หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2546

1. **ชื่อโครงการ** การพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่เตรียมจากหัวกุ้งกุลาดำ (Improvement and development of antimicrobial property of chitosan prepared from black tiger shrimp head)

2. **ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail**

ดร. ทิพรัตน์ หงภัทรศิริ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม **คณะอุตสาหกรรมเกษตร**
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ **จ. สงขลา 90112**
โทรศัพท์(074) 446-727, 286-361, 286-371
โทรสาร (074) 212-889
E-mail tipparat.h@psu.ac.th

3. **สาขาวิชาที่ทำการวิจัย** เทคโนโลยีชีวภาพ

4. **งบประมาณรวมทั้งโครงการ** 191,000 บาท

5. **ระยะเวลาดำเนินงาน** 1.5 ปี

6. **รายละเอียดการวิจัย**

6.1. หลักการและเหตุผล (ความสำคัญและที่มาของหัวข้อการวิจัย)

ไคโตแซนเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ถูกกำจัดหมู่อะซิติลซึ่งจับอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เกิดเป็นหมู่อะมิโนอิสระ ไคตินจัดเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีอยู่มากเป็นอันดับสองในโลกรองจากเซลลูโลส พบเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้ง, ปู, กั้ง, แมลง ฯลฯ และเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของพวกฟังไจ (fungi)

อุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารทะเลโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำได้มีการขยายตัวเป็นอย่างสูง โดยเฉพาะในพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ทำรายได้ให้กับประเทศไทยนับพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Rengpipat *et al.*, 2000) เมื่อการผลิตสูงขึ้น ของเสีย และวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปจัดเป็นปัญหาสำคัญและเป็นภาระหนักกับผู้ผลิตในการบำบัด และกำจัด ให้ออกไปจากระบบเพื่อไม่ให้เป็นปัญหาและก่อมลพิษกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งภาระอันนี้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากวัสดุเศษเหลือเหล่านี้เน่าเสียง่าย ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นรุนแรง และที่สำคัญคือมีปริมาณมาก ซึ่งจากการศึกษาของ Gildberg และ Stenberg (2001) พบว่า ของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งมีสูงถึงร้อยละ 75 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และจัดเป็นของเสียที่เป็นของแข็งถึง 40% ดังนั้นการนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมกุ้งกุลาดำมาสกัดแยกไคติน

เพื่อที่จะนำมาใช้ในการผลิตไคโตแซนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการลดภาระ ค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสีย อีกทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียนั้นด้วย

ไคโตแซนจัดเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีประจุเป็นบวก และมีน้ำหนักโมเลกุลขนาดต่างๆกัน ตั้งแต่ 1-3x10^5 Da. จึงมีคุณสมบัติเฉพาะในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมหลายชนิด รวมถึงด้านชีวการแพทย์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำไคโตแซนมาเคลือบผลไม้ ผลิตเป็น degradable membrane หรือแม้กระทั่งนำมาใช้ในการจับโลหะหนักในน้ำที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรม หรือน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว ฯลฯ คุณลักษณะของไคโตแซนขึ้นอยู่กับระดับของหมู่อะซิติลที่ถูกกำจัดออกจากโมเลกุลของไคติน (degree of *N*-acetylation, DA) ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อคุณลักษณะทางเคมี กายภาพ การถูกย่อยสลายได้ และกิจกรรมในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตแซน นอกจากนี้ไคโตแซนยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกด้วย โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้ง ยีสต์ รา และแบคทีเรีย (Rhoades and Roller, 2000; Shahidi *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 1994; Ouattara *et al.*, 2000; Roller and Covill, 1999; Tsai and Huey, 1999) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ไคโตแซนที่มีโครงสร้างทางเคมีต่างๆกัน เช่น ขนาดน้ำหนักโมเลกุล, ความหนืด, ระดับของหมู่อะซิติลที่ถูกกำจัด ฯลฯ ซึ่งส่งผลถึงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของไคโตแซน

ในปัจจุบันกระแสความนิยมของผู้บริโภคได้มุ่งไปในทิศทางเข้าหาธรรมชาติมากขึ้น วัฒนธรรมการบริโภคก็เปลี่ยนแปลงไปนิยมอาหารที่ไม่มีการปะปนหรือเสริมแต่งด้วยสารเคมี สารกันบูดซึ่งมีผลตกค้างและส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นไคโตแซนซึ่งจัดเป็นสารชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ อีกทั้งยังมีอยู่ปริมาณมากในธรรมชาติ จึงจัดเป็นสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ในการถนอมรักษาอาหาร เพื่อยืดอายุการเก็บ ในการทดแทนสารกันบูดเคมีที่ใช้กันในอุตสาหกรรมอาหาร การพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการผลิตไคโตแซนเพื่อให้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการทำให้อาหารเสีย และจุลินทรีย์ก่อโรคที่มากับอาหารจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งนอกเหนือจากเป็นการพัฒนาสารธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารเคมีแล้ว ยังเป็นการนำของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำที่มีอยู่มากทางตอนใต้ของประเทศไทยมาใช้ประโยชน์ อีกทั้งช่วยลดปัญหาและต้นทุนในการกำจัดและบำบัดของเสียอีกด้วย

6.2. โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไคโตแซนให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งเชื้อราและยีสต์ (Yalpani *et al.*, 1992) ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งไคโตแซนขึ้นกับ น้ำหนักโมเลกุล ความหนืด ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ตัวทำละลายที่ใช้ และความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคโตแซนอีกด้วย

No และคณะ (2002) พบว่าไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1671, 1106, 746, 470, 224 และ 28 kDa สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าโอลิโกเมอร์ไคโตแซนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 22, 10, 7, 4, 2 และ 1 kDa โดยไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 746 kDa มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* และ *P. fluorescence* ได้ดีที่สุด ส่วน *Salmonella typhimurium* และ *Vibrio parahaemolyticus* สามารถถูกยับยั้งได้ดีโดยไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 470 kDa อย่างไรก็ตามโอลิโกเมอร์ไคโตแซนยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเมื่อมีน้ำหนัก

โมเลกุลลดลง ในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Joen และ คณะ (2001) ที่พบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ของไอลิโกเมอร์ไคโตแซนมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลงจาก 10 ถึง 1 kDa รวมถึงการศึกษาของ Cho และคณะ (1998 อ้างโดย No *et al.*, 2002) ซึ่งพบว่า ไคโตแซนสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Bacillus* sp. ได้ดีขึ้น เมื่อความหนืดลดลงจาก 1000 ถึง 10 เซนติพอยด์ ซึ่งสัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ลดลง

Matsuhashi และ Kume (1997) ได้ปรับปรุงคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่มีขายทางการค้าโดยการฉายรังสี พบว่าการฉายรังสีที่ 100 kGy ส่งผลให้โมเลกุลของไคโตแซนถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง แล้วทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *E. coli* ดีขึ้น

Rhoades และ Roller (2000) ศึกษาผลของการย่อยสลายไคโตแซน โดยการใช้เอนไซม์ lysozyme, เอนไซม์จากยางมะละกอ และวิธีทางเคมี ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า การย่อยสลายโดยเอนไซม์ lysozyme สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ได้ แต่ถ้าการย่อยสลายเกิดขึ้นรุนแรงอย่างการใช้วิธีทางเคมี จนความหนืดของไคโตแซนลดลงต่ำกว่า 11 S ไคโตแซนจะเสียคุณสมบัติในการยับยั้งยีสต์

Shigemesa (1996 อ้างโดย Tsigos *et al.*, 2000) พบว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Simpson และ คณะ (1997 อ้างโดย Shahidi *et al.*, 1999) ซึ่งพบว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 92.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่าไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 85

นอกจากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไคโตแซนที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ตัวทำละลายที่ใช้ และสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เข้ามามีส่วนร่วมด้วย ซึ่ง No และคณะ (2002) ได้ใช้ตัวทำละลายต่างๆพวกกรดอะซีติก, กรดฟอร์มิก, กรดแลกติก, กรดไพรพิโอนิก และกรดแอสคอร์บิก มาละลายไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของไคโตแซนแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย โดยที่กรดอะซีติกร้อยละ 1 ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงสุด ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ยกเว้นแบคทีเรียแลกติก ซึ่งมักถูกยับยั้งด้วยไคโตแซนที่ละลายในกรดแลกติก และกรดฟอร์มิก ได้ดีกว่าไคโตแซนที่ละลายในกรดอะซีติก นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งเกิดขึ้นดีที่สุดในสภาวะที่มีพีเอช 4.5

Wang (1992) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งของไคโตแซนต่อเชื้อก่อโรคในอาหาร 5 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus, E. coli, Yersinia enterocolitica, S. typhimurium, L. monocytogenes* พบว่าการยับยั้งเกิดขึ้นในอาหารที่พีเอช 5.0 ให้ผลดีกว่าที่พีเอช 6.0

Roller และ Covill (1999) รายงานว่า ที่พีเอชสูงกว่า 5.5 ไคโตแซนละลายได้น้อยลง และเชื้อรา *Mucor racemosus* ถูกยับยั้งที่พีเอช 4.5 ได้ดีกว่าที่พีเอช 5.2

6.3. วัตถุประสงค์

6.3.1. พัฒนากระบวนการผลิตไคโตแซนจากกุ้งกุลาดำที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี

6.3.2. ศึกษาความสัมพันธ์ของน้ำหนักโมเลกุล, ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ของไคโตแซนต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์

6.3.3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ได้

6.3.4. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ ของไคโตแซนที่ได้ต่อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอาหารชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับไคโตแซนที่มีขายทางการค้า

6.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.4.1. ได้วิธีการผลิตไคโตแซนที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอาหาร

6.4.2. ได้สารธรรมชาติที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมีและสารกันบูด เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหาร

6.4.3. ได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไคโตแซนไปใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

6.4.4. ลดปัญหาของเสีย การกำจัดวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้งกุลาดำ

6.4.5. ผลิตนักศึกษาบัณฑิตศึกษา 1 คน