

## Abstract

**Research Title :** Improvement and development of antimicrobial property of chitosan prepared from black tiger shrimp head

**Researcher :** Asst. Prof. Tipparat Hongpattarakere, Ph.D.

**E-mail address :** tipparat.h@psu.ac.th

**Research period :** 1.5 years

Chitosan was prepared from black tiger shrimp carapace by deacetylation process performing in 50% NaOH at 120°C under vacuum, nitrogen and regular atmosphere. Each of the condition was carried on for 0.5, 1.0 and 2.0 h. Chitosan obtained from 1.0 h of deacetylation under regular atmosphere showed the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) value of 625 ppm against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, while *Candida albicans* was inhibited at MIC value of 313 ppm. Chitosan hydrolysates obtained from both chemical (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of ferric ions) and enzymatic (lysozyme, chitinase and papain) hydrolysis were not as inhibitory as the native one, except that from chemical hydrolysis showed the elevation of the antimicrobial activity against *C. albicans* when longer hydrolysis was performed.

The antimicrobial activity of the chitosan was dependent on type of solvent and pH. The greatest activity was exhibited when acetic acid was used to dissolve the chitosan. The highest activity was shown at acidic pH of 4.5 to 6.0. Temperatures of 72, 100 and 121°C had not influenced the antimicrobial activity of the chitosan. The antimicrobial activity (against various food-related microorganisms) of chitosan from black tiger shrimp carapace and commercial chitosan with 70, 80 and 90%DD were compared. *E. coli* cells treated with chitosan showed apparent morphological change of the outer membrane and the leakage of cytoplasmic content from transmission electron microscopy (TEM) analysis. Cytotoxic assay evaluated towards HT-29 human colon adenocarcinoma cell line at the chitosan concentration of 0.1-1.5 mg/ml appeared to be non-toxic.

**Keywords :** chitosan, antimicrobials, antibacterials, black tiger shrimp, shrimp carapace

## บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย : การพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่เตรียมจากหัวกุ้งกุลาดำ

ผู้วิจัย : ผศ.ดร. ทิพรรัตน์ หงษ์ภักดิ์ศรี

ที่อยู่ E-mail : lipparat.lh@psu.ac.th

ระยะเวลาวิจัย : 1.5 ปี

ไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำถูกเตรียมจากการทำปฏิกิริยาเชิงหมู่อะซิดิลออกโดยการใส่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% ภายใต้สถานะสุญญากาศ, สภาวะที่มีไนโตรเจน และสภาวะบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 120°C โดยใช้เวลาทำปฏิกิริยา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง พบว่าไคโตแซนที่ผลิตได้ในสภาวะบรรยากาศปกติที่เวลา 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์สูงสุดคือมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เป็น 625 พีพีเอ็ม ในการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และมีค่า MIC 313 พีพีเอ็ม ในการยับยั้ง *Candida albicans* ส่วนไคโตแซนที่ผ่านการย่อย ไม่ว่าจะย่อยด้วยวิธีทางเคมี (ใช้  $H_2O_2$  โดยมี ferric ions เป็นตัวเร่ง) หรือใช้เอนไซม์ (lysozyme, chitinase and papain) นั้นมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียไม่ดีเท่าไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย ยกเว้นไคโตแซนที่ย่อยด้วยวิธีทางเคมีซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้ดีขึ้นเมื่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสดำเนินไปนานขึ้น

นอกจากนี้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนยังขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ และพีเอช โดยพบว่าไคโตแซนที่ผลิตได้มีกิจกรรมยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุดเมื่อใช้กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลาย และในช่วงพีเอชที่เป็นกรด คือ 4.5 ถึง 6.0 ไคโตแซนจะมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด การใช้อุณหภูมิที่ระดับ 72, 100 และ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้ กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับไคโตแซนที่ผลิตขายทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิดิล 70, 80 และ 90% เมื่อนำเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย chitosan มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เทคนิคการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน (Transmission Electron Microscopy, TEM) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติไปของผนังเซลล์ส่วนนอก (outer membrane) และการรื้อของส่วน cytoplasm อย่างชัดเจน นอกจากนี้การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxic assay) ของไคโตแซนที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้น 0.1-1.5 มก./มล. ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29 human colon adenocarcinoma cell line) ไม่พบความเป็นพิษหรือการทำลายเซลล์มะเร็งแต่อย่างใด

Keywords : chitosan, antimicrobials, antibacterials, black tiger shrimp, shrimp carapace