วิธีการวิจัย

1. การเตรียมวัตถุดิบ (หัวกุ้งกุลาดำ) เพื่อสกัดไคตินและการสกัดไคติน

นำหัวกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอาหารทะเลแช่เยือกแข็ง (บ. ปิติซีฟู้ด จำกัด) มาแยกเอาส่วนเนื้อ และอวัยวะภายในออกเหลือแต่เฉพาะส่วนเปลือกแล้วล้างให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปลดขนาดโดยใช้เครื่องบดหยาบ แล้วร่อนด้วยตะแกรงเพื่อให้ได้เปลือกกุ้งขนาด 2.0-4.0 มม.

นำเปลือกกุ้งที่ได้มาทำการสกัดไคติน ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ การกำจัดโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 5 (นน./ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100°ซ 1 ชม. โดยใช้อัตราส่วนของหัวกุ้งต่อสารละลายด่าง 1: 10 (นน/ปริมาตร) จากนั้นจึงล้างให้หมดด่างจนเป็นกลาง (ทดสอบโดยการหยดสารละลาย phenolphthaline) แล้วนำมาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างจนหมดกรด แล้วอบส่วนที่เหลือซึ่งเป็นไคตินที่อุณหภูมิ 65°ซ 6 ชั่วโมง

2. ศึกษาผลของสภาพบรรยากาศและระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ได้

นำไคตินที่เตรียมได้จากข้อ 1 มากำจัดหมู่อะซิติลโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 50 (นน./ปริมาตร) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างไคตินและสารละลายด่าง 1 : 15 (นน./ปริมาตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°ซ (Benjakul and Sophanodora, 1990) ในสภาวะบรรยากาศแบบต่างๆดังนี้

2.1. สุญญากาศ เป็นเวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง

2.2. บรรยากาศปกติ เป็นเวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง

2.3. ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลานำตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดหมู่อะซิติลที่สภาวะบรรยากาศ และเวลาต่างๆ มาล้างด้วยน้ำจนหมดด่าง อบไคโตแซนในตู้อบที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บไคโตแซนในขวดสีชา แล้วทำการวิเคราะห์คุณสมบัติต่อไปนี้

- ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนโดยวิธี broth microdilution technique (Holt and Brown, 1998) เพื่อหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของไคโตแซนที่ได้จากสภาวะต่างๆข้างต้น วัดการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย microplate reader โดยทดสอบกับจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ *E coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* แล้วคัดเลือกไคโตแซนที่มีค่าการยับยั้งสูงสุด มาทำการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่อไป
- ความชื้น โดยวิธี AOAC (1984)
- ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลโดยวิธี colloid tritation method (Toei and Kohara, 1976)
- ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุล ตามวิธีการของ Chen and Hwa (1996)
- วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค gel permeation chromatography, PL-GPC 110 โดยใช้ Ultrahydrogel linear 1 columnปริมาตรตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร อัตราการไหล 0.6 มล/นาที อุณหภูมิ 30°ซ โดยมี 0.5 M acetic buffer (0.5 M acetic acid และ 0.5 M sodium acetate, พีเอช 3.0) เป็นตัวชะ (eluent) และ Refractive Index Detector เป็นเครื่องตรวจจับ การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลใช้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน pullulans (polysaccharide standard kits, MW 5,800-788,000)

3. ศึกษาผลการใช้สารเคมีและเอนไซม์ในการลดขนาดของไคโตแซน และผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ย่อยได้

นำไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาผ่านกระบวนการต่อไปนี้ แล้วทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ ความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน เช่นเดียวกับข้อ 2

3.1. การใช้วิธีทางเคมี oxidative-reductive method (Rhoades and Roller, 2000) โดยการเตรียมสารละลายไคโตแซน 5 กรัม/ลิตร ใน กรดอะซิติกร้อยละ 1 แล้วนำมาผสมกับ 1 มล. ของสารละลาย 10 mM $FeCl_2$ แล้วเติมสาร hydrogen peroxide ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10, 20, 30 และ 50 mM ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ และวัดค่าความหนืด ภายใน 24 ชั่วโมง โดยเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4°ซ เปรียบเทียบผลการยับยั้งของไคโตแซนที่ถูกย่อยที่เวลาต่างๆ

3.2. การใช้เอนไซม์ lysozyme ที่มีกิจกรรม 50,000 U/mg มาย่อยสารละลายไคโตแซนเข้มข้น 2.5 กรัม/ลิตร ของสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 เข้มข้น 10 mM โดยใช้เอนไซม์ ร้อยละ 0.025 (นน./ปริมาตร) คนสารละลายอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 5 และ 10 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มเป็นเวลา 30 นาที (Rhoades and Roller, 2000) นำสารละลายไคโตแซนไฮโดรไลเสทมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ และวัดค่าความหนืด เปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์กับไคโตแซนที่ไม่ถูกย่อย

3.3. การใช้เอนไซม์ chitinase

3.3.1. การใช้ chitinase ในการย่อยไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.5.2 โดยการละลายไคโตแซนใน 0.2 M sodium acetate buffer พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 45°ซ แล้วเติมเอนไซม์ chitinase ให้มีค่ากิจกรรมสุดท้าย 0.02 U/ml เก็บตัวอย่างที่ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ผ่านไป 0, 10, 20 และ 30 นาที 24 และ 48 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที (Ilyina *et al.*, 1999 และ 2000) นำสารละลายไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่ได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ และวัดค่าความ เปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์กับไคโตแซนที่ยังไม่ถูกย่อย

3.3.2. การใช้เอนไซม์ปาเปน (papain, food grade EC 3.4.22.2 สกัดจากมะละกอ)ในการย่อยไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.5.2 โดยการละลายปาเปนใน 0.2 M sodium acetate buffer พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50°ซ แล้วเติมเอนไซม์ปาเปน ให้มีค่ากิจกรรมสุดท้าย 15,000 U/ml แล้วเติม L-cysteine ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 mM เก็บตัวอย่างที่ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ผ่านไป 0, 10, 20 และ 30 นาที 24 และ 48 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มเป็นเวลา 20 นาที (Muzzarelli *et al.*, 1994) นำสารละลายไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่ได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ และวัดค่าความ เปรียบเทียบผลการยับยั้งของไคโตแซนที่ยังไม่ถูกย่อย

4. ศึกษาปัจจัยต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

4.1. ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากข้อ 3 โดย broth microdilution technique เช่นเดียวกับข้อ 6.5.3 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hilton Broth (MHB) ที่เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เปรียบเทียบค่า MIC ของไคโตแซนที่แต่ละพีเอช

4.2. ศึกษาเปรียบเทียบผลของกรดอินทรีย์ ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลกติก กรดฟอร์มิก ที่ใช้ในการละลายไคโตแซนต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน โดย broth microdilution technique เปรียบเทียบค่า MIC ของไคโตแซนที่ละลายในกรดแต่ละชนิด

4.3. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดจากข้อ 3 โดยการนำสารละลายไคโตแซนมาให้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 70°ซ 15 นาที, 100°ซ 15 นาที และ 121°ซ 15 นาที แล้วนำสารละลายไคโตแซนที่ผ่านความร้อนแล้วมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี broth microdilution technique เปรียบเทียบค่า MIC ของไคโตแซนที่ผ่านความร้อนในระดับต่างๆ

ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้ และที่มีขายทางการค้าที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกัน และ มีระ ดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 70, 80 และ 90 ต่อ *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus cereus*, *Penicillium* sp. และ *C. albicans* โดยวิธี broth microdilution technique เปรียบเทียบค่า MIC

5. ศึกษาผลการยับยั้งของไคโตแซนที่เลือกได้จากข้อ 3 ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับอาหารเปรียบเทียบกับไคโตแซนที่มีขายทางการค้า

ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้ และที่มีขายทางการค้าที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆกัน และ มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 70, 80 และ 90 ต่อ *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria* sp. *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus cereus*, *Penicillium* sp. และ *C. albicans* โดยวิธี broth microdilution technique เปรียบเทียบค่า MIC

6. ศึกษาผลของไคโตแซนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ *E. coli*

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ *E. coli* ที่สัมผัสกับไคโตแซนระดับความเข้มข้น 650 พีพีเอ็ม ถูกศึกษาเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกสัมผัสกับไคโตแซน (กรดอะซิติก 0.05%) โดยการใช้เทคนิคการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน (Transmission Electron Microscopy, TEM) ตามวิธีของ Johannesser. (1981)

7. การทดสอบความเป็นพิษของไคโตแซนต่อเซลล์ไลท์มนุษย์ในหลอดทดลอง (Cytotoxicity assay) โดยวิธีของ Skehan และคณะ (1995)

ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัย

1. การสกัดไคติน การเตรียมไคโตแซนและคุณสมบัติของไคแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ

วัตถุดิบเริ่มต้นเป็นหัวกุ้งกุลาดำสดที่มีส่วนที่เป็นอวัยวะภายใน ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการถึง 58.4 % (ดังแสดงในตารางที่ 1) วัตถุดิบที่รับมาจึงต้องผ่านกระบวนการทำความสะอาด และเอาส่วนที่ไม่ต้องการเหล่านี้ออกให้เหลือส่วนที่เป็นส่วนเปลือกของหัวกุ้ง (carapace) ซึ่งเมื่ออบแห้งแล้วเหลือผลผลิตเพียง 13.3% ของวัตถุดิบเริ่มต้น หลังจากการนำเปลือกหัวกุ้งมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบด (2.0-4.0 มม.) จะเหลือเปลือกกุ้งที่พร้อมจะนำมาใช้เตรียมไคตินเพียง 4.58% ของวัตถุดิบเริ่มต้นและเมื่อผ่านกระบวนการสกัดไคตินเหลือผลผลิตไคติน 0.91% คือ จากวัตถุดิบสด 100 กก. ได้ผลผลิตไคตินเพียง 910 กรัม ซึ่งจากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการสูญเสียส่วน

เปลือกนั้นเกิดจากการบดและร่อนเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนเปลือกที่มีขนาดสม่ำเสมอถึง 65.6 % เนื่องจากประสิทธิภาพของเครื่องบดและการสูญเสียในขณะร่อนผ่านตะแกรง ซึ่งจากเปลือกหัวกุ้งบดนำมาสกัดได้ไคตินเพียง 19.9% ซึ่งสูงกว่าไคตินที่สกัดได้จากเปลือกปูที่มีรายงานว่าสกัดไคตินได้ 10% แต่ต่ำกว่าปริมาณไคตินของปลาหมึกกล้วยและ crayfish ซึ่งให้ผลผลิตไคตินถึง 40% และ 32% ตามลำดับ (Tolaimate *et al.*, 2000)

ตารางที่ 1 ผลผลิตไคตินที่ได้จากการสกัดจากหัวกุ้งกุลาดำ

ขั้นตอนการเตรียม	น้ำหนักเปียก (กิโลกรัม)	% ผลผลิตที่ได้
วัตถุดิบหัวกุ้ง	100	100[n]
เปลือกส่วนหัวกุ้งหลังจากเอาเครื่องในออกแล้ว	41.6±1.77	41.6[n]
เปลือกที่อบแห้งแล้ว	13.3±0.92	13.3[n]
เปลือกที่บดและร่อนแยกขนาดแล้ว	4.58±0.23	4.58[n]
ไคติน	0.91±0.04	0.91[n] 19.9[v]
ไคโตแซน	0.67±0.07	0.67[n] 14.6[v] 73.6[n]

[n] เปอร์เซนต์ผลผลิตคิดต่อน้ำหนักวัตถุดิบเริ่มต้น

[v] เปอร์เซนต์ผลผลิตคิดต่อน้ำหนักเปลือกกุ้งที่อบและบดแยกขนาดแล้ว

[n] เปอร์เซนต์ผลผลิตต่อน้ำหนักไคตินเริ่มต้นที่ใช้ในการเตรียมไคโตแซน

เมื่อนำไคตินที่ได้มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียมไคโตแซนที่สภาวะบรรยากาศที่ต่างกันคือ สภาวะบรรยากาศปกติ สภาวะสุญญากาศ และสภาวะที่มีไนโตรเจน และที่เวลาของการกำจัดหมู่อะซิทิลที่ต่างกันคือ 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปกติหรือสภาวะที่มีอากาศที่เวลา 1 และ 2 ชั่วโมงมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (Degree of Deacetylation, %DD) สูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะสุญญากาศ และไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะที่มีไนโตรเจน โดยที่ไคโตแซนที่ที่เตรียมในสภาวะสุญญากาศมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะที่มีไนโตรเจนซึ่งมีคุณสมบัติที่ยังคงเป็นไคตินมากกว่า เนื่องจากไม่สามารถละลายได้ดีในสารละลายกรดอะซิติก 1% ซึ่งผลการทดลองดูเหมือนขัดกับหลักการของการกำจัดหมู่อะซิทิลในโมเลกุลของสารซึ่งจะเกิดได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่ในการทดลองนี้การกำจัดหมู่อะซิทิลในสภาวะที่มีอากาศนั้นกระทำในระบบปิดที่จัดทำแบบง่ายๆโดยการใช้ขวดสามคอซึ่งมีปากขวด 3 ช่อง แล้วใช้จุกยางปิดทางเข้าของอากาศตรงทางเปิดด้านซ้ายของขวด จุกยางที่เสียบเทอโมมิเตอร์ปิดปากขวดช่องกลาง ในขณะที่ปลายเปิดที่เหลือด้านขวาถูกปิดด้วยจุกยางที่ต่อด้วยสายซิลิโคนแล้วให้ปลายของสายซิลิโคนนี้จุ่มในน้ำเย็น เมื่อความร้อนสูงขึ้นอากาศที่อยู่ภายในขวดถูกไล่ออกมาทางสายซิลิโคนซึ่งเป็นทางเปิดเพียงทางเดียว ในที่สุดอากาศในขวดก็ถูกแทนที่ด้วยไอน้ำ ซึ่งสังเกตจากอุณหภูมิภายในขวดขึ้นสูงเป็น 120°ซโดยประมาณ ซึ่งเป็นอุณหภูมิของไอน้ำอิ่มตัวและคงที่ที่ระดับนี้ตลอดการทดลอง แสดงว่าสภาวะภายในขวดไม่มีอากาศจึงทำให้การกำจัดหมู่อะซิทิลขึ้นในสภาวะการทดลองนี้เกิดขึ้นได้ดี ซึ่งผลการทดลองในตารางที่ 2 สนับสนุนข้อสังเกตนี้ โดยจะเห็นว่า ไคโตแซนที่ได้จากการเตรียมในสภาวะบรรยากาศที่เวลาครึ่งชั่วโมงมีระดับของการกำจัดหมู่อะซิที

ลเพียง 35.67% ซึ่งต่ำกว่าค่าของไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะสุญญากาศที่เวลาเดียวกันมาก (63.91%) ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าในช่วงแรกนั้นยังมีอากาศหลงเหลืออยู่ในขวดการกำจัดหมู่อะซิทิลจึงเกิดได้ไม่ดีนัก ในขณะที่การใช้สุญญากาศการกำจัดหมู่อะซิทิลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1 ชั่วโมง การทดลองในสภาวะบรรยากาศปกติกลับให้ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลที่สูงกว่าการทดลองในสภาวะสุญญากาศซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการเตรียมไคโตแซนโดยทั่วไป ซึ่งผลจากการทดลองครั้งนี้บ่งบอกว่าการเตรียมไคโตแซนไม่จำเป็นต้องอาศัยระบบสุญญากาศเพื่อดูดอากาศออกเสมอไป และการใช้ความร้อนไล่เอาอากาศออกแล้วป้องกันไม่ให้อากาศจากภายนอกเข้าไปก็เป็นการเพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาดึงหมู่อะซิติล จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายกับระบบทำสุญญากาศหากจะนำไปใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำในสภาวะบรรยากาศต่างๆ

สภาวะบรรยากาศ	เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)[1]	น้ำหนักโมเลกุลเทียบกับ pullulans (Mn)	ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล[1] (%DD)
สภาวะบรรยากาศปกติ	0.5	345±67.85[c]	63,173	35.67±0.44[c]
	1.0	1500±269.1[b]	34,756	74.80±1.03[a]
	2.0	2470±611.2[b]	56,579	74.19±0.53[a]
สภาวะสุญญากาศ	0.5	4200±513.1[a]	84,555	63.91±0.83[b]
	1.0	4950±1189[a]	114,050	65.41±0.62[b]
	2.0	5260±1490[a]	106,496	68.28±0.24[b]
สภาวะที่มีไนโตรเจน	0.5	ND	ND	ND
	1.0	ND	ND	ND
	2.0	ND	ND	ND

[1] เป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

[a-c] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันระบุความแตกต่างที่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

Mn = Number –averaged molecular weight

ND = ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้เนื่องจากไคโตแซนไม่ละลายในตัวทำละลายที่ใช้

น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนซึ่งเตรียมที่สภาวะบรรยากาศปกติมีค่าน้อยกว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนซึ่งเตรียมที่สภาวะสุญญากาศ (ตารางที่ 2) แต่การเตรียมที่สภาวะบรรยากาศปกติที่เวลา 0.5 ชม. ไคโตแซนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพียง 345 kDa ซึ่งค่าที่วัดได้นี้ไม่ใช่ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง สืบเนื่องจากไคโตแซนที่ได้มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลต่ำเพียง 35.67% คือยังเป็นไคตินจึงไม่สามารถละลายได้ดีส่งผลให้การวัดค่าความหนืดไม่สะท้อนค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง

2. การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ

เมื่อนำไคโตแซนที่เตรียมจากทั้ง 3 สภาวะที่เวลาต่างๆมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* และ ยีสต์ *Candida albicans* โดยระดับการยับยั้งจุลินทรีย์แสดงเป็นค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุด

ของไคโตแซนที่ใช้ทดสอบที่มีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารที่แสดงค่า MIC ต่ำกว่าแสดงว่ามีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าสารที่แสดงค่า MIC ที่สูงกว่า จากผลการทดสอบซึ่งแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ไคโตแซนซึ่งเตรียมที่สภาวะบรรยากาศปกติเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงมีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่ได้จากการเตรียมภายใต้สภาวะสุญญากาศและสภาวะที่มีไนโตรเจน โดยไคโตแซนซึ่งเตรียมที่สภาวะบรรยากาศปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด คือมีค่า MIC เป็น 625, 625, และ 313 ppm ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าไคโตแซนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศปกติเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าอีกทั้งยังมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลที่สูงกว่าไคโตแซนซึ่งเตรียมที่สภาวะอื่น จึงได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันว่าน้ำหนักโมเลกุล หรือระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์มากน้อยเพียงใดหรือปัจจัยใดไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ โดยการลดขนาดโมเลกุลไคโตแซนโดยปฏิกิริยาเคมี และวิธีทางชีวภาพ

ตารางที่ 3 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่เตรียมภายใต้สภาวะต่างๆ

สภาวะบรรยากาศ	เวลาในการกำจัดหมู่อะซิทิล(ชั่วโมง)	MIC (พีพีเอ็ม)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
สภาวะบรรยากาศปกติ	0.5	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$625^{C,a}$
	1.0	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{D,b}$
	2.0	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$	$313^{D,c}$
สภาวะสุญญากาศ	0.5	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{C,b}$
	1.0	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{C,b}$
	2.0	$625^{B,b}$	$625^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
สภาวะที่มีไนโตรเจน	0.5	$1250^{A,b}$	$1250^{A,b}$	$>1250^{A,a}$
	1.0	$1250^{A,b}$	$1250^{A,b}$	$>1250^{A,a}$
	2.0	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$1250^{B,a}$

$^{A-D}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-c}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

3. ศึกษาการใช้สารเคมีและเอนไซม์ในการลดขนาดของไคโตแซน และผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผ่านการย่อย

3.1. การใช้วิธีทางเคมี

การลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนโดยวิธีทางเคมีซึ่งใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยมีการเติม Fe(III) ซึ่งทำให้เกิด hydroxyl radical ที่ไปทำให้เกิดการตัดสายโมเลกุลโดย nucleophilic attack พบว่าไคโตแซนถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงอย่างเห็นผลชัดเจนเมื่อการย่อยดำเนินไป 18 ชั่วโมง โดยน้ำหนักโมเลกุลจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ใช้

ไคโตแซนที่ถูกย่อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0, 5, 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 3260, 157, 3.17 และ 0.24 kDa ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4 ผลิตภัณฑ์ไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโดยวิธีนี้มีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli*

ไม่แตกต่างไปจากไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย (native chitosan) ยกเว้นการยับยั้ง *E.coli* ของไคโตแซนไฮโดรไลเสทซึ่งย่อยด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 25 mM มีประสิทธิภาพลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของนักวิจัยหลายกลุ่มที่พบว่าไคโตแซนให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียดีกว่าไคโตแซนโอลิโกเมอร์ (Zheng and Zhu, 2003; No *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2001) และไคโตแซนยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

อย่างไรก็ตามไคโตแซนไฮโดรไลเสทสามารถยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อยซึ่งมีค่า MIC เป็น 313 พีพีเอ็ม คือมีค่า MIC ลดลงเป็น 156.3, 78.1 และ 78.1 พีพีเอ็ม เมื่อย่อยโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5, 10 และ 25 mM ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rhoades และ Roller (2000) ที่เตรียมไคโตแซนไฮโดรไลเสทจากไคโตแซนไฮโดรคลอไรด์ที่ขายทางการค้าโดยวิธีเดียวกันแล้วพบว่าไคโตแซนไฮโดรไลเสทมีกิจกรรมการยับยั้งยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย

ตารางที่ 4 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน และไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น

ความเข้มข้นไฮโดร-เปอร์ออกไซด์ (mM)	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)*	MIC (พีพีเอ็ม)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0	3260±735	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	313^{b}
5	157±65	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	156^{b}
10	3.17±0.2	$625^{B,a}$	$625^{A,a}$	$78.1^{C,b}$
25	0.24±0.06	$1250^{A,a}$	$625^{A,b}$	$78.1^{C,c}$

$^{A-C}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-c}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

* ค่าเฉลี่ย±SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2. การใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ (EC 3.2.1.17 from chicken egg white)

จากการใช้ไลโซไซม์ 29,050 ยูนิต/มลของสารละลายไคโตแซน ในการเตรียมไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่พีเอช 5.0 พบว่าเวลาในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า intrinsic viscosity ของไคโตแซนลดลงซึ่งสะท้อนถึงขนาดโมเลกุลของไคโตแซนที่เล็กลง (เนื่องจากในการใช้เอนไซม์ย่อยไคโตแซนนั้นมีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถละลายไคโตแซนในกรดอะซิติกแต่ต้องละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์เพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งไม่สามารถละลายไคโตแซนได้ในระดับที่มีความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุล จึงส่งผลให้ไม่สามารถวิเคราะห์และคำนวนขนาดโมเลกุลของไคโตแซนตามวิธีของ Chen and Hwa (1996) ที่ใช้วิเคราะห์และคำนวนขนาดโมเลกุลของไคโตแซนเริ่มต้นและไคโตแซนที่ผ่านการย่อยโดยวิธีทางเคมี ดังนั้นจึงวัดค่าความหนืดของสารละลายเพื่อบ่งชี้ให้แน่ใจว่ามีการย่อยขนาดไคโตแซนให้เล็กลง และค่าความหนืดที่แสดงนี้เป็นค่าที่วัดได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเฉพาะ และสารประกอบอื่นๆที่แตกต่างกันเพื่อทำให้การทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดเกิดขึ้นได้ดี ค่าความหนืดที่วัดได้นี้จึงไม่สามารถใช้เปรียบเทียบข้ามระหว่างการทดลองที่ใช้เอนไซม์ต่างชนิดกันได้) ซึ่งขนาดโมเลกุลที่เล็กลงมีผลในการยับยั้ง *E. coli* และ *C. albicans* ไม่แตกต่าง

ไปจากไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย แต่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อยเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน และไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยการใช้เอนไซม์ไลโซไซม์

เวลาที่ใช้ในการย่อย (นาที)	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (พีพีเอ็ม)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0	11.13±0.18	$625^{A,b}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
5	10.55±0.02	$625^{A,b}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
10	9.96±0.01	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
30	9.56±0.07	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
24 ชั่วโมง	9.06±0.03	$625^{A,c}$	$1250^{B,b}$	$>1250^{A,a}$
48 ชั่วโมง	5.82±0.05	$625^{A,c}$	$625^{C,b}$	$>1250^{A,a}$

$^{A-C}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-c}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

* ค่าเฉลี่ย±SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3. การใช้เอนไซม์ไคติเนส (EC 3.2.1.14 from *Streptomyces griseus*)

จากการใช้เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) 0.02 ยูนิต/มลของสารละลายไคโตแซน ในการเตรียมไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิที่ 45°ซ พบว่าเวลาในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า intrinsic viscosity ของไคโตแซนลดลงซึ่งสะท้อนถึงขนาดโมเลกุลของไคโตแซนที่เล็กลง อย่างไรก็ตามขนาดโมเลกุลที่เล็กลงมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดไม่แตกต่างไปจากไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย อีกทั้งมีแนวโน้มในการยับยั้งน้อยลงเมื่อไฮโดรไลเสทมีความหนืดลดลง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน และไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยการใช้เอนไซม์ไคติเนส

เวลาที่ใช้ในการย่อย (นาที)	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (พีพีเอ็ม)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0	2.70±0.07	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{C,b}$
5	2.60±0.10	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{C,b}$
10	2.38±0.05	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{C,b}$
30	1.83±0.45	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{C,b}$
24 ชั่วโมง	0.76±0.09	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$313^{C,b}$
48 ชั่วโมง	0.69±0.01	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$

$^{A-C}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-b}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

* ค่าเฉลี่ย±SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4. การใช้เอนไซม์ปาเปน

จากการใช้เอนไซม์ปาเปน (chitinase) 0.02 ยูนิต/มลของสารละลายไคโตแซน ในการเตรียมไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิที่ 45°ซ พบว่าเวลาในการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า intrinsic viscosity ของไคโตแซนลดลงซึ่งสะท้อนถึงขนาดโมเลกุลของไคโตแซนที่เล็กลง อย่างไรก็ตามขนาดโมเลกุลที่เล็กลงมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดไม่แตกต่างไปจากไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อย อีกทั้งมีแนวโน้มในการยับยั้งน้อยลงเมื่อไฮโดรไลเสทมีความหนืดลดลง โดยเฉพาะการยับยั้ง *E. coli* ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซน และไคโตแซนไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยการใช้เอนไซม์ปาเปน

เวลาที่ใช้ในการย่อย (นาที)	Intrinsic viscosity (η)*	MIC (พีพีเอ็ม)		
		E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0	1.96±0.59	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{A,b}$
5	1.79±0.08	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{A,b}$
10	1.50±0.12	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{A,b}$
30	1.43±0.11	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{A,b}$
24 ชั่วโมง	1.30±0.05	$1250^{A,a}$	$625^{B,b}$	$313^{A,c}$
48 ชั่วโมง	0.97±0.07	$1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$	$313^{A,b}$

^{A,B} ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

^{a,c} ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

* ค่าเฉลี่ย±SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

4. ผลของชนิดตัวทำละลายต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

เมื่อทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ละลายในตัวทำละลาย กรดอะซิติก, กรดฟอร์มิก, กรดแลกติก, dimethyl sulfoxide (DMSO) และ โพรพิลีนไกลคอล ที่ความเข้มข้น 1% พบว่า ไคโตแซนที่ละลายในกรดอะซิติก 1% สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดได้ดีกว่าไคโตแซนที่ละลายในกรดฟอร์มิกและกรดแลกติก โดยมีค่า MIC ในการยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *C. albicans* เป็น 625, 625 และ 313 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ในขณะที่ค่า MIC ของไคโตแซนที่ละลายในกรดฟอร์มิกและกรดแลกติกต่อแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

ส่วนไคโตแซนที่ละลายในตัวทำละลาย DMSO และ โพรพิลีนไกลคอล ไม่สามารถนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้เนื่องจาก ตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถละลายไคโตแซนได้ จากการละลายไคโตแซนในตัวทำละลายต่างๆ ผู้ทดลองพบว่าไคโตแซนสามารถละลายใน 1% กรดอะซิติก และ 1% กรดฟอร์มิกได้อย่างรวดเร็วในขณะที่การละลายใน 1% กรดแลกติกต้องใช้เวลานานกว่าการละลายจึงเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่ง Chung และคณะ (2003) ระบุไว้ว่าตัวทำละลายกรดอินทรีย์ที่มีจำนวนโมเลกุลของไฮโดรเจน (proton) สูงจะสามารถละลายไคโตแซนได้น้อยลง

ตารางที่ 8 ค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	พีเอชสุดท้าย		ระดับของการละลาย	MIC (พีพีเอ็ม)		
	MHB	PDB		*E. coli*	*S. aureus*	*C. albicans*
กรดอะซิติก	6.20	5.08	+++	$625^{B,a}$	$625^{B,a}$	$313^{B,b}$
กรดฟอร์มิก	5.26	4.07	+++	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$313^{B,b}$
กรดแลกติก	6.44	5.15	++	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$1250^{A,a}$
โพรพิลีนไกลคอล	ND	ND	-	ND	ND	ND
DMSO	ND	ND	-	ND	ND	ND

ND = Not determined, +++ = ละลายทันที, ++ = ละลายเมื่อคนเป็นเวลา 30 นาที, - = ไม่ละลาย

$^{A-B}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-b}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5. ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

5.1. ค่าพีเอชของอาหาร

เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย และยีสต์ของไคโตแซนที่ไม่ผ่านการย่อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ PDB ตามลำดับ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ พบว่า ไคโตแซนมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.5-6.0 คือมีค่า MIC เป็น 156 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 9) ส่วนที่พีเอชต่ำกว่า 4 และไม่มีการเติมไคโตแซน *S. aureus* และ *E. coli* ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากระดับพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียสองชนิดนี้เจริญได้คือ 4.3-4.7 (Banwart, 1983) กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์มีแนวโน้มลดลงเมื่อพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเป็นประจุบวกของไคโตแซนซึ่งมีค่า pKa เท่ากับ 6.3 (Helander *et al.*, 2004)

ตารางที่ 9 ผลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ

พีเอช	MIC (พีพีเอ็ม)		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
3.5	NG	NG	NG
4.0	NG	NG	$156^{B,a}$
4.5	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$
5.0	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$
5.5	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$
6.0	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$	$156^{B,a}$
6.5	$625^{A,a}$	$625^{A,a}$	$313^{A,b}$
7.0	$625^{A,a}$	$625^{A,a}$	$313^{A,b}$

NG = No Growth

$^{A-B}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

$^{a-b}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5.2. อุณหภูมิ

เมื่อนำไคโตแซนที่ถูกผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 72, 100 และ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาทีพบว่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผ่านความร้อนมาแล้วไม่แตกต่างจากไคโตแซนที่ยังไม่ผ่านความร้อน โดยมีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดเป็น 156 พีพีเอ็ม เช่นเดียวกับไคโตแซนที่ยังไม่ผ่านความร้อน ดังแสดงในตารางที่ 10 ผลการทดลองนี้บ่งบอกว่าความร้อนในระดับที่ใช้ในการแปรรูปอาหารไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ

ตารางที่ 10 ผลของการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิในระดับต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที ต่อค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *C. albicans* ของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ

อุณหภูมิ (°ซ)	MIC (พีพีเอ็ม)		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
No heat	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$
72	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$
100	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$
121	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$	$156^{A,a}$

^A ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

^a ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

5.3. เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำกับไคโตแซนที่ขายทางการค้า

เมื่อทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตได้ต่อเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* sp., *Lactobacillus* sp., *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. เปรียบเทียบกับไคโตแซนที่ขายทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70, 80 และ 90% พบว่า ไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 75% มีกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus*, *A. niger*, *Penicillium* sp. และ *C. albicans* เทียบเท่ากับไคโตแซนทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 80% คือมีค่า MIC ต่อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็น 156, 156, 78, 78 และ 156 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 อย่างไรก็ตามไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *P. fluorescens*, *B. cereus* และ *Lactobacillus* sp. ด้อยกว่าไคโตแซนทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลทั้งสามระดับ ผลการทดลองที่น่าสนใจคือไคโตแซนที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดที่ความเข้มข้น 1250 พีพีเอ็มไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้

เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของไคโตแซนทางการค้าพบว่ามีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าไคโตแซนที่เตรียมได้ประมาณ 5-8 เท่า แต่ไคโตแซนทางการค้าที่ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล 80 และ 90% มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีกว่าในภาพรวม โดยเฉพาะไคโตแซนทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล 70% นั้นมีขนาดโมเลกุล 274,237 ซึ่งใหญ่กว่าไคโตแซนที่เตรียมได้ 8 เท่า แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *P. fluorescens*, *B. cereus*, *Lactobacillus* sp., *A. niger* และ *Penicillium* sp. ยังสูงกว่าไคโตแซนที่เตรียมได้ ซึ่งผลการทดลองนี้ยืนยันว่าขนาดโมเลกุลที่เล็กลงไม่มีผลต่อการเพิ่ม

กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนในขณะที่ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลที่เพิ่มขึ้นมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้มากกว่า

ตารางที่ 11 กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำ และไคโตแซนที่ขายทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 70, 80 และ 90% DD ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์	MIC (พีพีเอ็ม)			
	Native chitosan (75% DD, Mn 34,756)	Com. Chitosan (70% DD, Mn 274,237)	Com. Chitosan (80% DD, Mn 118,983)	Com. Chitosan (90% DD, Mn 184,558)
Escherichia coli	$156^{B,b}$	$625^{C,a}$	$156^{D,b}$	$78^{D,c}$
Staphylococcus aureus	$156^{B,b}$	$1250^{B,a}$	$156^{D,b}$	$156^{C,b}$
Pseudomonas fluorescens	$>1250^{A,a}$	$625^{C,b}$	$313^{C,c}$	78^{Dd}
Bacillus cereus	$>1250^{A,a}$	$1250^{B,b}$	313^{Cc}	$78^{D,d}$
Salmonella sp.	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$	$>1250^{A,a}$
Lactobacillus sp.	$>1250^{A,a}$	$625^{C,b}$	$625^{B,b}$	$625^{B,b}$
Aspergillus niger	$78^{C,a}$	$39^{E,b}$	$78^{E,a}$	$78^{D,a}$
Penicillium sp.	$78^{C,a}$	$39^{E,b}$	$78^{E,a}$	$39^{E,b}$
Candida albicans	$156^{B,b}$	$313^{D,a}$	$156^{D,b}$	$156^{C,b}$

$^{A-B}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในคอลัมน์เดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

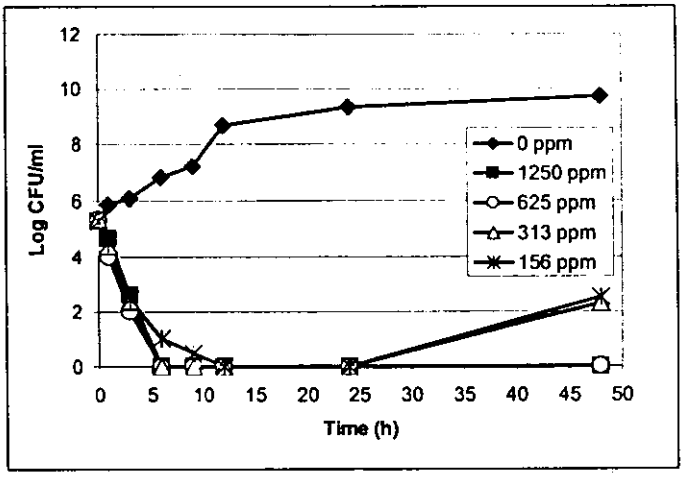
$^{a-d}$ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวยกที่มีอักษรต่างๆในแถวเดียวกัน ระบุความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Mn = Number –averaged molecular weight

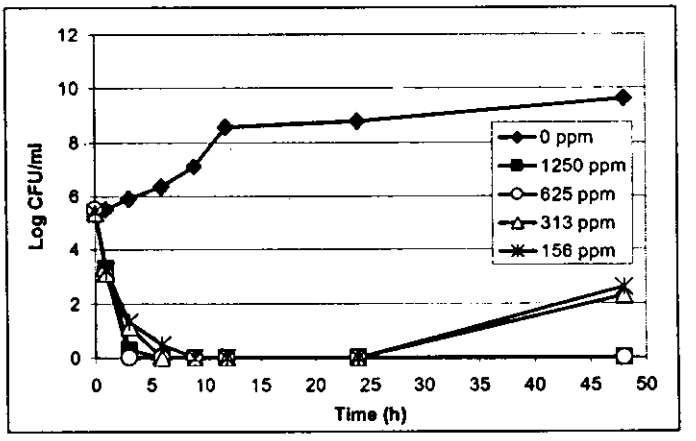
6. การรอดชีวิตของจุลินทรีย์เมื่อมีการเติมไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ

เมื่อศึกษาการรอดชีวิตของ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไคโตแซนโดยการใช้ไคโตแซนที่ความเข้มข้น 0, 156, 313, 625 และ 1250 พีพีเอ็มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (สำหรับ *E. coli* และ *S. aureus*) และ PDB (สำหรับ *C. albicans*) ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/ml แล้วตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดโดยวิธีการ standard plate count ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 และ 72 ชม. พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามชนิด ถูกยับยั้งโดยไคโตแซนที่ทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ โดยไคโตแซนสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ลงได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 6 - 12 ชั่วโมง ขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของไคโตแซน โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ 156 พีพีเอ็ม สามารถลดจำนวน *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans* ได้หมดภายใน 12, 9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นสูงสุด 1250 พีพีเอ็ม สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดได้หมดที่เวลา 6 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 1 อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 625 พีพีเอ็ม พบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมง แบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถกลับมาเจริญได้อีก ในขณะที่การใช้ในระดับความเข้มข้น 1250 พีพีเอ็มไม่พบการเจริญกลับมาของแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่ 48 ชั่วโมง แต่พบการเจริญกลับมาที่ชั่วโมงที่ 72 ผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียสามารถต้านทานการยับยั้งของไคโตแซนได้ดีกว่ายีสต์ เนื่องจากพบการเจริญของแบคทีเรียทั้งสอง

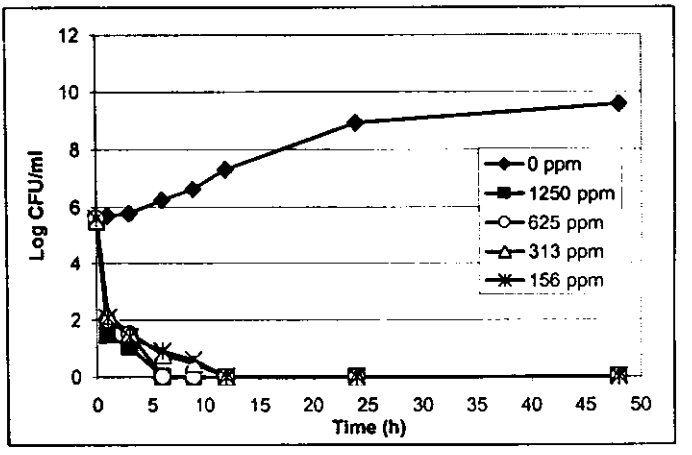
ชนิดที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงที่ทุกระดับความเข้มข้นของไคโตแซนที่ใช้ แต่ไม่พบการเจริญของยีสต์เลย ตลอด 72 ชั่วโมงของการติดตามการเจริญเมื่อใช้ไคโตแซนที่ความเข้มข้นทุกระดับแสดงว่ายีสต์ถูกยับยั้งได้



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 1 จำนวนเซลล์ที่เหลือรอดของ ก) *E. coli*, ข) *S. aureus* และ ค) *C. albicans* เมื่อสัมผัสกับไคโตแซนความเข้มข้นต่างๆ

อย่างสมบูรณ์ผลการทดลองนี้ชี้นำว่ากลไกการยับยั้งยีสต์อาจแตกต่างจากการยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นศักยภาพของแบคทีเรียในการปรับตัวให้ต้านทานต่อสารไคโตแซนได้ดี

7. ผลของไคโตแซนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผนังเซลล์ *E. coli*

ผลการศึกษาภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิทชั่น (Transmission Electron Microscopy, TEM) ของเชื้อ *E. coli* ทั้งก่อนและหลังจากการเติมไคโตแซนพบว่า *E. coli* ที่ไม่สัมผัสกับไคโตแซนมีรูปร่างเซลล์แต่ละเซลล์ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2ก) ซึ่งมีลักษณะเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์ *E. coli* ที่สัมผัสกับไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำอย่างชัดเจนโดยเฉพาะส่วนของผนังเซลล์ชั้น outer membrane ที่ถูกทำลาย เซลล์บางเซลล์แตกและมีส่วนของ cytoplasm รั่วไหลกระจายออกมาจากเซลล์ (ภาพที่ 2ข) บางเซลล์มีเยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะผิดปรกติ โดยบางเซลล์มีเยื่อหุ้มเซลล์หนาผิดปรกติ ดังแสดงในภาพที่ 2ข และ 2ค

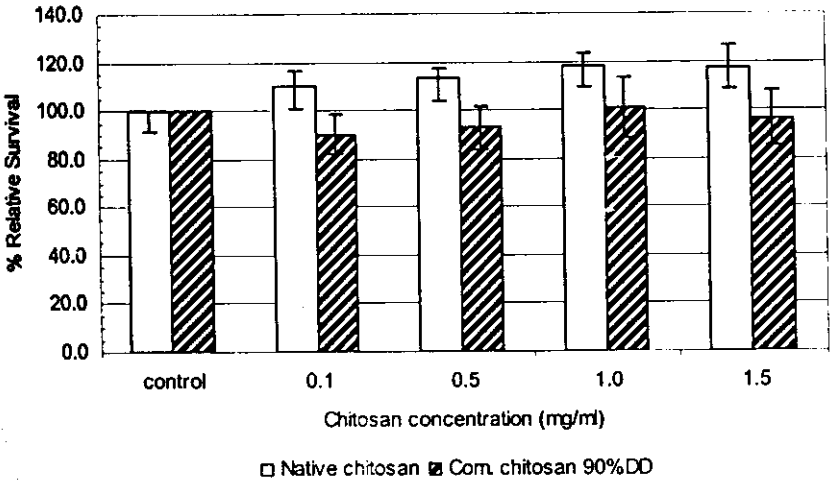
8. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic Assay) ของไคโตแซน

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 74.8 และของสารไคโตแซนทางการค้าที่ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 90 พบว่าไคโตแซนทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.1-1.5 มก/มล (100, 500, 1000 และ 1500 พีพีเอ็ม) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มนุษย์ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell line ดังแสดงในภาพที่ 3

(ก)

(ข)

ภาพที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์ *E. coli* ในอาหารที่มี ก) กรดอะซิติก0.05%, ข) ไคโตแซน 650 พีพีเอ็ม



ภาพที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell lineเมื่อใช้สารละลายไคโตแซนจากกุ้งกุลาดำและไคโตแซนทางการค้าที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล 90% ที่ความเข้มข้น 0.1-1.5 มก/มล.