วิจารณ์ผลการทดลอง

ไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกกส่วนหัวกุ้งกุลาดำภายใต้สภาวะสุญญกาศมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะบรรยากาศปรกติคือไม่มีการดูดอากาศออกแต่ความร้อนที่ใช้ช่วยในการไล่อากาศออก ซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถใช้เตรียมไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลในระดับร้อยละ 74.8 โดยใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองพบว่าถึงแม้จะใช้เวลามากกว่า 4 ชั่วโมงระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตแซนที่ได้ก็ไม่แตกต่างกับการใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะที่มีสุญญากาศมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปรกติมากกว่า 2 เท่า แต่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่ำกว่ามาก ส่วนการเตรียมไคโตแซนในสภาวะที่มีไนโตรเจนนั้นการกำจัดหมู่อะซิติลนั้นเกิดขึ้นช้ามาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเวลา 2 ชั่วโมงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังไม่เพียงพอ

ไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปรกติให้ผลการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่เตรียมที่สภาวะสุญญากาศและในสภาวะที่มีไนโตรเจนทั้งนี้อาจเป็นเพราะไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปรกติมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงกว่า ซึ่งผลการทดลองของไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะเดียวกันที่ 2 ชั่วโมง แสดงผลการยับยั้ง *E. coli* ได้ไม่ดีเท่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะเดียวกันและมีขนาดโมเลกุลที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามขนาดโมเลกุลของไคโตแซนก็เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนเช่นกันดังที่มีการศึกษากันกับไคโตแซนทางการค้า

ดังนั้นเพื่อให้ทราบว่าขนาดโมเลกุลจะเป็นปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ได้จากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำหรือไม่ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการย่อยสลายไคโตแซนโดยอาศัยทั้งปฏิกิริยาเคมีและวิธีการทางชีวภาพ ซึ่งก็คือการใช้ hydrolytic enzymes ชนิดต่างๆซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าขนาดโมเลกุลมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำน้อยมากเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย ยกเว้นไคโตแซนที่ย่อยแล้วโดยวิธีทางเคมี ที่ให้ผลการยับยั้งยีสต์ได้ดีกว่าไคโตแซนที่ยังไม่ย่อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hirano และ Nagano (1989) อย่างไรก็ตามไคโตแซนที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยทางเคมีให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียที่ไม่ต่างกัน จากผลการย่อยไคโตแซนโดยการใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น ไลโซไซม์ ไคติเนส และ ปาเปน ซึ่งมีการวิจัยยืนยันว่าสามารถย่อยไคโตแซนได้ (Ilyina *et al.*, 1999; Tsai, *et al.*, 2000; Pantaleome, *et al.*, 1992; Kumar, *et al.*, 2004; Rhoades and Roller, 2000; Lin *et al.*, 2002) และสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าไคโตแซนมีความหนืดลดลงเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์เหล่านี้ ส่วนผลการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นให้ข้อสรุปตรงกันว่าน้ำหนักโมเลกุลไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญหลักที่กำหนดประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ เนื่องจากว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นวิธีทางชีวภาพมีความจำเพาะกว่า อีกทั้งเป็นการย่อยในสภาวะที่ไม่รุนแรงไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารไปเป็นสารประกอบอื่น ดังนั้นผลการยับยั้งยีสต์ที่ดีขึ้นเมื่อไคโตแซนถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาเคมีอาจไม่ใช่เป็นผลมาจากไคโตแซนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงแต่อาจเป็นผลมาจากสารประกอบอื่นๆที่เป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาเคมีเสียมากกว่า เนื่องจากการย่อยโดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซนได้ เช่นการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกลุ่มคาร์บอกซิลหรือแม้แต่การกำจัดหมู่เอมีนออกจากโมเลกุลของไคโตแซน (Nordtviet *et al.*, 1994) อีกทั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาอาจมีผลทำให้เกิดโรคหรือเป็นพิษต่อมนุษย์ได้ (Chang *et al.*, 1994) นอกจากนี้ความเป็นไปได้ในการใช้

ปฏิกิริยาเคมีในการย่อยไคโตแซนก็มีข้อจำกัดเนื่องจากว่าไม่สามารถควบคุมปฏิกิริยาให้เกิดอย่างจำเพาะได้เช่นเดียวกับการใช้เอนไซม์

นอกจากนี้ผลการทดลองแสดงว่าไคโตแซนที่ผ่านการย่อยเป็นเวลานานจนมีความหนืดลดลงอย่างมากมีการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต่ำลงเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อยนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Rhoades และ Roller (2000) ที่พบว่าไคโตแซนที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์จนมีค่าความหนืดเป็น 11s หรือต่ำกว่า (เทียบกับ 802 s ของไคโตแซนที่ยังไม่ถูกย่อย) สูญ เสียคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ไปโดยสิ้นเชิง เช่นเดียวกับผลการทดลองของ No และคณะ (2002) และผลการทดลองของ Jeon และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่า ไคโตแซนที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีนั้นจะต้องมีขนาดโมกุลใหญ่กว่า 10,000 ดาลตัน อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งของไคโตแซนร่วมด้วย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ระดับการละลายได้ของไคโตแซน รวมถึงชนิดและโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซนซึ่งแตกต่างกันตามแหล่งที่มา ถึงแม้ว่ามีรายงานผลการทดลองเรื่องนี้ที่ขัดแย้งกันดังเช่นการทดลองของ Matsuhashi และ Kume (1997) ซึ่งรายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อไคโตแซนถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลงโดยการฉายรังสีแกมมา เช่นเดียวกับการทดลองของ Rhoades และ Roller (2000) ที่รายงานว่าไคโตแซนที่ถูกย่อยโดยปฏิกิริยา oxidative-reductive depolymerization มีผลการยับยั้งยีสต์เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีผลการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นกับแบคทีเรีย แต่พบว่าไคโตแซนที่ถูกย่อยโดยการใช้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าไคโตแซนที่ไม่ถูกย่อย จากผลการทดลองที่ขัดแย้งนี้มีข้อสังเกตุที่น่าสนใจว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนที่ผ่านการย่อยมักเป็นกระบวนการย่อยที่รุนแรง ดังเช่น ปฏิกิริยาเคมี หรือการใช้รังสีซึ่งก็เป็นการทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุลของสาร ซึ่งควบคุมไม่ได้ และก่อให้เกิดอนุมูลอิสระที่มีผลต่อการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของไคโตแซนและเกิดสารประกอบอื่นที่เป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดตามมา เช่นเดียวกับปฏิกิริยา oxidation-reduction ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้นในประสิทธิภาพการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นของไคโตแซนที่ถูกย่อยโดยวิธีเหล่านี้อาจเป็นผลมาจากไคโตแซนที่เปลี่ยนรูปหรือสารประกอบที่เป็นพิษซึ่งเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามขนาดของไคโตแซนที่ใหญ่มากเกินไปก็อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงได้เนื่องมาจากข้อจำกัดในการละลายของไคโตแซน ซึ่งจากการทดลองกับไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกหัวกุ้งกุลาดำในครั้งนี้สรุปได้ว่าไคโตแซนที่เตรียมได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีเพียงพอและการย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงไม่ได้ช่วยปรับปรุงคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์

การศึกษาผลของไคโตแซนต่อโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยเทคนิค transmission electron microscopy พบว่าไคโตแซนทำให้ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบเสียสภาพและเยื่อหุ้มเซลล์แตกออก และ พบว่าเซลล์ที่ยังไม่แตกมีบางอย่างมาห่อหุ้มเซลล์ทำให้ดูเหมือนว่าผนังเซลล์หนาขึ้นกว่าเซลล์ปรกติ ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้นำว่ากลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซนนอกจากจะมีผลทำให้เซลล์แตก (bactericidal activity) ซึ่งเกิดจากการที่ไคโตแซนไปเคลือบที่ผิวเซลล์ส่งผลไปขัดขวางการทำงานในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (permeability) ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญและขยายพันธุ์ได้ สนับสนุนข้อสรุปที่ว่าไคโตแซนที่ไม่ถูกย่อยหรือมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ที่สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen และ Hwa (1996) ซึ่งพบว่าแผ่นเยื่อบาง (membrane) ที่เตรียมจากไคโตแซนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่มีคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (membrane permeability) ลดลง การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำมักมีผลเพียงแค่ไปยับยั้งการเจริญได้ชั่วคราว (bacteriostatic activity) ซึ่งเมื่อแบคทีเรียที่สามารถสร้าง hydrolytic enzymes มาย่อยไคโตแซนที่เคลือบอยู่ได้ก็จะสามารถกลับมาเจริญได้ใหม่ ดังที่พบในการทดลองนี้ที่รายงานในภาพที่ 2 ซึ่งมี

การทดลองมากมายสนับสนุนอยู่แล้วว่า hydrolytic enzymes หลายชนิดสามารถย่อยสลายไคโตแซนได้ดังที่อ้างถึงไว้ข้างต้น อีกประการหนึ่งมีรายงานว่า กลไกการเปลี่ยนคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของไคโตแซน คล้ายกับสารประกอบประจุบวกอื่นๆเช่น polyethyleneimine (PEI) polymyxin B nonapeptide (PMBN) เพียงแต่ไคโตแซนนั้นนั้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ย้อนกลับได้เมื่อเซลล์กลับมาอยู่ในสภาวะที่ไม่มีไคโตแซน ซึ่งทำให้การใช้ไคโตแซนความเข้มข้นต่ำมักให้ผลการยับยั้งมากกว่าการทำลายเซลล์ ซึ่งหลักฐานที่สนับสนุนข้อคิดเห็นนี้คือการทดลองของ Helander และคณะ (2001) ที่แสดงภาพถ่ายอิเลคตรอนของเซลล์ *E. coli* ที่อยู่ในสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นต่ำ 250 พีพีเอ็ม ว่ามีความผิดปรกติของผนังเซลล์ และมีสารมาเคลือบที่ผนังเซลล์หนาขึ้นแต่ไม่พบเซลล์แตก แต่การทดลองนี้สรุปว่าไคโตแซนมีผลในการลดการเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังเซลล์แบคทีเรียเท่านั้น ซึ่งต่างจากการทดลองในรายงานฉบับนี้ที่พบว่าไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำมีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียบางส่วนทำให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่วและแตกในที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนที่ 650 พีพีเอ็ม) จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของไคโตแซนเป็นผลให้ผนังเซลล์เกิดการเสียสภาพโดยสิ้นเชิงและเกิดการรั่วไหลของสารประกอบต่างๆในไซโตพลาสซึม

ผลการทดลองที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้กับไคโตแซนทางการค้าได้ข้อสังเกตว่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลน่าจะมีอิทธิพลในการกำหนดประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน มากกว่าปัจจัยอื่นๆ ซึ่งบ่งชี้ว่าคุณสมบัติการมีประจุเป็นบวกของหมู่อะมิโนที่ C-2 ที่ทำให้ไคโตแซนมีลักษณะเป็น polycationic structure เป็นกุญแจสำคัญในต่อคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ และจากผลการศึกษาระดับของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนก็สนับสนุนข้อสังเกตุนี้ คือกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับพีเอชต่ำกว่า 6.5 ดีกว่าที่พีเอชสูงกว่า 6.5 เนื่องจากที่ระดับพีเอชต่ำกว่า 6.5 โมเลกุลของไคโตแซนแสดงประจุเป็นบวก เพราะค่า pKa ของหมู่อะมิโนในโมเลกุลไคโตแซนนั้นมีค่า 6.3 (Helander *et al.*, 2004) ดังนั้นหากไคโตแซนมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงขึ้นก็จะทำให้มีหมู่อะมิโนในสายไคโตแซนมากขึ้นส่งผลให้ประจุบวกเพิ่มสูงตามไปด้วย โดยคาดว่าประจุบวกของไคโตแซนคงไปทำอันตรกิริยากับส่วนประกอบที่มีประจุเป็นลบของผนังเซลล์แกรมลบ เช่น lipopolysaccharides และ โปรตีน ซึ่งสนับสนุนโดยผลการทดลองของ Helander และคณะ (2001) ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่มีประจุบนผนังเซลล์ที่เป็นบวก (*pmr*A mutant of *Salmonella typhimurium*) สามารถทนต่อไคโตแซนได้ในระดับที่สูงกว่าเซลล์พ่อแม่ ยิ่งไปกว่านั้นที่พีเอชเป็นกรดนั้นหมู่คาร์บอกซิลและหมู่ฟอสเฟต บริเวณผนังเซลล์มีประจุเป็นลบ ซึ่งเพิ่มศักยภาพในการเข้าไปจับของไคโตแซนให้สูงขึ้น