมกับสารอื่นได้ดี (Foster and Webber, 1960)

5.8 การใช้เป็นสารโมเลกุลยาวตัวใหม่เพื่อประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีพอลิเมอร์

ในปี ค.ศ. 1984 Knorr ได้เสนอว่า ไคโตแซนน่าจะสามารถใช้เป็นตัวพา (carrier) สารปรุงแต่งรสอาหารต่างๆ หรือนำสารเสริมสุขภาพต่างๆ ที่จะผสมในอาหาร สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะไคโตแซนสามารถเกิดเป็นร่างแห (matrix) และมีลักษณะเป็นเจล ซึ่งสามารถหุ้มสารที่จะพาเอาไว้ข้างในได้ และถูกย่อยสลายได้ด้วยไลโซไซม์ซึ่งมีอยู่ในร่างกายของคนเราได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถสร้างร่างแหโดยใช้โมเลกุลของไคโตแซนต่อกัน โดยธาตุที่มีประจุลบมากกว่า 1 ประจุ (multivalent anions) ภายในร่างแหนี้สามารถจับหรือกักเซลล์จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ (immobolization of whole cells or enzyme) หรือพวกส่วนผสมเข้มข้น ซึ่งอันนี้เป็นการประยุกต์ใช้ร่างแหไคโตแซนในการตรึงเอนไซม์ (Knorr, 1984)

6. กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนและอนุพันธ์ไคโตแซน

6.1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนและอนุพันธ์ไคโตแซน

No และคณะ (2002) พบว่า ไคโตแซนจากเปลือกปูโดยทั่วไปจะมีผลยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบที่ความเข้มข้นไคโตแซนเป็น 0.1% และความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตแซน (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้จะอยู่ในช่วง 0.05->0.1% (น.น. /ปริมาตร) ขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตแซนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์

Bacteria		Mw (kDa)					
		1671	1106	746	470	224	28
Gram (-)	*Escherichia coli*	0.1[1]	>0.1	0.08	0.08	0.1	>0.1
	Pseudomonas fluorescens	0.1	>0.1	0.08	0.08	0.08	0.1
	Salmonella typhimurium	>0.1	>0.1	>0.1	0.08	0.1	>0.1
	Vibrio parahaemolyticus	0.1	>0.1	0.08	0.08	0.1	>0.1
Gram (+)	*Listeria monocytogenes*	0.1	>0.1	0.08	0.08	0.08	0.1
	Bacillus megaterium	0.08	0.05	0.08	0.05	0.05	0.08
	Bacillus cereus	0.08	>0.1	0.08	0.05	0.05	>0.1
	Staphylococcus aureus	0.1	>0.1	0.08	0.08	0.08	>0.1
	Lactobacillus plantarum	>0.1	0.08	0.05	0.1	0.05	0.05
	Lactobacillus brevis	0.08	0.05	>0.1	0.1	>0.1	0.08
	Lactobacillus bulgaricus	>0.1	0.08	>0.1	>0.1	0.1	0.1

[1]Minimum inhibitory concentration (%) after incubation for 72 h at 37 °C

ที่มา: ดัดแปลงจาก No และคณะ (2002)

ส่วนกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของอนุพันธ์ไคโตแซนที่ละลายน้ำได้ เช่น chitosan -lactate, chitosan hydroglutamate, chitosan glutamate และอนุพันธ์ของ

ไคโตแซนจากเชื้อรา *Absidia coerulea* มีรายงานไว้ว่า chitosan glutamate และ chitosan lactate สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งกรัมบวกและกรัมลบ โดยสามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ 1-5 log cycle ภายใน 1 ชั่วโมง (Sadharshan *et al.*,1992 อ้างโดย Shahidi *et al.*; 1999)

Wang (1992) พบว่า ไคโตแซนที่ความเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นประสิทธิภาพของการยับยั้งแบคทีเรียก็ยิ่งเพิ่มขึ้น Wang ได้ทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium* และ *Listeria monocytogenes* โดยใช้ไคโตแซนที่ความเข้มข้นเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% ในอาหาร พีเอช 5.5 และ 6.5 พบว่า ไคโตแซนสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *E. coli, S. typhimurium, Y. enterocolitica* และ *L. monocytogenes* ตามลำดับ ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.0-1.5% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากบ่มเชื้อไว้ 2 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารพีเอช 5.5 และ 6.5 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น 2.0-2.5% ก็ยิ่งสามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้เร็วขึ้นหลังจากบ่มเชื้อไว้เพียง 1 วันเท่านั้น ส่วนเชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี พีเอช 6.5 จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจากบ่มไว้ 2 วัน ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0% ในอาหารพีเอช 5.5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์หลังจากบ่มไว้ 2 วันและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.5-2.5% ก็สามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้อย่างสมบูรณ์หลังจากบ่มเชื้อเพียง 1 วันเท่านั้น Simpson และคณะ (1997 อ้างโดย Shahidi *et al.*,1999) พบว่าไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0.005% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และ *Proteus vulgaris* ได้บางส่วน และจะยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ไคโตแซนความเข้มข้น >0.0075% ขณะที่ No และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *E. coli* จะถูกยับยั้งได้เมื่อใช้ไคโตแซนเข้มข้น 0.08->0.1%

จากความหลากหลายของความเข้มข้นของไคโตแซนที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย อาจเป็นไปได้ว่ามีผลเกี่ยวเนื่องมาจากความแตกต่างของวิธีการทดสอบ, คุณสมบัติของไคโตแซน เช่น น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนหรือระดับการกำจัดหมู่

อะซิติลที่แตกต่างกัน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนั้นๆ และชนิดของสภาวะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เป็นต้น

6.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของไคโตแซนและอนุพันธ์ไคโตแซน

ไคโตแซนนอกจากผลิตได้จากการกำจัดหมู่อะซิติลออกจากไคตินแล้วยังพบได้ในผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด เช่น *Basidiomycetes* spp. อีกด้วย กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนและอนุพันธ์ของไคโตแซนต่อเชื้อราที่สำคัญในอาหารยังคงมีการศึกษากันอยู่น้อย ส่วนใหญ่มักจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียมากกว่า การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อราโดยไคโตแซนมักจะทำการศึกษาในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยเฉพาะการยับยั้งเชื้อราของผลิตภัณฑ์เกษตรหลังเก็บเกี่ยว ได้แก่ ผลิตภัณฑ์พวกผัก ผลไม้ เช่น มะนาว ส้ม มะเขือเทศ แครรอท สตรอบอรี่ ลำไย เป็นต้น เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและคงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไว้ รวมทั้งเป็นการลดการใช้สารเคมีที่ให้ผลกระทบต่อผู้บริโภคได้

Hirano และ Nagano (1989) พบว่า ไคโตแซนสามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ โดยมีเอนไซม์ไคติเนสในเนื้อเยื่อพืชเป็นตัวกระตุ้น และไคโตแซนยังสามารถกระตุ้นการสะสมของสารยับยั้งเชื้อรา phytoalexin pisatin ใน pea pods อีกด้วย

Fang และคณะ (1994) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของไคโตแซนในส้มจีน พบว่า ส้มจีนที่ผ่านการจุ่มแช่ในสารละลายไคโตแซน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 59 วัน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคโตแซน 0.1-5.0 มก/มล โดยที่ประสิทธิภาพการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของไคโตแซน และไคโตแซนที่ความเข้มข้น ≥3.0 มก/มล (3.0-5.0 มก/มล) จะเหมาะสมที่สุดสำหรับการยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus*

Roller และ Covill (1999) ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราของไคโตแซนในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่า จากเชื้อรา 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus flavus, Cladosporium cladosporioides, Mucor racemosus, Penicillium aurantiogriseum* and *Byssochlamys* spp. 3 สายพันธุ์ ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.0 ก/ล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. racemosus* ได้ และที่ความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น 5 ก/ล สามารถยับยั้ง

รา *Byssochlamys* spp. 3 สายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่การยับยั้งเชื้อรา *P. aurantiogriseum, C. cladosporioides* และ *A. flavus* ต้องใช้ไคโตแซนเข้มข้นถึง 10 ก/ล

6.3 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อยีสต์ของไคโตแซนและอนุพันธ์ไคโตแซน

Roller และ Covill (1999) ศึกษาผลการยับยั้งของไคโตแซนกลูตาเมตต่อเชื้อยีสต์ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* 3 สายพันธุ์ (3085, SD และ 28), *Zygosaccharomyces bailii* 2 สายพันธุ์ (HP และ 906), *Schizosaccharomyces pombe, Saccharomycodes ludwigii* และ *Saccharomyces exiguus*) ในน้ำแอปเปิ้ลที่มีพีเอช 3.4 พบว่า การใช้ไคโตแซนกลูตาเมต 0.1 และ 0.4 ก/ล สามารถยับยั้ง *S. cerevisiae, Z. bailii, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomycodes ludwigii* และ *S. exiguus* ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 32 วัน แต่มีเพียงสายพันธุ์ *Saccharomycodes ludwigii* ที่ทนไคโตแซนกลูตาเมตความเข้มข้น 5 ก/ล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้นาน 14 วัน ยีสต์ที่ไวต่อไคโตแซนกลูตาเมตมากที่สุด คือ *Z. bailii* 906 โดยจะถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วยไคโตแซนกลูตาเมตที่เข้มข้น 0.1 ก/ล เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 วัน และผลการยับยั้งโดยไคโตแซนกลูตาเมตเข้มข้น 0.4 ก/ล ก็มีผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งผลการยับยั้งที่ได้มีผลคล้ายกับการยับยั้งเชื้อ *S. cerevisiae* 3085 ซึ่งถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วยไคโตแซนกลูตาเมตเข้มข้น 0.4 ก/ล เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อยีสต์โดยไคโตแซนในธรรมชาติและไคโตแซนที่ถูกย่อยแล้วที่ความเข้มข้น 0.3 ก/ล สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมไคโตแซนโดยประสิทธิภาพการยับยั้งของทั้งไคโตแซนในธรรมชาติและไคโตแซนที่ถูกย่อยแล้วมีผลไม่แตกต่างกัน (Rhoades and Roller, 2000)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของไคโตแซนในการยับยั้งจุลินทรีย์

7.1 น้ำหนักโมเลกุลและความหนืดของไคโตแซน

ไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า $1x10^6$ Da ในขณะที่ไคโตแซนจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $1x10^5$ ถึง $1.2 x10^6$ Da ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการผลิต (ภาวดี เมธะคานนท์และคณะ, 2542)

น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนจะมีความสัมพันธ์กันกับกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เนื่องจากไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดค่อนข้างมากทำให้ยากต่อการดูดซึมเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ No และคณะ (2002) ศึกษาถึงผลของความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของโอลิโกเมอร์ไคโตแซน (oligomerchitosan) พบว่า โอลิโกเมอร์ไคโตแซนจะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียกรัมลบเพิ่มขึ้นตามการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล โดยโอลิโกเมอร์ไคโตแซนน้ำหนักโมเลกุล 1 kDa จะให้ผลยับยั้งต่อแบคทีเรียกรัมลบได้ดีกว่าโอลิโกเมอร์ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4 และ 2 kDa ที่ให้ผลการยับยั้งได้ดีในแบคทีเรียกรัมบวก

Cho และคณะ (1998 อ้างโดย No *et al.*, 2002) รายงานไว้ว่า กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนต่อเชื้อ *E. coli* และ *Bacillus* sp. จะเพิ่มขึ้นตามการลดลงของความหนืดจาก 1000 ถึง 10 เซนติพอยต์ (CP) เช่นเดียวกันกับ Jeon และคณะ (2001 อ้างโดย No *et al.*, 2002) พบว่าโอลิโกเมอร์ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 ถึง 1 kDa จะมีผลการยับยั้งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยประสิทธิภาพของการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล

ความหนืดของสารละลายไคโตแซนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล,ระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติล, สภาวะบรรยากาศ, น้ำหนักโมเลกุล, ความเข้มข้น, ionic strength, ความเป็นกรดด่าง (pH) และอุณหภูมิ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่การใช้อุณหภูมิ 145-150 องศาเซลเซียสในการกำจัดหมู่อะซิติลจะมีผลทำให้ความหนืดของไคโตแซนน้อยกว่าการใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (สุทธวัฒน์ เบญจกุล และไพรัตน์ โสภโณดร, 2533ข) และเมื่อใช้ระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติลนานมากขึ้น ความหนืดของไคโตแซนก็จะลดลงเช่นเดียวกัน สภาวะในการกำจัดหมู่อะซิติลก็มีผลต่อความหนืดของไคโตแซนด้วย โดยการกำจัดหมู่อะซิติลในสภาพที่มีออกซิเจนจะได้ไคโตแซนที่มีความหนืดน้อยกว่าในสภาพสุญญากาศ เนื่องจากในสภาพที่มีออกซิเจนมีผลต่อการทำลายโครงสร้างของไคโตแซน แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความ

หนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตแซนในกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตแซนในกรดไฮโดรคลอริก (กรดเกลือ) จะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542)

7.2 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล

ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน-ไคโตแซน เนื่องจากไคติน-ไคโตแซนเป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างสองโมโนเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่ร่วมกันของโมโนเมอร์แรกมากกว่า คือ มีค่า degree of deacetylation ต่ำ จะแสดงคุณสมบัติของ ไคติน แต่ถ้าสัดส่วนของโมโนเมอร์ที่สองมากกว่า คือมีค่า degree of deacetylation สูง จะแสดงสมบัติเด่นของไคโตแซน (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงยิ่งทำให้มีหมู่อะมิโนอิสระสามารถจับโปรตอนทำให้เกิดประจุบวกที่พีเอชเป็นกลางมากขึ้น ความแตกต่างของระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation) มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซน โดยไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงจะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่ำ (Shigemasa, 1996 อ้างโดย Tsigos *et al.*, 2000) ซึ่งการกำจัดหมู่อะซิติลสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ Tsigos และคณะ (2000) พบว่า การกำจัดหมู่อะซิติลโดยการใช้ด่างไคโตแซนที่ได้จะมีความแตกต่างกันไปตามสภาวะและความเข้มข้นของด่างที่ใช้ คือ เมื่อใช้ด่างความเข้มข้นสูงภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงๆ ไคโตแซนที่ได้จะมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 85-93% ในขณะที่การกำจัดหมู่อะซิติลโดยใช้ด่างความเข้มข้นเดียวกัน แต่มีสภาวะที่ไม่รุนแรง คือ มีอุณหภูมิต่ำกว่า ไคโตแซนที่ได้จะมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 48-55% ส่วนการกำจัดหมู่อะซิติลโดยการใช้เอนไซม์ไคตินดีอะซิติเลส (chitin deacetylases) พบว่า จะให้ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลได้สูง คือ >97% แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสีย คือ เอนไซม์มีราคาแพงและไม่สามารถควบคุมการกำจัดหมู่อะซิติลให้คงที่ได้

7.3 ตัวทำละลายที่ใช้

ไคโตแซนไม่ละลายในน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เจือจางเกือบทุกชนิดที่มีพีเอชน้อยกว่า

6.0 เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติก กรดซิตริก เป็นต้น กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกเป็นกรดที่นิยมใช้ในการละลายไคโตแซน กรดอนินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตแซนได้เช่นกันแต่ภายใต้การคนที่อุณหภูมิสูงปานกลาง อย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2542) No และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงผลของตัวทำละลายต่างๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ พบว่า ผลการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนในตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และกรดแอสคอร์บิก จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน ตัวทำละลาย 1 % กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงกว่ากรดแอสคอร์บิกและกรดโพรพิโอนิก ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของกรดสูงกว่า 1% หรือให้ความร้อนช่วยจึงจะละลายไคโตแซนได้อย่างสมบูรณ์ กรดอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรีย คือ 1% กรดอะซิติก ซึ่งให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งกรัมบวกและกรัมลบ ยกเว้น เชื้อพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) ซึ่งจะถูกยับยั้งด้วยไคโตแซนที่ละลายในกรดแลคติกและกรดฟอร์มิกได้ดีกว่ากรดอะซิติก

7.4 **ความเป็นกรดด่างของอาหาร**

พีเอชก็มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนด้วยเช่นกัน No และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของพีเอชในช่วง 4.5, 5.0, 5.5 และ 5.9 ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด (*E. coli, S. typhimurium, L. monocytogenes, S. aureus, Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis*) ของไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ระดับ (1671, 746 และ 470 kDa สำหรับเชื้อ 4 สายพันธุ์แรก และ 1106, 224, และ 28 kDa สำหรับเชื้อ *Lactobacillus*) พบว่า การยับยั้งแบคทีเรียโดยไคโตแซนจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชต่ำ โดยที่พีเอช 4.5 จะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด

Wang (1992) พบว่า กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนต่อเชื้อก่อโรคในอาหาร 5 ชนิด (*S. aureus, E. coli, Yersinia enterocolitica, S. typhimurium* และ *L. monocytogenes*) จะเกิดขึ้นได้ในอาหารที่มีพีเอช 5.5 ดีกว่าในอาหารที่มีพีเอช 6.5

Tsai และ Huey (1999) ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของไคโตแซน พบว่า ที่สภาวะพีเอชเป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด โดยได้ศึกษาพีเอชในช่วง 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ซึ่งที่พีเอช 5.0 และ 6.0 จะให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุดโดยพีเอช 5.0 ยับยั้งได้ดีกว่าพีเอช 6.0

Roller และ Covill (1999) พบว่า ที่พีเอชสูงกว่า 5.5 คุณสมบัติการละลายได้ของไคโตแซนจะลดลง และกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจะขึ้นอยู่กับจำนวนของไคโตแซนที่มีอยู่ในสารละลายโดยตรง เชื้อรา *Mucor racemosus* จะถูกยับยั้งได้โดยไคโตแซนกลูตาเมทในอาหารที่มีพีเอช 4.5 ดีกว่าในอาหารที่มีพีเอช 5.2 และที่พีเอชระดับต่ำๆ จะทำให้กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของไคโตแซนเกิดขึ้นได้ดีควบคู่กับการละลายได้ดีขึ้นของไคโตแซนด้วย

8. กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

ไคโตแซนจะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในวงกว้าง คือ ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียกรัมบวกและแบคทีเรียกรัมลบ, เชื้อราและยีสต์ (Yalpani *et al.*, 1992) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดสายพันธุ์จุลินทรีย์ และคุณสมบัติของไคโตแซนและอนุพันธ์ของไคโตแซน

เพราะว่าไคโตแซนมีประจุบวกอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C_2) ของโมโนเมอร์กลูโคซามีน (glucosamine monomer) ที่สภาวะพีเอชต่ำกว่า 6.0 จึงทำให้ไคโตแซนมีสมบัติการละลายและมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าไคติน (Chen *et al.*, 1998) สารละลายไคโตแซนมีความเหนียว ใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวโตเนียน (non-newtonian) ในสารละลายหมู่อะมิโนของไคโตแซนจะแตกตัว โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pK_a) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของโพลิเมอร์ โดย pK_a ของไคโตแซนมีค่าอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 6.8 ไคโตแซนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยทำให้เกิดการเสื่อมเสียบางชนิด เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของโมเลกุลของไคโตแซนกับประจุลบบนชั้นเมมเบรนของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ไคโตแซนจะทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดรูรั่วสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ส่งผลให้สารพวกโปรตีนและสารประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แพร่ผ่านออกมาภายนอกเซลล์และสารบางชนิดภายนอกเซลล์สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มาก

ขึ้น (Papineau *et al.*, 1991; Sudharshan *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1998 อ้างโดย Shahidi *et al.*, 1999) ทำให้เกิดการเสียสมดุลภายในเซลล์ นอกจากนี้ไคโตแซนยังมีคุณสมบัติเป็นสารจับโลหะ (chealating agent) ที่สามารถเลือกจับกับโลหะบางชนิดเพื่อยับยั้งการสร้างสารพิษ (toxin) และยังสามารถดูดซับสารชีวภาพและสารอาหารของจุลินทรีย์ได้ด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Cuero *et al.*, 1991 อ้างโดย Shahidi *et al.*, 1999) หรืออาจเป็นเพราะความสามารถในการจับกันของไคโตแซนและ DNA ของจุลินทรีย์จะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA โดยไคโตแซนจะซึมผ่านเข้าสู่นิวเคลียสของจุลินทรีย์และไปรบกวนกระบวนการสร้าง mRNA และโปรตีน (transcription and translation)(Shahidi *et al.*, 1999)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาผลของกรรมวิธีการกำจัดหมู่อะซิติลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน
2. เพื่อศึกษาผลของกรรมวิธีในการลดขนาดของโมเลกุลไคโตแซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์
3. เพื่อศึกษาการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน
4. เพื่อศึกษาปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน
5. เพื่อศึกษาผลของไคโตแซนที่เตรียมได้ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร