สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาการยับยั้งของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์ไคตินและผงไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1

The study of chitoligomers inhibition by the degradation of colloidal chitin and chitin powder by bacterial isolate No. 6.1

T117274

นายธเนศ พรสมบูรณ์ศิริ
นางสาวรุ้งทิพย์ วนเวียน
นางสาวอัจฉราพร สุทธจ้อย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 117274
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 12839013
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังขอสงวนสิทธิ์ในการดำเนินคดีตามกฎหมายทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The study of chitoligomers inhibition by the degradation of colloidal chitin and chitin powder by bacterial isolate No. 6.1

THANES PORNSOMBOONSIRI

RUNGTHIP WONWIAN

ARCHARAPORN SUTTAJOY

A SPECIAL SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ศึกษาการยับยั้งของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์ดอลไคติน และผงไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1

The study of chitoligomers inhibition by the degradation of colloidal chitin and chitin powder by bacterial isolate No. 6.1

ชื่อนักศึกษา	นายธเนศ	พรสมบูรณ์ศิริ	50050722
	นางสาวรุ้งทิพย์	วนเวียน	50050757
	นางสาวอัจฉราพร	สุทธจ้อย	50050786

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง	ศึกษาการยับยั้งของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์ดอลไคตินและผงไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1
นักศึกษา	นายธเนศ พรสมบูรณ์ศิริ
	นางสาวรุ้งทิพย์ วนเวียน
	นางสาวอัจฉราพร สุทธจ้อย
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่พบมากในเปลือกกุ้ง ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งที่สามารถนำมาทำให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น โดยทดลองใช้ในรูปของไคตินคอลลอยด์ และไคตินผงซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลว chitin medium ซึ่งมีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบการเจริญของเชื้อและการย่อยสลายไคตินคอลลอยด์ไปเป็นเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.48 มิลลิโมลาร์ และไคโตเพนโตส 0.13 มิลลิโมลาร์ ขณะที่การเจริญและการย่อยสลายไคตินผงไปเป็นเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.20 มิลลิโมลาร์ ไคโตเพนโตส 0.24 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มาทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าทั้งสารละลายที่ใช้ไคตินคอลลอยด์ และไคตินผงเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถยับยั้ง *Escherichia coli ATCC 25922*, *Staphylococcus aureus ATCC 259d3*, *Salmonella typhirecenium DMST 0562*, *Serratia sp.*, *Candida utilis TISTR 5001*, *Candida albicans* โดยสามารถยับยั้ง *Escherichia coli ATCC 25922* ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title	The study of chitoligomers inhibition by the degradation of colloidal chitin and chitin powder by bacterial isolate No. 6.1
Name	Mr. Thanes Pornsomboonsiri
	Miss Rungthip Wonwian
	Miss Archaraporn Suttajoy
Deparment	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic year	2010
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. SomchaiKrairak

Abstract

Chitin is one of the polymer compounds found in shrimp shell, which could be changed to be the value-added product. The chitin was used in the form of colloidal chitin and chitin power as C-source for bacterial isolate No. 6.1 cultivation in chitin medium. The chitin medium contained 0.5% peptone as N-source. The cultivation was carried on 200 rpm of rotary shaker at 30 C. The results showed that the colloidal chitin was utilized and digested to 2.48 mM of N-acetyl glucosamine and 0.13 mM of chitopentose. In case of the cultivation in chitin powder as C-source, the accumulation of 2.20 mM N-acetyl glucosamine and 0.24 mM chitopentose were found. The antibacterial activity of these spent cultures was testified by disc-diffusion method. The spent culture was sterilized by 0.22 μ of membrane filter. It was found that the tested microorganism such as *Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 259d3, Salmonella typhirecenium DMST 0562, Serratia sp., Candida utilis TISTR. 5001, Candida albicans* were inhibited by these spent culture. The antibacterial effect was the highest in *Escherichia coli ATCC 25922*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี หากไม่ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์ผู้คุมโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นในด้านต่างๆที่เป็นประโยชน์ และมีค่ายิ่ง ตลอดจนช่วยแก้ไขโครงงานพิเศษให้เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งเป็นคณะกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา และชี้แนะในการแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานในด้านต่างๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือในด้านต่างๆและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

และที่สำคัญ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ และเข้าใจคณะผู้วิจัยมาโดยตลอด

สำหรับคุณค่า ความรู้ และประโยชน์ที่เกิดจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้กับคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ครูอาจารย์ที่เคารพรักทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่คณะผู้วิจัย ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

นายธเนศ พรสมบูรณ์ศิริ

นางสาวรุ้งทิพย์ วนเวียน

นางสาวอัจฉราพร สุทธจ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 โครงสร้างของไคติน- ไคโตซาน	3
2.2 แหล่งของไคติน- ไคโตซาน	7
2.3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคติน– ไคโตซาน	8
2.4 ขั้นตอนการผลิตไคติน – ไคโตซาน	11
2.5 กระบวนการผลิตไคติน-ไคโตซาน	14
2.6 เอมไซม์ย่อยสลายไคติน-ไคโตซาน	15
2.7 ไคโตโอลิโกเมอร์ (Chitooligomer)	16
2.8 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา	17
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	28
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	32
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์	32
4.2 ผลการศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1	33
4.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของไคโตโอลิโกเมอร์	34
4.4 ผลการศึกษาการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน	42
4.5 ผลการศึกษาการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารผงไคติน	43
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	45
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แหล่งวัตถุดิบที่สำคัญของไคติน	7
2.2 ปริมาณไคตินที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	8
2.3 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและเซลลูโลส	4
2.2 การจัดเรียงตัวภายในสายพอลิเมอร์ไคติน	5
2.3 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	6
2.4 แบบจำลองแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุล ของสายโซ่ไคโตซาน	6
2.5 การผลิตไคติน –ไคโตซานจากกระดองปู	13
2.6 แสดงลักษณะโครงสร้างของไคโตโอลิโกเมอร์ (ก) เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน (ข) ไคโตไบโอส (ค) ไคโตไตรโอส (ง)ไคโตเตโตรส (จ) ไคโตเพนโตส และ (ฉ) ไคโตเฮกโซส	16
2.7 แสดงลักษณะโคโลนีรูปร่างท่อนแกรมลบของเชื้อ *Escherichia coli*	17
2.8 เชื้อ *E. coli* 124: B17 บนอาหาร Sorbitol Mac-conkey agar แสดงลักษณะโคโลนีกลม สีชมพู ขอบเรียบ ผิวหน้าเยิ้มเล็กน้อย	19
2.9 เชื้อ *E. coli* O157: H7 บนอาหาร Sorbitol Mac-conkey agar แสดงโคโลนีกลม สีครีม ขอบเรียบ ผิวหน้าเยิ้มเล็กน้อย	20
2.10 แสดงลักษณะรูปร่างมีการจัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่นของ *Staphylococcus aureus*	21
2.11 แสดงลักษณะรูปร่างท่อน เคลื่อนที่โดยใช้แฟกเจลลาของเชื้อ *Salmonella*	22
2.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Serratia sp.*	23
2.13 แสดงลักษณะรูปร่างกลมหรือของเชื้อ *Candida albicans*	24
4.1 แสดงการย้อมสีแกรมและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า	32
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารแข็งไคตินมีเดียม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	33
4.3 แสดงการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหาร (□,△)คอลลอยด์ ดอลไคติน และ (■,▲)ผงไคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.4 แสดงผลการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารละลาย
ไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกัน
ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 34

4.5 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*
ATCC 25922 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ
แบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (ก) และผงไคติน (ข)
ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5) 35

4.6 แสดงผลการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 ของสารละลาย
ไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกัน
ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 35

4.7 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*
ATCC 259d3 ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
รหัส 6.1 ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 6)
และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 7) 36

4.8 แสดงผลการยับยั้ง *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 ของสารละลาย
ไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกัน
ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 37

4.9 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhirecenium*
DMST 0562 ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
รหัส 6.1ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน (ก) และผงไคติน (ข)
มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5) 38

4.10 แสดงผลการยับยั้ง *Serratia sp.*ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์
ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1ที่เวลาต่างๆกันใน
อาหารคอลลอย์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.11 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Serratia sp.*
ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1
ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5)
และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 7) 39

4.12 แสดงผลการยับยั้ง *Candida utilis* TISTR 5001 ของสารละลาย
ไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกัน
ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 40

4.13 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida utilis*
TISTR 5001 ของไคโตโอลิโกเมอร์ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก)
มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5) และอาหารผงไคติน (ข)
มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 3) 41

4.14 แสดงผลการยับยั้ง *Candida albicans* ของสารละลาย
ไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกัน
ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□)
จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร) 41

4.15 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*
ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1
ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 2, 5)
และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 3, 5) 42

4.16 แสดงการสะสมผลิตภัณฑ์ (■) เอนอะซิทิลกลูโคซามีน (□)
ไคโตไบโอส (●) ไคโตไตรโอส (○) ไคโตเตโตรส (▲)
ไคโตเพนโตส และ (△) ไคโตเฮกโซส) ที่ได้จากการเจริญของเชื้อ
แบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลวที่มีคอลลอยด์ดอลไคติน
เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.17 แสดงการสะสมผลิตภัณฑ์ (■) เอนอะซิทิลกลูโคซามีน (□) ไคโตไบโอส (●) ไคโตไตรโอส (○) ไคโตเตโตรส (▲) ไคโตเพนโตส และ (△) ไคโตเฮกโซส) ที่ได้จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลวที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 44

ข.1 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.113 นาที) ไคโตไบโอส (6.162 นาที) ไคโตไตรโอส (7.607 นาที) ไคโตเตโตรส (9.675 นาที) ไคโตเพนโตส (12.461 นาที) ไคโตเฮกโซส (16.225 นาที) 54

ข.2 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.083นาที) ไคโตเพนโตส (12.568 นาที) ในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน 54

ข.3 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.109 นาที) ในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน 55

ข.4 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.109 นาที) ในอาหารผงไคติน 55

ข.5 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของไคโตเพนโตส (12.460 นาที) ในอาหารผงไคติน 56

ข.6 แสดงกราฟมาตรฐานของเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคตินโอลิโกเมอร์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่โดยวิธี HPLC 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งมากติดอันดับ 1 ใน 4 ของโลก นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมอาหารทะเลประเภทปูและปลาหมึก ซึ่งจากการแปรรูปวัตถุดิบเหล่านี้ ส่งผลให้ปริมาณเหลือทิ้งจำพวกเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนปลาหมึกมีจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำมาแปรรูปเป็นวัสดุที่มีประโยชน์ และเพิ่มมูลค่า นอกจากนี้ยังเป็นการลดมลพิษจากของเหลือทิ้งเหล่านี้ โดยเฉพาะการแปรรูปเป็นไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพที่ธรรมชาติสร้างสรรค์ขึ้นมาเพื่อเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างต่างๆของสิ่งมีชีวิตมากมายหลายชนิด และเป็นพอลิเมอร์ที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส แต่ละปีพบปริมาณไคตินในแหล่งธรรมชาติมากกว่า 1,000 ล้านตันในจำนวนนี้พบว่าอยู่ในรูปของเปลือกกุ้งและปู ประมาณ 40,000 ตัน ไคติน-ไคโตซานจัดเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของโลกทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เกษตร ปศุสัตว์ เภสัชกรรม การแพทย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการสลายตัวทางชีวภาพ (biodegradable) จึงถือได้ว่าเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันการผลิตไคตินอาศัยกระบวนการย่อยสลายทางเคมีภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชสูง อีกทั้งไม่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย และได้ขนาดโมเลกุลพอลิเมอร์ที่มีความยาวต่างกัน ต่อมาจึงได้มีการปรับปรุงการผลิตโดยเปลี่ยนมาใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีขึ้น คงตัว และมีความสม่ำเสมอในการผลิตผลิตภัณฑ์

ไคติน-ไคโตซานมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหมือนกัน แต่เนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำที่ต่างกัน ทำให้การนำไปประยุกต์ใช้ต่างกัน ดังนั้นไคโตซานจึงนิยมนำไปใช้ประโยชน์มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการแปรรูปเปลือกกุ้งและปูไปเป็นไคโตซานมีขั้นตอนที่ซับซ้อนกว่าการผลิตไคติน ส่งผลให้กระบวนการผลิตไคตินมีขั้นตอนง่ายกว่า และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าด้วยเช่นกัน

จากเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกนำไคตินมาผลิตไคโตโอลิโกเมอร์ และนำไคโตโอลิโกเมอร์มาศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาโดยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ทั้งนี้เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การนำไปเคลือบบนผิวผลไม้หรือผักเพื่อชะลอการเน่าเสีย เป็นต้น ทางการแพทย์ เช่น การนำไปขึ้นรูปฟิล์มเพื่อเป็นผ้าปิดแผล เป็นต้น และทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อผลิตไคโตโอลิโกเมอร์ที่ย่อยสลายได้จากคอลลอย์ดอลไคตินและผงไคติน

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีววิทยาของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ย่อยสลายได้จากคอลลอย์ดอลไคตินและผงไคติน

1.2.3 วิเคราะห์ปริมาณไคโตโอลิโกเมอร์ที่ย่อยสลายได้จากคอลลอย์ดอลไคตินและผงไคติน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการศึกษาการละลายไคตินให้เป็นไคโตโอลิโกเมอร์ด้วยกระบวนการทางเคมีโดยใช้กรด-ด่าง และกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ย่อยสลาย แล้วจึงนำน้ำหมักที่ได้มากรองเพื่อแยกจุลินทรีย์ออกได้ไคโตโอลิโกเมอร์ จากนั้นนำไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาโดยการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค วิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC และประสิทธิภาพต่อการประยุกต์ใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากคอลลอย์ดอลไคตินและผงไคตินที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้

1.4.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะและเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งจำพวกเปลือกกุ้ง

1.4.3 เป็นการวิจัยเบื้องต้นซึ่งจะนำไปสู่การผลิตในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของไคติน - ไคโตซาน

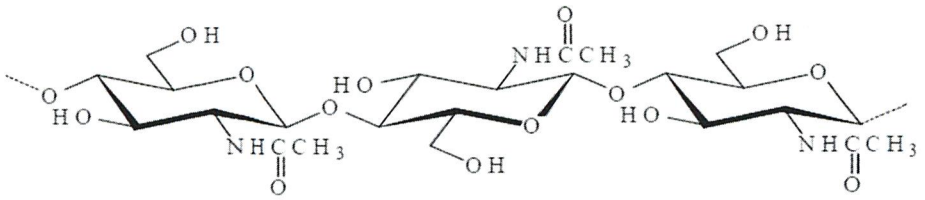
ไคติน - ไคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ชีวภาพ พบในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์จำพวกครัสตาเซียน แมลง ผนังเซลล์เชื้อรา แบคทีเรีย และแพลงก์ตอน (Muzzarelli, 1977) ในธรรมชาติพบในรูปสารประสม (Composite material) ร่วมกับสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน และสารอนินทรีย์ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส (สุวบุญ จิรชาญชัย, 2544)

2.1.1 ไคติน (Chitin)

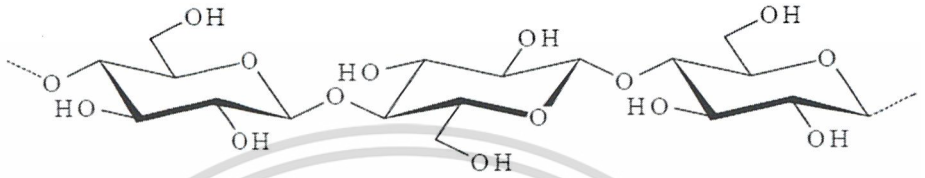
ไคตินค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ชาวฝรั่งเศส โดยนำเห็ด *Agaricus volvaccus*และเห็ดชนิดอื่นๆมาละลายในสารละลายด่าง จากนั้นแยกไคตินซึ่งเป็นสารที่สกัดได้นำมาทำให้แห้งเรียกสารนี้ว่า “fungine” 12 ปีต่อมา Odier พบว่าโครงสร้างภายนอกของแมลงมีสารชนิดเดียวกันกับที่พบในโครงสร้างของเห็ดจึงเรียกสารที่พบเป็นภาษากรีกว่า “Chiton” และเป็นคนแรกที่ค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างภายนอกของแมลงกับเนื้อเยื่อพืช (Knorr, 1984) ซึ่งไคตินในธรรมชาติเป็นของแข็งที่ไม่สามารถละลายน้ำ กรดอินทรีย์เจือจาง ด่างเจือจาง แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติไคตินสามารถละลายได้ในกรดอนินทรีย์เข้มข้น เช่น กรดเกลือ กรดกำมะถัน กรดฟอสฟอริก และกรดฟอร์มิก (Muzzarelli, 1977)

ไคติน เป็นสารพอลิเมอร์ธรรมชาติจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่โมเลกุลยาวโดยไม่มีการแตกแขนง (Unbranched polysaccharide) สูตรโครงสร้างของไคติน คือ poly-β-(1,4)-2-acetamino-2-Deoxy-Glucose หรือ Poly (N-Acetylglucosamine) ซึ่งแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) และมีสูตรทั่วไปคือ $(C_8H_{13}NO_5)n$ ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ47.29 ไฮโดรเจนร้อยละ6.45 ไนโตรเจนร้อยละ6.89 และออกซิเจนร้อยละ39.37 จากสูตรโครงสร้างของไคตินพบว่าไคตินเป็นสารชีวโมเลกุลสายยาวที่ไม่มีประจุ (Non-electrolytic polymer) บางครั้งอาจจะจัดเป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส แต่แตกต่างกับเซลลูโลสคือ หน่วยย่อยของเซลลูโลสเป็น D-glucose ส่วนหน่วยย่อยของไคตินเป็นอนุพันธ์ของกลูโคสคือ N-acetylglucosamine โดยที่หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่สองของเซลลูโลสจะถูกแทนที่ด้วย Acetylated amino (-NH-$COCH_3$) (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2543) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) ไคติน และ (ข) เซลลูโลส

ที่มา : http://www.fibersource.com/f-tutor/chitin.htm (24 พฤศจิกายน 2553)

http://www.fibersource.com/f-tutor/cellulose.htm (24 พฤศจิกายน 2553)

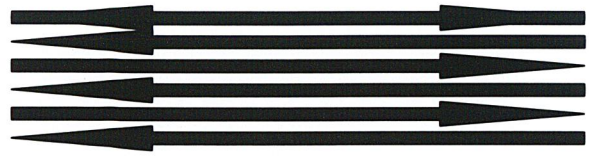
สารไคตินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ สายโซ่ของไคตินจะมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบ ซึ่งจะมีความแข็งแรงแตกต่างกัน ลักษณะโครงสร้างของไคตินในธรรมชาติสามารถจำแนกเป็น 3 ประเภท คือ (ดังแสดงในรูป 2.2)

-อัลฟาไคติน (α-chitin) เป็นสายโซ่จัดเรียงตัวกลับไปกลับมาซ้อนกัน สายโซ่เรียงตัวได้แน่นและมีความแข็งแรงสูงสุดพบในเปลือกกุ้งและปู

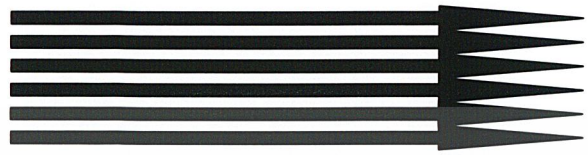
-เบตาไคติน (β-chitin) เป็นสายโซ่จัดเรียงตัวในทิศทางเดียวกัน สายโซ่เรียงตัวได้ไม่แน่นมาก พบในแกนปลาหมึก

-แกมมาไคติน (γ-chitin) เป็นลักษณะผสมของ β และ α เป็นสายโซ่เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ มีทั้งทิศทางเดียวกันและกลับทิศทางกัน พบในเส้นใยของรังหุ้มไข่ของแมลงปีกแข็ง

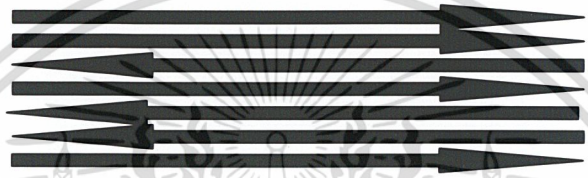
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 2.2 การจัดเรียงตัวภายในสายพอลิเมอร์ไคติน (ก) แบบอัลฟ่า (ข) แบบเบต้า และ (ค) แบบแกมมา

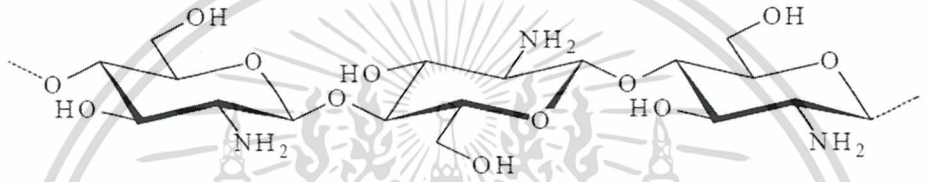
ที่มา : ธีระพันธ์ เจริญสาคร, 2548

2.1.2 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซาน มีชื่อทางเคมีว่า poly-β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-glucose หรือ พอลิเมอร์ที่มีหน่วยย่อยชนิดน้ำตาลกลูโคซามีน (polymer- mono- glucosamine) ดังแสดงในรูป 2.3 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการย่อยสลายหมู่อะซิทิลออกจากพอลิเมอร์ของไคติน เรียกกระบวนดังกล่าวว่า กระบวนการกำจัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) บางครั้งเรียกไคโตซานว่า ดีอะเซทิเลชันไคติน (deacetylation chitin) เนื่องจากหมู่อะเซทิลของไคตินถูกตัดออกเหลือเพียงกรดอะมิโนบนคาร์บอนตำแหน่งที่สองของวงแหวนไพราโนส (pyranose) ไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกรดหรือด่าง รวมทั้งกรดอนินทรีย์บางชนิด เช่น กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในน้ำที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 6.5 เนื่องจากโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 2.4 แต่ถ้านำไคโตซานมาบดแห้งกับกรดอนินทรีย์ จะได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ (water solute chitosan) ถ้าหมู่อะเซทิลที่ถูกย่อยสลายหรือกำจัดไปประมาณร้อยละ 90-100 จะได้ไคโตซานชนิดที่ไม่มีหมู่อะเซทิล (fully

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไฟล์นี้ไปเผยแพร่ต่อ และต้องทำลายเอกสารนี้ทันทีหลังจากใช้งานเสร็จตามวัตถุประสงค์

deacylated chitosan) ทำให้คุณสมบัติของไคโตซานต่างจากพอลิเมอร์อื่น เช่น เป็นประจุบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระบนคาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ กรดฟอร์มิกความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 0.2-100 เป็นตัวทำละลายที่ดีของไคโตซาน และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (biodegradable) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมีโครงสร้างสายตรงของเอมีน (linear amine) ที่ทำปฏิกิริยาหรืออยู่ในรูปเกลือของกรดต่างๆได้ง่าย (นันทนา นิ่มเจริญนิยม, 2542; Houston และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา : http://zoomshop.thport.com/produg.html (24 พฤศจิกายน 2553)

รูปที่ 2.4 แบบจำลองแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างโมเลกุลของสายโซ่ไคโตซาน (intermolecular hydrogen bonding)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Houston และคณะ, 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แหล่งของไคตินและไคโตซาน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ทางชีวภาพที่มีปริมาณเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ ไคตินเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิต มีลักษณะเป็นเส้นใยยึดสานต่างๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้น ทำหน้าที่ห่อหุ้มอวัยวะและสร้างความแข็งแรงให้แก่ผนังเซลล์ พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในสัตว์พวกมีปล้อง เช่น แมลงชนิดต่างๆ กุ้ง ปู กั้ง หอยเปลือกแข็ง หอยมุก กระดองปลาหมึก ผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ เป็นต้น (Muzzarelli, 1977) ในธรรมชาติจะพบแหล่งไคโตซานน้อยกว่าไคติน ในสัตว์น้ำพวกที่มีเปลือกแข็งหุ้มตัว เช่น กุ้งและปูพบว่ามีไคตินคิดเป็นสัดส่วนดังนี้ (ตารางที่ 2.1) ในเปลือกกุ้งจะมีไคตินอยู่ประมาณร้อยละ 14-27 (โดยเทียบกับน้ำหนักแห้ง) และในกระดองปู ขากรรเชียง มีไคตินอยู่ประมาณร้อยละ 13-15 เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้ง (Muzzarelli, 1977)

ตารางที่ 2.1แหล่งวัตถุดิบที่สำคัญของไคติน

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีปล้อง (Arthropods)	หนอนทะเล ครัสตาเซียน (Colentera crustaceans) กุ้งก้ามกราม (Lobster)[a] กุ้ง (Shirmp)[a] กุ้งนาง (Prawn) ปู (Crab) หอย (shellfish)
แมลง (Insect)	แมลงป่อง แมงมุม มด แมลงปีกแข็ง
จุลินทรีย์ (Microorganism)	สาหร่ายสีเขียวยีสต์(β-type) เชื้อรา (ผนังเซลล์) [b] ก้านซีสปอร์ของ penicillin[b] สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำตาลสปอร์

หมายเหตุ; a แหล่งวัตถุดิบในปัจจุบัน

b แหล่งวัตถุดิบในอนาคตเมื่อความต้องการเพิ่มขึ้น

ที่มา : http//www.iboro.ac.uk/department/project/2002 (24 พฤศจิกายน 2553)

ในธรรมชาติไม่พบไคตินเป็นโครงสร้างหลักเดี่ยวๆในสิ่งมีชีวิต โดยมักพบในรูปที่เป็นสารประกอบที่ปะปนอยู่กับสารอื่น เช่น ในเปลือกกุ้ง หรือกระดองปู จะพบว่ามีหินปูนหรือแคลเซียม และโปรตีนประกอบอยู่ด้วย ในขณะที่เปลือกแข็งหุ้มของแมลงจะประกอบด้วยไคตินในรูปที่เป็นสารเชิงซ้อน ไคตินโปรตีน (chitin-protein complex) และในผนังเซลล์ของรา ยีสต์หรือจุลินทรีย์ ไคตินจะอยู่ร่วมกับสารอื่นๆ กุ้งนับเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตไคตินเชิงพาณิชย์ เนื่องจาก

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเสียที่ได้จากการแปรรูปเพื่อไปเป็นอาหารมีจำนวนมาก โดยเฉพาะกุ้งซึ่งถือว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของโลก (Pranee, 2002)

องค์ประกอบที่เป็นไคตินในโครงสร้างของกุ้งและปูต่อน้ำหนักตัวแห้งคิดเป็นร้อยละ 15-20 ซึ่งปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของน้ำหนักตัวแห้งของสัตว์ต่างๆ เหล่านี้มีต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณไคตินที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

แหล่งวัตถุดิบ	ปริมาณที่พบ (%)
เชื้อรา	5-20
หนอน	20-38
ปลาหมึก	3-20
แมงป่อง	30
แมงมุม	38
แมลงสาบ	35
แมลงปีกแข็ง	37
กุ้ง	40
หนอนไหม	44
ปูเสฉวน	69
ปูหิน	70

ที่มา : http//www.iboro.ac.uk/department/cg/project/2002 (24 พฤศจิกายน 2553)

2.3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไคติน– ไคโตซาน

2.3.1 การละลาย (Solubility)

ไคตินไม่ละลายน้ำ กรดเจือจาง ด่างเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ แต่สามารถละลายได้ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (กรดเกลือ) กรดซัลฟูริกเข้มข้น (กรดกำมะถัน) กรดฟอสฟอริก กรดฟอร์มิก (Ahydrous formic acid) และ DMAc-LiCl (N,N-Dimetylamide-Lithiumchloride) ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่างๆ เป็นผลมาจากสายโซ่ที่อยู่กันหนาแน่นมีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน (หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่อะซิตามิโต) ไคโตซานไม่สามารถละลายน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีพีเอชน้อยกว่า 6 กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกนิยมใช้ในการละลายไคโตซาน กรดอนินทรีย์บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดเปอร์คลอริก และกรดฟอสฟอริก สามารถละลายไคโตซานได้เช่นกันภายใต้การกวนที่อุณหภูมิสูงปานกลาง อย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น สารละลายไคโตซานมีความเหนียวใส ในสารละลายหมู่อะมิโนของไคโตซานจะแตกตัว โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pK_a) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของพอลิเมอร์ โดย pK_a ของไคโตซานมีค่าอยู่ในช่วง 6.2-6.8

2.3.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

ไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า $1x\ \ 10^6$ ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $1x10^5$ ถึง $1.2x10^6$ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการผลิต

2.3.3 ระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล (Degree of deacetylation)

เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน-ไคโตซาน เนื่องจากไคติน-ไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างหน่วยย่อย N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่ร่วมกันของหน่วยย่อยแรกมากกว่าคือมีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติลต่ำ จะแสดงสมบัติเด่นของไคติน แต่ถ้าสัดส่วนของหน่วยย่อยที่สองมากกว่า คือมีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติลสูง จะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน

2.1.4 ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับหลายอย่าง เช่น ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติล น้ำหนักโมเลกุล ความแรงไอออน (Ionic strength) พีเอช และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้และการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของสารละลายไคโตซานในกรดอะซิตริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีพีเอชลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น

2.1.5 ความร้อนในการกระตุ้นให้เกิดการสลายพันธะแบบไฮโดรไลซิส (Hydrolysis heat of activation)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นปฏิกิริยาการสลายพันธะที่มีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สายโซ่พอลิเมอร์ของไคตินมีลักษณะเช่นเดียวกันกับเซลลูโลสคือ เป็นพันธะ Glycosidic linkage แบบ β (1-4) ดังนั้นไคตินจึงมีการกระตุ้นการย่อยสลายโดยความร้อน (Hydrolytic heat of activation) เท่ากับ 29 kcal

2.1.6 การย่อยสลาย (Degradation)

ไคติน-ไคโตซาน เหมือนกับพอลิเมอร์หรือพอลิแซคคาไรด์ทั่วไป เมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็นโอลิโกเมอร์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ และเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่ามอนอเมอร์ หรือมอนอแซคคาไรด์ โอลิโกเมอร์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ของไคตินและไคโตซานคือ N-acetyl-chitooligosaccharide และ Chitooligosaccharides ตามลำดับ ส่วนมอนอเมอร์หรือ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอนอแซคคาไรด์ของไคตินและไคโตซานคือ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ การย่อยสลายมีหลายประเภทได้แก่

2.1.6.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acidic hydrolysis) การย่อยสลายของสายโซ่โมเลกุลของไคโตซาน เนื่องจากกรดแบบสุ่มจะได้โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆกัน และหน่วยย่อยขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของพอลิเมอร์ โดยไคตินจะสามารถต้านทานต่อการย่อยสลายโดยกรดได้ดีกว่าไคโตซาน

2.1.6.2 การย่อยสลายโดยด่าง (Alkaline degradation) การย่อยสลายของสายโซ่โมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ในด่างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล การย่อยสลายแบบนี้เรียกอีกอย่างว่า Peeling reaction

2.1.6.3 การย่อยสลายโดยความร้อน (Thermal degradation) ความร้อนมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน จากการวิจัยพบว่า ความร้อนจากเตาอบ ซึ่งเป็นความร้อนแห้งที่อุณหภูมิน้อยกว่า หรือเท่ากับ 80 องศาเซลเซียล มีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น อุณหภูมิจุดหลอมเหลวใส (Glass transition temperature) มีค่าลดลง ความสามารถในการละลายไคโตซานเพิ่มขึ้น ส่วนความร้อนแห้งที่อุณหภูมิสูง มีผลทำให้ไคโตซานเกิดสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียล ความสามารถในการละลายไคโตซานจะลดลงที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียล เวลานานกว่าหรือเท่ากับ 2 ชั่วโมง ไคโตซานไม่ละลายในสารละลายผสมระหว่างกรดอะซิติกและโซเดียมอะซิเตต (สัดส่วน 0.2โมลาร์ต่อ 0.1โมลาร์) สำหรับเรื่องการอบแห้งโดยใช้ไอร้อนพบว่า ไคโตซานจะไม่สามารถละลายหลังจากการอบที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหลังจากการอบที่อุณหภูมิมากกว่า หรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมิน้อยกว่า หรือเท่ากับ 120 องศาเซลเซียล ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

ไคโตซานสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) โดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 5-6 ดังนั้นเอนไซม์ไลโซไซม์จึงเป็นเอนไซม์ที่ใช้วัดค่าการย่อยสลายจากเอนไซม์ (Enzymatic degradation) ของโพลิเมอร์ชนิดนี้ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้และย่อยไคโตซานได้ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต (Dong และคณะ, 2002)

ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากประจุบวกตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของกลูโคซามีน ซึ่งเป็นมอนอเมอร์ของไคโตซานสามารถเกิดปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีน และสารอื่นๆของเซลล์ หรือการที่ไคโตซานมีคุณสมบัติในการรวมตัวกับโลหะ (chelating agent) จึงสามารถเลือกจับโลหะ แม้ในปริมาณน้อยๆได้ ทำให้ยับยั้งการผลิตสารพิษและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต

แบคทีเรีย		รา
Gram positive	Gram negative	
- *Staphylococcus aureus* - *Listeria monocytogenes* - *Bacillus cereus*	- *Escherichai coli* - *Vibrio parahaemolyticus* - *Pseudomanas aeruginosa* - *Shigella dysenteriae* - *Vibrio cholera* - *Aeromanas hydrophila YMI* - *Aeromonashydrophila CCRC 13881* - *Salmonella typhimurium*	- *Botrytis cinerea* - *Rhizopus stolonifer* - *Aspergillus niger* - *Aspergillus parasiticus*

ที่มา : มาริสา และคณะ, 2549

2.4 ขั้นตอนการผลิตไคติน - ไคโตซาน

การผลิตไคติน-ไคโตซานสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ แต่วิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ในการดึงหมู่อะซิทิลออกจากไคตินนั้นยังอยู่ในระดับของห้องปฏิบัติการ ส่วนวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีทางเคมี ได้แก่ คุณภาพในการผลิตจะควบคุมยาก เครื่องมือที่ใช้ถูกกัดกร่อนอันเนื่องมาจากสารเคมีที่เข้มข้นและเกิดปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม (Prance, 2002)

วัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเป็นไคติน-ไคโตซานได้มาจากเปลือกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีข้อปล้อง อาทิ กุ้ง ปู แกนหมึก ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเชิงพาณิชย์ ส่วนการผลิตจากเปลือกของแมลงและผนังเซลล์ของเห็ดรานั้นยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ การผลิตไคติน-ไคโตซานสามารถผลิตได้ด้วยวิธีทางเคมีและชีวภาพ ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะวิธีทางเคมีซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ การผลิตจะเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบ ซึ่งอาจจะสับวัตถุดิบเป็นชิ้นเล็กๆ บางครั้งอาจจะนำมาล้างน้ำเพื่อกำจัดไขมัน โปรตีนและสิ่งสกปรกบางส่วนออกจากวัตถุดิบก่อนนำมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนด้วยด่างเจือจาง และกระบวนการแยกเกลือแร่ด้วยกรดเกลือเจือจาง ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้เรียกว่า “ไคติน” จากนั้นนำไคตินที่ได้เข้าสู่กระบวนการผลิตไคโตซานโดยการแช่ไคตินในสารละลายด่างเข้มข้นเพื่อดึงหมู่อะซิทิลออกจากไคติน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตซาน ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของด่าง สภาวะและขั้นตอนในการผลิตไคติน อัตราส่วนของไคตินต่อสารละลายด่างเข้มข้น พบว่า อุณหภูมิสูงทำให้เปอร์เซ็นต์การดึงหมู่อะซิทิลเพิ่มขึ้นแต่ขนาดโมเลกุลจะลดลง นอกจากนี้ Guan และคณะ, 1998 อธิบายความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่างส่วนกลับของอุณหภูมิและลอกการิทึมของอัตราการเกิดปฏิกิริยา ของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาดึงหมู่อะซิทิลและความเข้มข้นของด่าง Wu และ Zhang ทำการทดลองโดยแช่ไคตินใน 50% NaOH ที่ 100 องศาเซลเซียส และพบว่าปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 1 ชั่วโมงแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระดองปู (100 กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง)

↓

ล้างแล้วทำให้แห้ง

↓

บดคัดขนาด

↓

แยกโปรตีนออก (โดยการต้มกับโซดาไฟเข้มข้นร้อยละ 4-8 ปริมาตร 600 ลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง)

↓

ล้างน้ำให้หมดด่าง

↓

แยกเกลือแร่ออก(โดยใช้กรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 4-8 ปริมาตร 600 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง)

↓

ล้างน้ำแล้วทำให้แห้ง

↓

ไคติน (15-25 กิโลกรัม)

↓

ทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิล (โดยใช้โซดาไฟเข้มข้นร้อยละ 40-50 ปริมาตร 500 ลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียล)

↓

ล้างน้ำทำให้แห้ง

↓

ไคโตซาน (15-25 กิโลกรัม)

รูปที่ 2.5 การผลิตไคติน - ไคโตซานจากกระดองปู

ที่มา : ดัดแปลงจาก พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์, 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 กระบวนการผลิตไคติน -ไคโตซาน

2.5.1 วิธีทางเคมี

กรรมวิธีการผลิตไคโตซานโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีในสภาวะรุนแรงและอุณหภูมิสูง (thermochemistry) เช่น การย่อยสลายเพื่อกำจัดกลุ่มอะซิทิลออกด้วยสารละลายด่างเข้มข้นที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ซึ่งปริมาณไคโตซานที่ได้สัมพันธ์กับปริมาณการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลที่แตกต่างกันตามปริมาณกลุ่มอะซิทิลที่ถูกย่อยสลายคิดเป็นร้อยละ (อังคณา โทการกุล, 2540, Sashiwa และคณะ, 2003)

อุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกของสัตว์น้ำเช่นเปลือกกุ้งเปลือกปูที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยนำเศษเปลือกมาบดผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เจือจางเพื่อละลายโปรตีน จากนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรดด่พีเอชของสารละลายให้เป็นกลาง แล้วจึงนำตะกอนมาทำให้แห้งส่วนที่เหลือนำมาปรับด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจางเพื่อละลายคาร์บอเนต (carbonate) ที่อยู่ในโครงสร้างเปลือกให้เป็นแคลเซียมคลอไรด์ การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลในโครงสร้างของไคตินเริ่มต้นเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40-50 ภายใต้อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียสซึ่งจากกระบวนการนี้จะได้ไคโตซาน (พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์, 2542)

2.5.2 วิธีทางชีวภาพ

การผลิตไคติน-ไคโตซานโดยทางวิธีทางชีวภาพด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส (chitin deacetylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายกลุ่มอะซิทิลออกจากไคตินทำให้การย่อยสลายหมู่อะเซทิเลชันเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงดังเช่นวิธีทางเคมี วิธีทางชีวภาพช่วยลดปริมาณด่าง และของเสียที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ กระบวนการผลิตสามารถควบคุมการย่อยสลายกลุ่มอะซิทิล ออกจากไคติน และนอกจากนี้การใช้เอนไซม์เป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพ (biocatalyst) สามารถลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเอนไซม์ถูกทำลายได้ง่าย ในกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติ อาจนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ในการผลิตครั้งต่อไปได้ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้

กรรมวิธีการผลิตไคตินมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งวิธีทางเคมีและทางชีวภาพ ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้วิธีทางเคมี และวัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากกากของเหลือในอุตสาหกรรมอาหารทะเลเช่นเปลือกกุ้ง อาทิเปลือก-หัวกุ้งกระดองปู และแกนปลาหมึกโดยสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไคตินและไคโตซานที่ได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์เหล่านี้รวมถึงกรรมวิธีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิต ดังนั้นกระบวนการผลิตที่นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาผสมผสานกับกระบวนการผลิตทางเคมีจึงมีการพัฒนาขึ้นเพื่อให้ได้สมบัติของผลิตภัณฑ์ไคตินและไคโตซานตามต้องการ และเหมาะสมกับการนำไปใช้

2.6 เอมไซม์ย่อยสลายไคติน- ไคโตซาน

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน-ไคโตซาน พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสัตว์และจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบจะสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ทั้งสิ้น เนื่องจากต้องใช้ในขั้นตอนลอกคราบ หรือแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต

2.6.1 เอนไซม์ไคติเนส (chitinase: EC 3.2..1.14, glycosylhydrolase family 18 และ 19) เป็นเอนไซม์เร่งการย่อยสลายไคตินบริเวณปลายสาย และภายในสาย ให้ผลผลิตที่เป็นน้ำตาลเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนต่อกัน 2 โมเลกุล น้ำตาลเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนต่อกัน 3 โมเลกุล หรือสายไคตินสั้นๆ (short oligomer) ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดสายโมเลกุลจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยสลาย (Sasaki และคณะ, 2002)

2.6.2 เอนไซม์เฮกโซซามีนิเดส หรือเอนไซม์ไคโตไบโอส (hexosaminidase หรือ chitobiose :EC 3.2.1.52,glycosyhydrolase family 3 และ 20) เป็นเอนไซม์เร่งการย่อยสลายไคตินจากบริเวณปลายสาย หรือ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคโตไบโอส แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (เดือนเพ็ญ อาจไธสง, 2550)

2.6.3 เอนไซม์ไคโตซาเนส (chitosanase: EC 3.2.1.132, glycosylhydrolase family 46) เป็นเอนไซม์เร่งการย่อยสลายไคโตซาน แต่ไม่เร่งการย่อยสลายไคติน ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน หรือน้ำตาลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (เดือนเพ็ญ อาจไธสง, 2550)

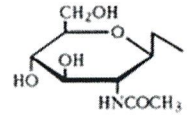
2.6.4 เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส (chitindeacetylase: EC 3.5.1.41) เป็นเอนไซม์เร่งการย่อยสลายหมู่อะซิทิลออกจากโมเลกุลของเอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนในพอลิเมอร์ของไคติน ทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายในระดับที่แตกต่างกัน และจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของกรดอะซิติกอิสระ (เดือนเพ็ญ อาจไธสง, 2550)

2.6.5 ไลโซไซม์ (lysozyme: EC 3.2.1.17) แยกได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลง พืช และจุลินทรีย์โดยสามารถย่อยสลายไกลโคเจน (glycogen) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียให้เป็นโอลิโกแซคคาร์ไรด์ของ N-acetylglucosaminal-N-acetylmuramic acid (เดือนเพ็ญ อาจไธสง, 2550

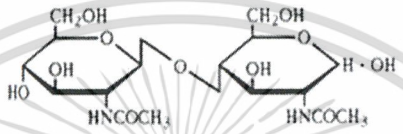
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ไคโตโอลิโกเมอร์ (Chitooligomer)

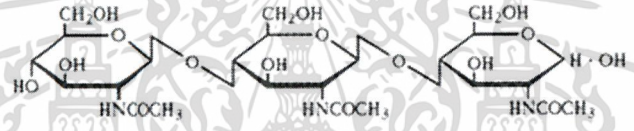
เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีนเป็นหน่วยย่อยของโอลิโกเมอร์เป็นโครงสร้างที่สกัดจากไคติน (รูปที่ 2.6) เป็นส่วนประกอบที่พบในเปลือกปู เปลือกกุ้ง และสัตว์ทะเลอื่นๆที่มีเปลือกแข็งห่อหุ้มตัว เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลโมโนแซคคาร์ไรด์ทดสอบพบความหวานเล็กน้อย



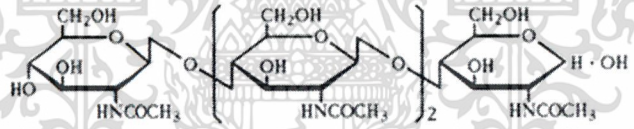
(ก)



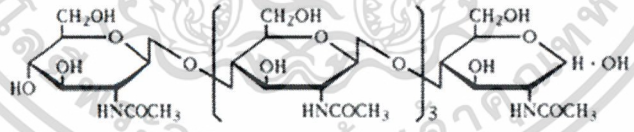
(ข)



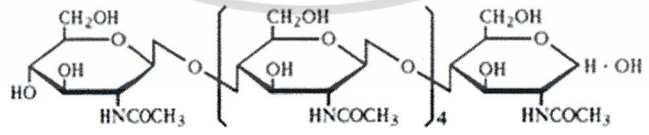
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะโครงสร้างของไคโตโอลิโกเมอร์ (ก) เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน (ข) ไคโตไบโอส (ค) ไคโตไตรโอส (ง)ไคโตเตโตรส (จ) ไคโตเพนโตส และ (ฉ) ไคโตเฮกโซส

ที่มา : http://www.seikagakubb.co.jp/bio/cgi-bin/search/ndetail.php?code=400427 (10 กุมภาพันธ์ 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

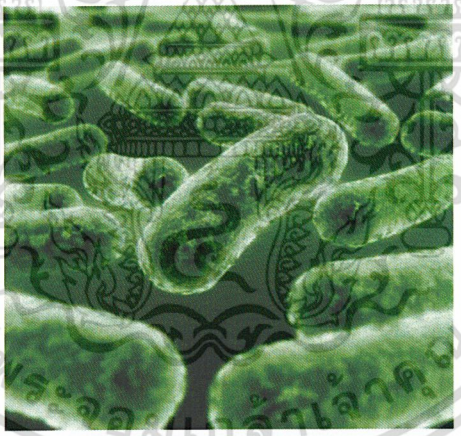
2.8 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา

2.8.1 เชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli*

2.8.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Escherichia coli*

E.coli เป็นจุลินทรีย์ในแฟลมมิลี Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่เซลล์มักเรียงตัวเดี่ยวๆหรืออยู่เป็นคู่ (รูปที่ 2.7) พบในลำไส้ของคน สัตว์เลือดอุ่น และสัตว์ปีก เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในสภาพมีอากาศ และไม่มีอากาศ (facultative anaerobe)

เชื้อ *E.coli* ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรค แต่บางครั้งก็ทำให้เกิดโรคได้เช่นกันโดยเฉพาะกับคนและสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง *E.coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารกับคน ในปี ค.ศ. 1892 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Shardinger ได้เสนอให้ใช้เชื้อ *E.coli* เป็นจุลินทรีย์บ่งบอกถึงการปนเปื้อนสิ่งขับถ่าย (fecel contamination) เนื่องจาก *E.coli* มีมากในอุจจาระของคน ดังนั้นการพบ *E.coli* ในอาหารหรือน้ำจึงบ่งบอกถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายที่เป็นไปได้ว่า มีจุลินทรีย์ก่อโรคปนเปื้อนอยู่ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะโคโลนีรูปร่างท่อนแกรมลบของเชื้อ *Escherichia coli*

ที่มา : http://www.kitchenzones.com/food-poisoning/e-coli/What-Is-E-Coli.html (28 มีนาคม 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117274

2.8.1.2 โรคที่เกิดจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษซึ่งสร้างโดยเชื้อกลุ่ม *E.coli*

ก. enteropathogenic *E.coli* (EPEC)

เป็นเชื้อที่ที่ทำให้ทารกท้องเสีย โดยเฉพาะทารกที่เลี้ยงในสถานที่ที่มีสุขภิบาลไม่สะอาดเชื้อสามารถแพร่ผ่านทางมนุษย์ ซึ่งเป็นพาหะทั้งทางตรงและทางอ้อม พบเชื้อหลายซีโรไทป์ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางเดินอาหารในน้ำและเครื่องดื่มในหลายประเทศ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

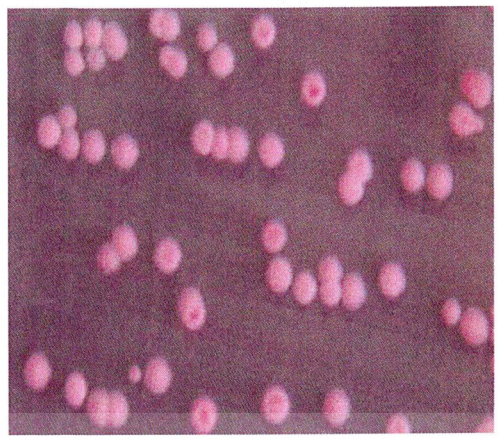
ข. enterotoxigenic *E.coli* (ETEC)

เชื้อกลุ่มนี้ก่อให้เกิดโรคท้องเสีย ในหมู่นักเดินทางรวมทั้งทารกที่อยู่ในประเทศที่สุขาภิบาลไม่สะอาด การพบโรคเกิดจากความสามารถของเชื้อในการผลิตสารพิษซึ่งเป็นปัจจัยในการบุกรุกเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ โดยเป็นสารไม่ทนความร้อน อาการของโรคจะเกิดขึ้นกับระบบทางเดินอาหาร โดยมีอาการคล้ายกับผู้ป่วยโรคอหิวาตกโรคเชื้อโรคจะแพร่ระบาดโดยทางตรงและทางอ้อม โดยมีมนุษย์เป็นพาหะของโรคนี้โดยผ่านทางอาหารและน้ำ ซึ่งพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 เนยแข็งบรีซึ่งนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกามีเชื้อ *E.coli* ปนเปื้อนทำให้ประชากรในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ มีอาการป่วยอย่างรุนแรง (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

ค. enteroinivasive *E.coli* (EIEC)

เชื้อกลุ่มนี้ทำให้มีอาการโรคคล้ายบิด หรือคล้ายโรคชิกเกลโลซิส โดยเชื้อสามารถสร้างปัจจัยบุกรุกเยื่อบุลำไส้ออกมาแล้วก่อโรคได้ มนุษย์เป็นพาหะทั้งทางตรงและทางอ้อม มีการแพร่กระจายของเชื้อโรค ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อปริมาณ 10^6 เซลล์ทำให้เกิดโรค การระบาดครั้งแรกพบในสหรัฐอเมริกาในเนยแข็งคาเมมเบิร์ต ซึ่งมีเชื้อ *E.coli* 124: B17 (รูปที่ 2.8) ปนเปื้อน โรคทางเดินอาหารซึ่งเกิดจากสารพิษชนิดพอลิเพปไทด์โดยพลาสมิด (plasmid) กำหนดให้มีการสร้างสารพิษที่สามารถบุกรุกเยื่อบุลำไส้ได้ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 เชื้อ *E. coli* 124: B17 บนอาหาร Sorbitol Mac-conkey agar แสดงลักษณะโคโลนีกลม สีชมพู ขอบเรียบ ผิวหน้าเยิ้มเล็กน้อย

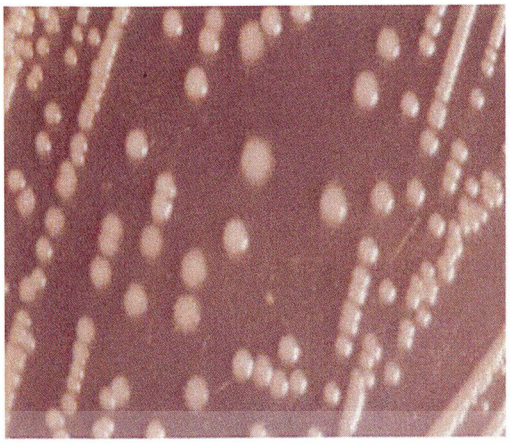
ที่มา : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1079 (28 มีนาคม 2554)

อาการของโรคคล้ายโรคชิกเกลโลซิส(shigellosis) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับเชื้อ อาการของโรคที่เกิดขึ้นจะทำให้ผู้ป่วยเป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสียปวดศีรษะ อุจจาระที่ขับออกมาจะมีเชื้อจำนวนมาก อาการของโรคจะเป็นอยู่นาน 7-12 วัน เมื่อผู้ป่วยหายแล้วยังจะเป็นพาหะโดยมีเชื้อในอุจจาระต่อไปเป็นเวลานาน (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

ง. enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC)

เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *E.coli* 0157: H7 (รูปที่ 2.9) เป็นเชื้อที่ทำให้มนุษย์มีอาการท้องเสียได้โดยถ่ายเป็นเลือดอย่างรุนแรง เนื่องจากลำไส้อักเสบ รวมทั้งปัสสาวะเป็นเลือด วัวนมทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรค การรับประทาน 10 ถึง 100 เซลล์ก่อทำให้เกิดโรคได้ ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคเกิดจากการสร้างเอนเทอโรทอกซินออกมา สามารถสร้างสารพิษที่มีมากกว่า 1 ชนิด เชื้อสามารถเกาะที่ลำไส้ และเพิ่มจำนวนพร้อมกับสร้างสารพิษได้ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 เชื้อ *E. coli* O157: H7 บนอาหาร Sorbitol Mac-conkey agar แสดงโคโลนีกลม สีครีม ขอบเรียบ ผิวหน้าเยิ้มเล็กน้อย

ที่มา : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1079 (28 มีนาคม 2554)

อาการของโรค มีเลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปัสสาวะมีเลือด และมีต่อมน้ำเหลืองอักเสบ อาการของโรคเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อเข้าไป 3-9 วัน โดยมีอาการอยู่ 4 วัน โดยเป็นตะคริวที่ท้อง ถ่ายเหลว อาเจียน อาจมีไข้หรือไม่มี ลำไส้ใหญ่มีเลือดออก สารพิษทำลายเม็ดเลือดแดงทำให้เลือดจับตัวเป็นลิ่มในไต ในที่สุดไตจะวาย (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

2.8.2 เชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียกลม ขนาดเล็กประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวเซลล์แบบเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นกลุ่มไม่แน่นอน บางครั้งอาจมีการจัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์มีโคโลนีลักษณะสีเหลือง เหลืองทอง ส้ม และขาว (รูปที่ 2.10) (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

อุณหภูมิของการเจริญที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส พีเอช (pH)ที่เหมาะสม 7 -7.5 เป็นเชื้อที่มาสามารถเคลื่อนที่ได้ อาจใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด จัดอยู่ในกลุ่มพวกแสตปไฟโลคอกไคที่สร้างสารพิษออกมานอกเซลล์เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ได้แก่สารที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวภายในลำไส้และทางเดินอาหารผลทำให้เกิดอาการท้องเดิน เนื่องจาก *S. aureus* พบได้ตามส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น จมูก มือ แผลเรื้อรัง ผิวหนัง รวมทั้งบนเสื้อผ้า อากศ และฝุ่นละอองจึงมีโอกาสให้เชื้อชนิดนี้แพร่กระจายลงสู่อาหารได้ การปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร มาจากอาการไอจาม หรือจามลงในอาหาร หรือได้รับเชื้อจากผิวหนัง หรือได้รับเชื้อหลังจากการพาสเจอไรส์ อาหารสุกๆดิบๆ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ รวมทั้งมีระยะเวลานานพอในการเจริญ และสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซินภายในเซลล์ แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ในอาหาร สารพิษที่สร้างแบ่งได้เป็น 5 ชนิด คือ A B C D และ E ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนความร้อน ในระดับอุณหภูมิที่พาสเจอไรส์คือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และยังทนความร้อนที่ระดับ 143.3 อาศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที สารพิษชนิดนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ จึงทำให้ผู้บริโภคไม่สามารถรู้ได้ถึงสารพิษที่เกิดขึ้นในอาหาร เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไปเป็นเวลา 1- 6 ชั่วโมง จะมีอาการปวดท้อง ท้องเดิน อาการป่วยจะดีขึ้นในเวลา 8-24 ชั่วโมง อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* เป็นประจำได้แก่ อาหารที่ทำด้วยแป้ง ขนมปังที่มีครีม หรือคัสตาร์ด ขนมหวานต่างๆ แฮม และสัตว์ปีก

(บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะรูปร่างมีการจัดเรียงตัวคล้ายพวงองุ่นของ *Staphylococcus aureus*

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg (31/มีนาคม/54)

2.8.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Salmonella* spp.

ก่อนปี ค.ศ. 1940 เชื้อ *Salmonella* ที่ทำให้เกิดโรคระบาดที่ติดต่อทางน้ำ และทางอาหารในหมู่ประชาชนทั่วไป เกิดจากเชื้อ *S. typhi* และ *S. paratyphi* ในประเทศที่พัฒนาแล้วมีการใส่คลอรีนในน้ำประปาซึ่งทำให้การระบาดของโรคไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ลดลง จากการพัฒนาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการแยกจำแนกเชื้อที่ปนเปื้อนมากับอาหารทำให้ทราบว่าทั่วโลกมีการระบาดของเชื้อค่อนข้างสูง ในปี ค.ศ. 1950 พบว่าโรคซาโมเนลซิส (Salmonellosis) เป็นโรคที่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุด แม้ว่าจะมีการพัฒนาความรู้ด้านวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับแหล่งเชื้อและการแพร่เชื้อ ลักษณะการเติบโตของเชื้อและการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ รวมทั้งการควบคุมการปนเปื้อนในอาหาร และยังพบว่าโรคซัลโมเนลซีสที่เกิดจากแบคทีเรีย ยังคงเป็นโรคทางเดินอาหารที่พบมากที่สุดในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

2.8.3.1 ลักษณะของเชื้อ

เชื้อ *Salmonella sp.* ทุกชนิดมีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบไม่สร้างสปอร์(รูปที่ 2.11) ต้องการอากาศแบบเฟกคัลเททีฟ แอนแอโรบ เป็นเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างแก๊สได้จากการเจริญเติบโตในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิเหมาะสมของการเจริญเติบโตในช่วง 35 – 37 องศาเซลเซียส อาศัยอยู่ในธรรมชาติ เช่น ระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง และสัตว์ป่า สัตว์ปีก เต่า และ กบ รวมทั้งแมลงต่างๆ สัตว์ และสัตว์ปีก จะทำให้มนุษย์เกิดโรคซัลโมเนลโลซิสได้ และเป็นพาหะนำโรคต่อไปโดยการแพร่เชื้อทางอุจจาระ

รูปที่ 2.11 แสดงลักษณะรูปร่างท่อน เคลื่อนที่โดยใช้แฟกเจลลาของเชื้อ *Salmonella sp.*
ที่มา : http://mic011-it15.blogspot.com/p/salmonella.html (28 มีนาคม 2554)

2.8.3.2 การเป็นเชื้อโรคและอาการของโรค

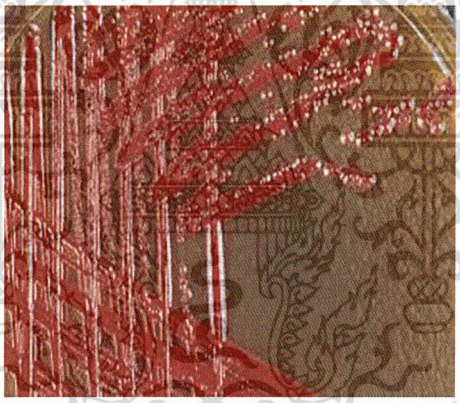
ซัลโมเนลโลซิสในมนุษย์แตกต่างจากโรคไข้ไทฟอยด์ และพาราไทฟอยด์ ที่เกิดจากเชื้อ *S. typhi* และ S. *paratyphi* ก่อโรคในสัตว์ต่างๆ รวมทั้งซัลโมเนลโลซีสผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อเข้าไป 10^5 – 10^6เซลล์ ในกระเพาะอาหารสามารถทำลายเชื้อชนิดนี้ได้ ดังนั้นต้องมีปริมาณเชื้อโรคมากขึ้น โดยเชื้อโรคที่รอดจากกระเพาะอาหารจะเดินทางไปเพิ่มจำนวนในลำไส้ อาการของโลกจะเกิดขึ้นภายหลังการรับเชื้อเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8 - 42 ชั่วโมง โดยทั่วไป 24 -36 ชั่วโมง มีอาการป่วย 2- 3 วัน แต่ในผู้ป่วยบางคนจะมีอาการป่วยนานกว่านี้ เมื่อผู้ป่วยหายจากโรคจะเป็นพาหะแพร่เชื้อต่อไปอีกหลายเดือน อาการของโรคจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสุขภาพของแต่ละบุคคล โดยมีอาการดังนี้ เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้อาเจียน ตัวเย็น มีไข้ สำหรับทารกและคนชราจะมีอาการรุนแรงอาจทำให้ตายได้ (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

2.8.4 เชื้อจุลินทรีย์ *Serratia sp.*

Serratia เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต บางสายพันธุ์สามารถสร้างสีแดงหรือสีชมพู เช่น *Serratia marcescens* ทำให้อาหารมีสีแดง หรือบางชนิดสามารถย่อยโปนตีนได้ ทำให้อาหารมีกลิ่นเหม็นเน่าเป็นสาเหตุของผลิตภัณฑ์เนื้อและผักแช่เย็นเน่าเสีย พบได้ทั่วไปในน้ำและในดิน (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)



รูปที่ 2.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Serratia sp.*

ที่มา : http://th.asiaonline.com/en/article?article=Serratia_marcescens (28 มีนาคม 2554)

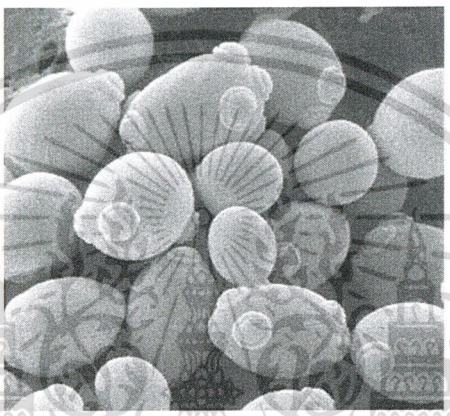
2.8.5 เชื้อยีสต์ *Candida albicans*

เป็นยีสต์เซลล์รูปกลมหรือรี มีการแตกหน่อระหว่างเซลล์ที่ต่อกัน โคนิเดียปรากฏปลายสาย ราผนังหนาขนาด 8-12 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.13) ซึ่งเป็นเชื้อปกติที่อยู่ตามเยื่อบุช่องคลอด

C. albicans จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด ก่อโรค Candidiasis ในคน ซึ่งเกิดตามเยื่อบุในปาก ช่องคลอด ทางเดินอาหาร หรืออาจเกิดโรคในเยื่อบุหัวใจ ในเลือด และสมอง โรคนี้พบได้ในทุกวัย พบมากในเด็กอ่อน คนอ้วน ผู้สูงอายุ หญิงตั้งครรภ์ เบาหวาน คนที่กิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาปฏิชีวนะนาน ๆ คนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องรุนแรง เช่น เอดส์ โดยอาการของโรค ถ้าเกิดที่เยื่อบุในปากก็จะมีลักษณะปากจะเป็นแผลช่องปาก พบเป็นฝ้าขาวที่ลิ้น หรือตามเยื่อเมือกในช่องปาก ช่องคลอด มีอาการตกขาว คันผิวหนัง พบมากบริเวณซอกผิวหนังที่มีเหงื่ออับชื้น เช่น ซอกรักแร้ ขาหนีบ ใต้ราวนม สะดือ ซอกสะโพก ง่ามนิ้ว เป็นต้น ลักษณะเป็นผื่นแดงคล้ายรอยถลอก มีขอบเขตชัดเจน ขนาดต่าง ๆ ตรงกลางอาจมีสีขาว โดยรอบอาจมีผื่นแดงเล็ก ๆ มีลักษณะเป็นสะเก็ดเล็กน้อย อาจมีอาการคันร่วมด้วย (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะรูปร่างกลมหรือของเชื้อ *Candida albicans*

ที่มา : http://52070145.exteen.com (28 มีนาคม 2554)

2.8.6เชื้อยีสต์ *Candida utilis*

ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวซึ่งต่างจากเชื้อราตรงที่เชื้อรามีหลายเซลล์ต่อกันเป็นเส้นใย ยีสต์แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสหลายอัน ยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อเป็นจุลินทรีย์ *Candida utilis* ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ทำให้การเน่าเสีย (บุษกร อุตรอภิชาติ, 2457)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฐิติมา สุขมาก (2550) ประสิทธิภาพของไคโตซานโอลิโกเมอร์และพอลิเมอร์จากกุ้ง ปู หรือปลาหมึก ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิดแกรมบวกจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* สายพันธุ์ 101, 310, 108, Scott A และ V7, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* และแบคทีเรียแกรมลบ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ BCC 24339, FS 004, TDH 293, TDH330 และ FS 015, *Escherichia coli, Salmonella enterica serotype Weltevreden* และ *Salmonella enterica serotype Typhimurium* โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) ของไคโตซานด้วยวิธี agar dilution และค่าความเข้มข้นที่ทำลายแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBC) ด้วยวิธี broth dilution พบว่า ไคโตซานพอลิเมอร์จากปูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ *L. monocytogenes* ดีที่สุด ในขณะที่ ไคโตซานพอลิเมอร์จากหมึกมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญ *S. aureus* และ *B. cereus* ดีที่สุด และไคโตซานออลิโกเมอร์จากปลาหมึกมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญ *V. parahaemolyticus* ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่า *Sal. Weltevreden*ต้านทานต่อไคโตซานได้ดีที่สุด (MIC = 0.15%v/v) ดังนั้น ประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียจากไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย แหล่งที่มาของไคโตซาน และขนาดโมเลกุล

ธีระพันธ์ เจิญสาคร (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคโตโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียรหัส 6.1 ซึ่งเจริญ ในอาหารไคตินมีเดียม (Chitin medium) ให้การสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีน และไคโตโอลิโกเมอร์สูงสุดสภาวะการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และยังพบว่าปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) เป็น 10^{10}โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารไคตินมีเดียมเริ่มต้น 7.0 เป็น 9.0 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และให้การย่อยไคตินมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์

เดือนเพ็ญ อาจไธสง (2550) การผลิตไคโตโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราโดยวิธีการทางชีวภาพโดยย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส และวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิต่างๆ พบไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้มีอยู่หลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาวะ และระยะเวลาในการย่อย นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์จากการย่อยด้วยกรด มาศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้

ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ (2550) การติดเชื้อของแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของผู้ป่วย เชื้อที่รักษาค่อนข้างยาก คือเชื้อที่เกิดการดื้อยาได้ง่าย ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci sp.* และ *Candida* sp. เป็นต้น การรักษาที่ดีที่สุดคือ การตัดเนื้อตายออกแล้วปิดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

skin graft หรือวัสดุปิดแผล และการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ก็อาจทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาขึ้น ไคติน-ไคโตซานได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลากหลายด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการแพทย์ เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ และสามารถยับยั้งเชื้อรา และเซลล์ก่อมะเร็งได้ อย่างไรก็ตาม จากผลงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานและอนุพันธ์ ขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล โดยโอลิโกเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า 6 หน่วยย่อย สามารถยับยั้งเชื้อได้ดี ที่ความเข้มข้นต่ำ การเตรียมไคโตซานโอลิโกเมอร์ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้สารเคมี และเอนไซม์ การเตรียมโดยใช้สารเคมี ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกกรด เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป และใช้เวลาไม่นาน แต่มีราคาแพง ได้ผลผลิตในปริมาณต่ำ และมีกรดเป็นของเสียเหลือทิ้ง ส่วนในกรณีที่ใช้เอนไซม์ ก็จะสามารถควบคุมขนาดโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า และไม่มีกรดเหลือทิ้ง แต่การใช้เอนไซม์ยังคงให้ผลผลิตในปริมาณที่ต่ำ และใช้เวลานาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จะทำการเตรียมโอลิโกเมอร์ของไคโตซาน และอนุพันธ์ที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยการเตรียมโอลิโกเมอร์ของไคโตซานจะใช้เทคนิคทางรังสี เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก และไม่มีความจำเป็นในการกำจัดสารเคมีหรือเอนไซม์ ที่ปะปนกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ จากนั้นโอลิโกเมอร์ที่ได้จะถูกแยกโดยใช้เทคนิคการตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความยุ่งยากน้อยกว่าการแยกโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี หากต้องการแยกโอลิโกเมอร์ในปริมาณมากๆ ส่วนอนุพันธ์ของไคโตซานโอลิโกเมอร์จะได้จากการดัดแปรทางเคมี (chemical modification) ของไคโตซานโอลิโกเมอร์ สุดท้ายโอลิโกเมอร์และอนุพันธ์ที่เตรียมได้จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบในแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก โดยศึกษาผลของชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ความเป็นไปได้ในการยับยั้งเชื้อ จุลินทรีย์ที่พบในแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกของไคโตซานโอลิโกเมอร์

รังสิมา สูตรอนันต์ และคณะ (2548) การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุล (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 กิโลดาลตัล, 1-10 กิโลดาลตัล และมากกว่าเท่ากับ 10 กิโลดาลตัล) ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (chitooligosaccaride mixture) ที่เตรียมจากเปลือกกุ้งโดยการย่อยของเอนไซม์ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี Agar Disk Diffusion จากผลการทดลองพบว่าค่ายับยั้งต่ำสุดของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่น้ำหนักโมเลกุลสูง ให้ค่ายับยั้งน้อยกว่าการใช้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่มีโมเลกุลต่ำ โดยผลการใช้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์พบว่าขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 กิโลดาลตัลให้ค่ายับยั้งต่ำสุดในแบคทีเรียที่ 100 ppm , 1-10 กิโลดาลตัลให้ค่ายับยั้งต่ำสุดในแบคทีเรียที่ 250 ppm และน้อยกว่าเท่ากับ 1 กิโลดาลตัล ให้ค่ายับยั้งต่ำสุดในแบคทีเรียที่ 1000 ppm

Semunek และคณะ (2006) ไคโตซานเตรียมจากเปลือกกุ้งกุลาดำโดยขั้นตอนการกระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 ที่ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศบรรยากาศเป็นเวลา 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง พบว่าไคโตซานที่ผ่านกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำจัดหรือลดหมู่อะซีติล 1.0 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศปกติพบว่าความเข้มข้นต่ำสุด 625 ppm ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*., *Staphylococcus aureus*. และในขณะที่ *Candida albicans*. ถูกยับยั้งที่ค่าเท่ากับ 312.5 ppm เนื่องจากระดับของกระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติล (% DD) และน้ำหนักโมเลกุลที่ลดลง (MW)

Delieghere และคณะ (2004) ไคโตซานได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากการประยุกต์ใช้ในอาหารและเภสัชกรรม และการต้านจุลินทรีย์ กิจกรรมของไคโตซานได้รับการชี้ให้เป็นหนึ่งในคุณสมบัติที่น่าสนใจที่สุดของการไคโตซาน เพื่อศึกษาดูปริมาณผลของไคโตซานในการต้านจุลินทรีย์กับการศึกษาระดับของการกำจัดหรือลดหมู่อะซีติลร้อยละ 94 และมีน้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตันผลการต้านจุลินทรีย์ของไคโตซานและการตรวจสอบผลโดยการเคลือบไคโตซานเพื่อศึกษาการสลายตัวของผลไม้และผัก (สตรอเบอร์รี่และผักกาดหอม)ไคโตซานสามารถต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 40-750มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อไคโตซาน ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้เหล่านี้ได้ถูกปรับสภาพบรรยากาศสมดุลก่อนบรรจุ, เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และระหว่างการเก็บรักษามีการประเมินผลสารเคลือบผิวไคโตซานต่อสตรอเบอร์รี่และผักกาดหอมชุบไคโตซาน พบว่าไคโตซานมีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่อผักกาดหอมและฤทธิ์จะหายไปหลังจาก 4 วันของกรรมวิธีของการจัดเก็บ ในขณะที่ไคโตซานที่เคลือบผิวสตรอเบอร์รี่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 12 วัน หลังจากการจัดเก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียรหัส 6.1

Escherichia coli ATCC 25922

Staphylococcus aureus ATCC 259d3

Serratia sp.

Salmonella typhirecenium DMST 0562

Candida utilis TISTR 5001

Candida albicans

3.1.2 อุปกรณ์3.3.1

1. เครื่องเขย่า (Incubator shaker) Comthrem scientific Ltd รุ่น polar 1000
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Comthrem scientific Ltd รุ่น polar 1000
3. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. ออโตปิเปต (Autopipette) ขนาด 0.5-1 มิลลิลิตร Pipetman รุ่น GIL SON
5. เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) Hirayama รุ่น HV-50
6. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Cyberscan 2000
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Mettler-Toledo (Thailand) Ltd. รุ่น AG204
8. ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina air flow) ISSCO รุ่น BVT 123
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Shimadzu รุ่น UV 1201v
10. คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
11. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
12. กระบอกตวง (Cylinder)
21. บีกเกอร์ (Beaker)
13. กล้องจุลทรรศน์ Nikon ECLIPSE 80i
14. แผ่นสไลด์ (Slide) และ แผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)
15. โถดูดอากาศ (Desiccators)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini centrifuge) National labnet รุ่น C- 1200
17. เครื่องผสมสาร (Vortex) Scientific industries รุ่น Vortex- 2 Genie
18. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น ULE 600 ของบริษัท International Scientific, Supply, Thailand
19. เครื่องทำแห้งเยือกแข็งสุญญากาศ (Freeze dryer)
20. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียล
21. เครื่องแมกเนติก สเตอร์เรอร์ (Magnetice stirrer)
22. ขวดดูแรน (Duran)
23. สายยางซิลิโคลน
24. กระบอกตวง (Cylinder)
25. ขวดก้นกลม (Round bottom flasks)
26. ตู้ดูดควัน (Laboratory Chemical Fume Hood)
27. ชุดกรอง (Filter)
28. เมมเบรนขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตรและ 0.45 ไมโครเมตร
29. กระดาษกรองเบอร์ 1 Whatman International Ltd., UK
30. เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) Shimadzu; Japan ประกอบด้วย
    ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟตเคลื่อนที่ ; LC-10 AD VP
    ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV; SPD-10 A VP
    ส่วนประมวลและบันทึกผล ; C-R7Ae plus

3.1.3 เคมีภัณฑ์

3.1.2.1 เคมีภัณฑ์สำหรับการละลายไคติน

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Hydrocholic acid)

สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล (Potassium hydroxide)

3.1.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

อาหารไคตินมีเดียม

อาหารแข็งไคตินมีเดียม

อาหารแข็ง NA

3.1.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์

อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การละลายไคติน

ทำการละลายไคตินโดยเริ่มจากชั่งน้ำหนักเปลือกกุ้งใส่ลงในขวดดูแรนที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วละลายในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 20 ภายใต้เครื่องดูดควัน จากนั้นทิ้งไว้ 6-8 ชั่วโมงจากนั้นเติมน้ำกลั่น และทิ้งไว้เพื่อให้ไคตินตกตะกอนอีกครั้ง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง

3.2.2 การทำคอลลอย์ดอลไคตินให้อยู่ในรูปผง

นำคอลลอย์ดอลไคตินที่ได้จากการละลายด้วยกรดมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล แยกเอาส่วนใสออกและนำตะกอนที่ได้ใส่ขวดก้นกลม จากนั้นทำให้เย็นโดยใช้เครื่อง pre-freeze จนตะกอนคอลลอย์ดอลไคตินเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง แล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งสุญญากาศ เก็บผงคอลลอย์ดอลไคตินไว้ในตู้ดูดความชื้น

3.2.3 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารไคตินมีเดียม

เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อไคตินมีเดียม 75 มิลลิลิตร ในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการย้ายอาหารเลี้ยงเชื้อไปยังอาหารแข็งสูตรไคตินมีเดียมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะโคโลนีที่เป็นสีขาว สังเกตรูปร่างลักษณะ และส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ว่าได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.2.4 การผลิตไคโตโอลิโกเมอร์ด้วยแบคทีเรียรหัส 6.1

หลังจากได้ผงคอลลอย์ดอลไคตินแล้ว นำมาย่อยด้วยแบคทีเรียรหัส 6.1ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.2.3 เพื่อให้ได้เป็นไคโตโอลิโกเมอร์ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรไคตินมีเดียมซึ่งมีส่วนประกอบของคอลลอย์ดอลไคติน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมหัวเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ให้มีเซลล์เริ่มต้น 1 ถึง 2 x 10^7โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วันโดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงวิเคราะห์ปริมาณไคโตโอลิโกเมอร์ ด้วย HPLC (ภาคผนวก ข) ทำซ้ำแต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากคอลลอย์ดอลไคตินเป็นผงไคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยา

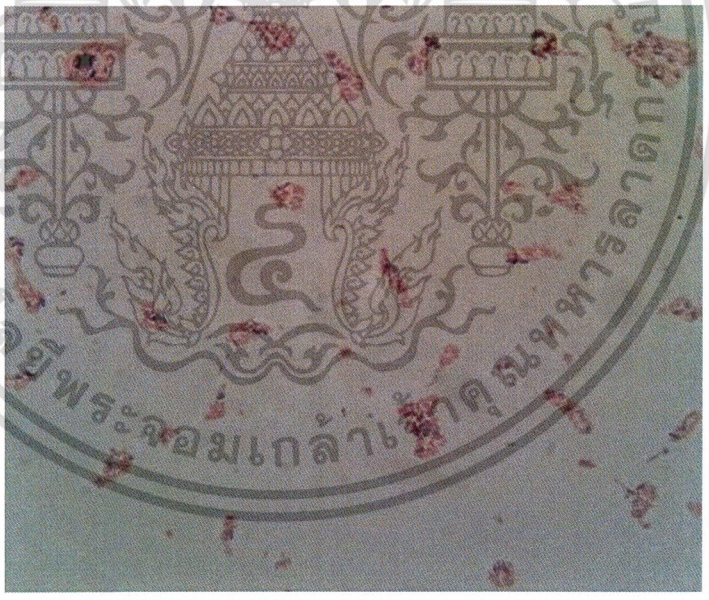
จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3, *Serratia sp.*, *Salmonella typhirecenium* DMST 0562, *Candida utilis* TISTR 5001, *Candida albicans* เริ่มจากนำแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 มาตัดให้เป็นวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อในอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจุ่มในสารละลายไคโตโอลิโอเมอร์ นำมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 15 มิลลิลิตรและมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์จากขนาดของวงใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อและการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวไคตินมีเดียม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อแบคทีเรีย 6.1 ลงบนจานอาหารแข็งไคตินมีเดียมที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน เปปโตน และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีโคโลนีเดี่ยวๆสีขาวขุ่น ลักษณะกลมขนาดเล็ก โค้งนูน มีเมือกเล็กน้อย (รูปที่ 4.2) และเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็งไคตินมีเดียม จากนั้นนำไปศึกษารูปร่างของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ด้วยการย้อมแกรม และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีลักษณะเป็นรูปท่อน จะย้อมสีติดแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (รูปที่ 4.1)



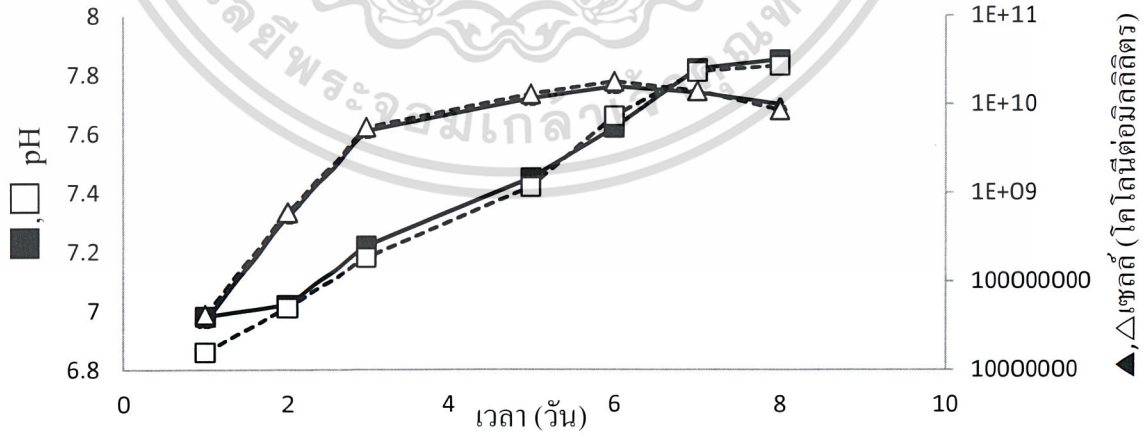
รูปที่ 4.1 แสดงการย้อมสีแกรมและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารแข็งไคตินมีเดียม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 ผลการศึกษาการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารไคตินมีเดียมที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ คอลลอยด์คอลไคตินและผงไคติน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารไคตินมีเดียมสูตรพื้นฐานที่มีคอลลอยด์คอลเป็นแหล่งคาร์บอนและถูกย่อยสลายโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 จากเริ่มต้น 6.98 เป็น 7.85 และในอาหารไคตินมีเดียมสูตรพื้นฐานที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนพบการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากเริ่มต้น 6.86 เป็น 7.83 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และในอาหารคอลลอยด์คอลไคตินและอาหารผงไคตินมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.3)



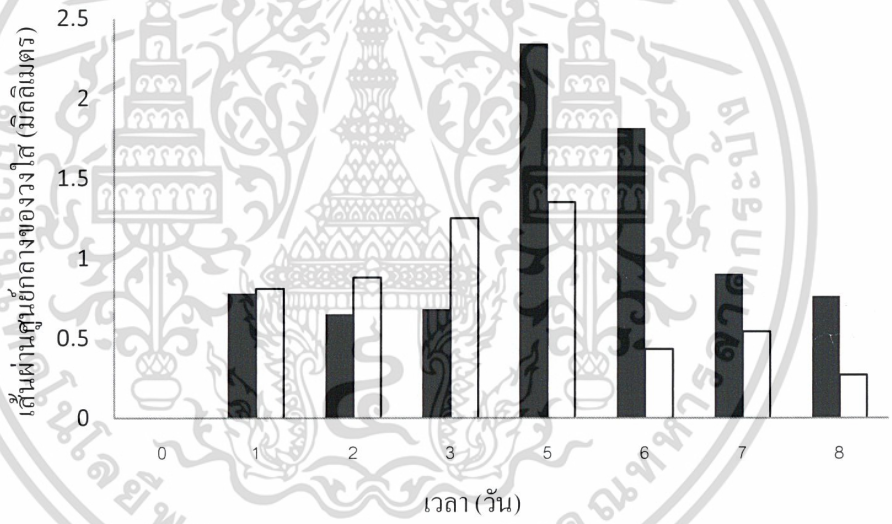
รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญและการเปลี่ยนแปลงพีเอช เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหาร(□,△) คอลลอยด์คอลไคตินและ(■,▲)ผงไคติน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของไคโตโอลิโกเมอร์

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans* , *Candida utilis* TISTR 5001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhirecenium* DMST 0562, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3เริ่มจากนำแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 มาตัดให้เป็นวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อในอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจุ่มในสารละลายไคโตโอลิโอเมอร์ นำมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 15 มิลลิลิตร มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ผลิตจากอาหารคอลลอยด์คอลไคติน และผงไคตินจากขนาดของเคลียร์โซน ได้ผลดังต่อไปนี้

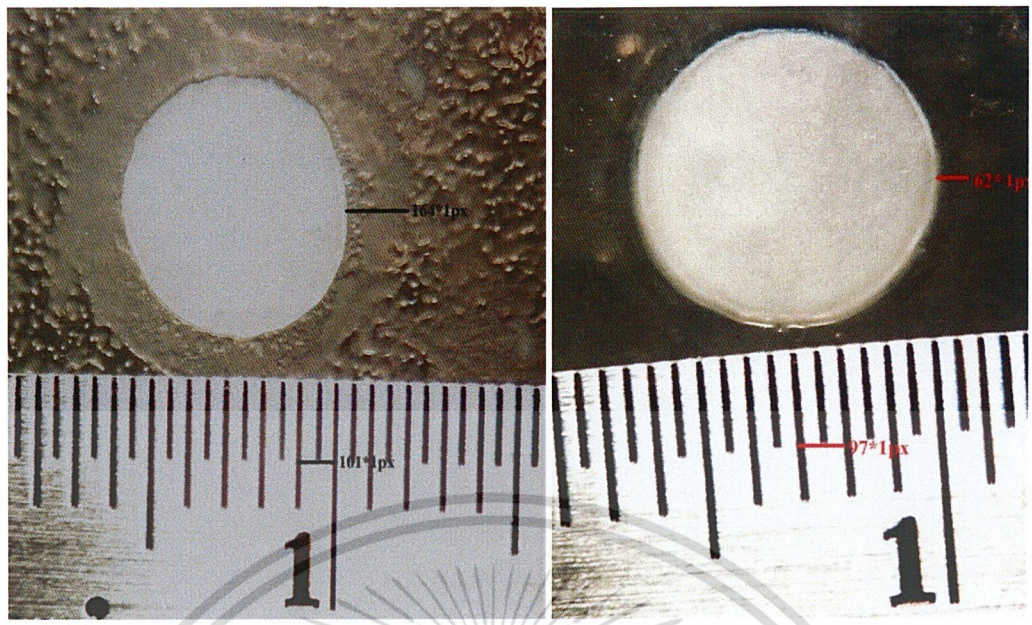
4.3.1 ผลการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

จากรูป 4.4 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์คอลไคติน เปรียบเทียบกับผงไคติน ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 พบว่าคอลลอยด์คอลไคตินและผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้ง สูงสุดในวันที่ 5 แต่คอลลอยด์คอลไคตินมีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีกว่าผงไคติน โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 2.34 มิลลิเมตรและ1.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.5

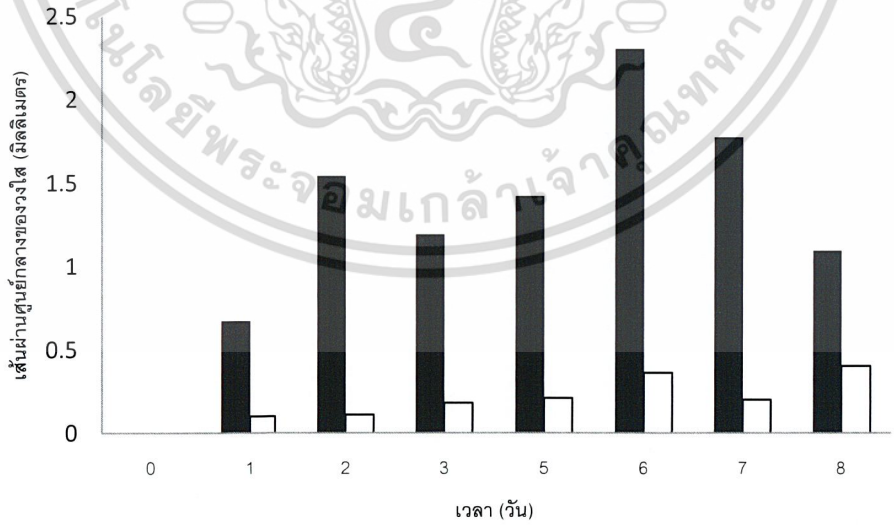
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส6.1ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5)

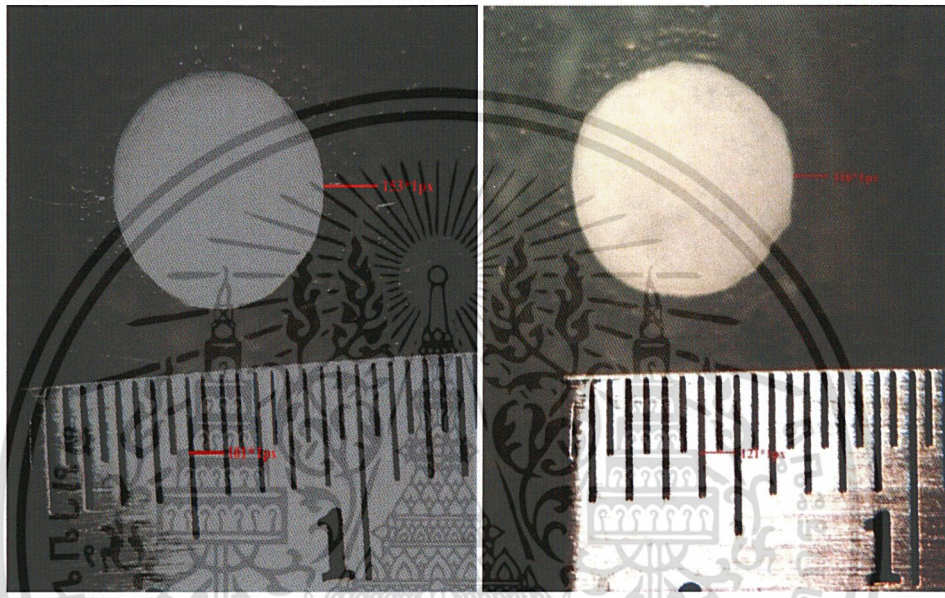
4.3.2 ผลการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.6 แสดงผลการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.6 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์ดอลไคติน เปรียบเทียบกับผงไคติน ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 พบว่าคอลลอยด์ดอลไคตินมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 สูงสุดในวันที่ 6 โดยให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1.77 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งได้สูงสุดในวันที่ 7 โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.40 มิลลิเมตร และไคโตโอลิโกเมอร์ที่ผลิตจากคอลลอยด์ดอลไคตินมีการยับยั้งได้ดีกว่าผงไคติน ดังแสดงในรูปที่ 4.7

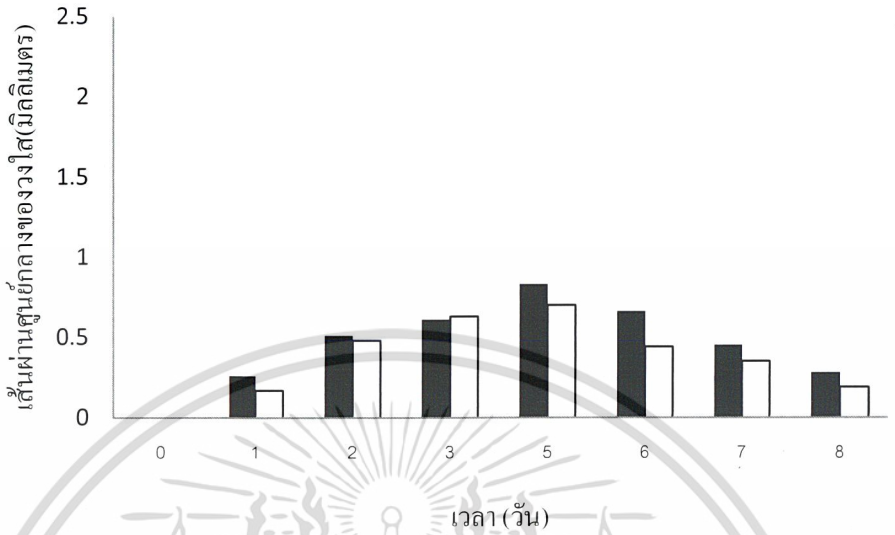


(ก) (ข)

รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 6) และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

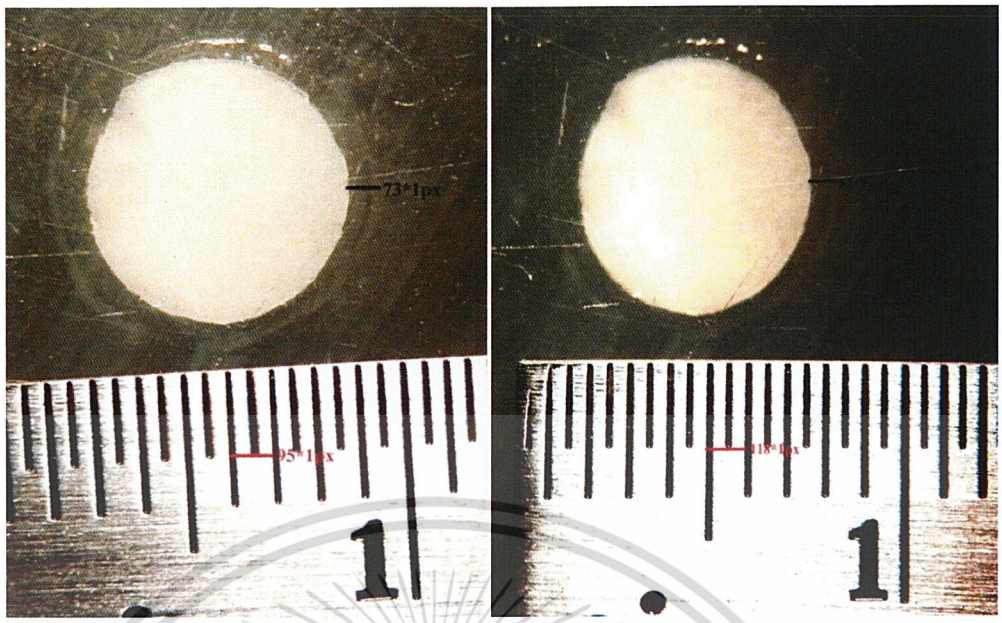
4.3.3 ผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.8 แสดงผลการยับยั้ง *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

จากรูป 4.8 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์ดอลไคตินเปรียบเทียบกับผงไคติน ในการยับยั้งจุลินทรีย์ *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 พบว่าคอลลอยด์ดอลไคตินและผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 สูงสุดในวันที่ 5 แต่คอลลอยด์ดอลไคตินมีประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีกว่าผงไคติน โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.83 มิลลิเมตรและ 0.70 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

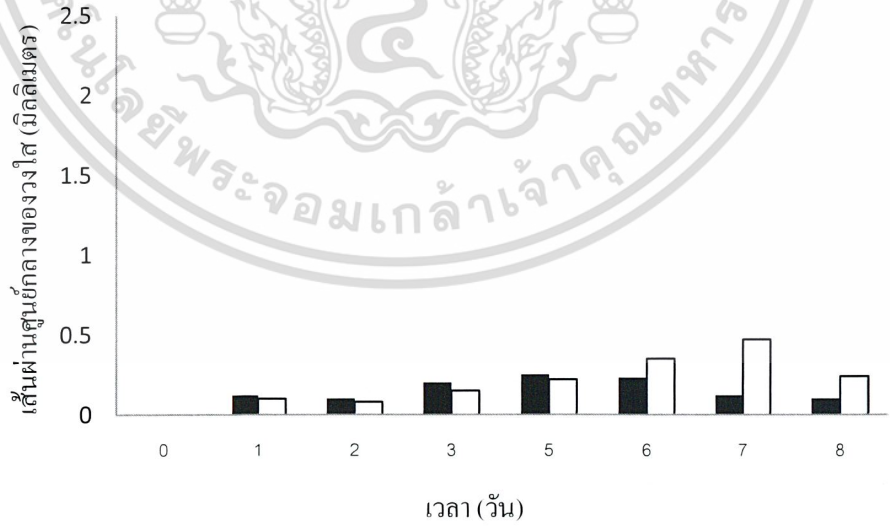
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน (ก) และผงไคติน (ข) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5)

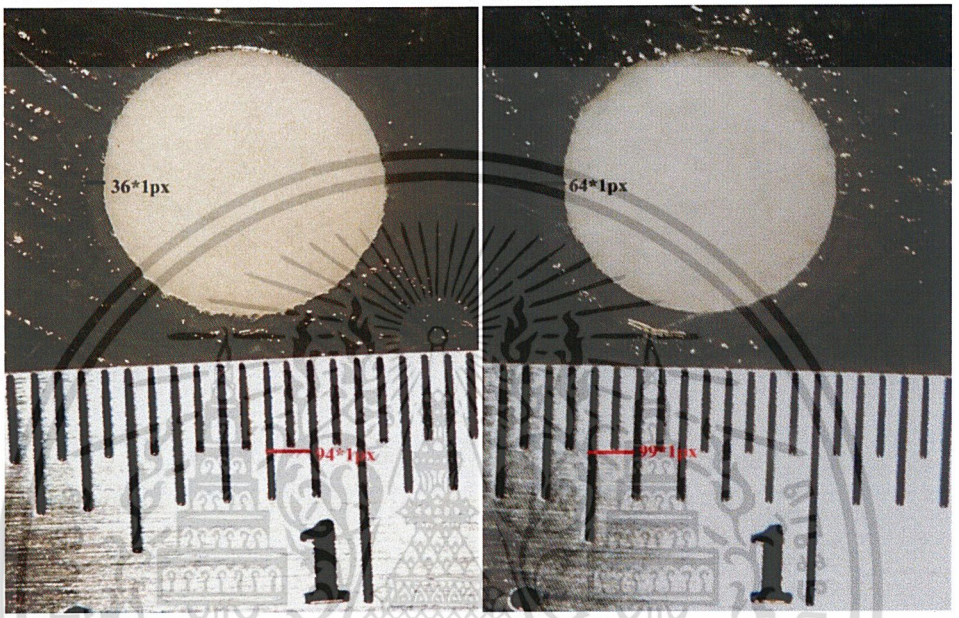
4.3.4 ผลการยับยั้งเชื้อ *Serratia sp.* ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.10 แสดงผลการยับยั้ง *Serratia sp.* ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.10 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์ดอลไคติน เปรียบเทียบกับผงไคติน ในการยับยั้งจุลินทรีย์ *Serratia sp.* พบว่าคอลลอยด์ดอลไคตินมีฤทธิ์ยับยั้ง *Serratia sp.* สูงสุดในวันที่ 5 โดยให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งได้สูงสุดในวันที่ 7 โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 0.47 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.11

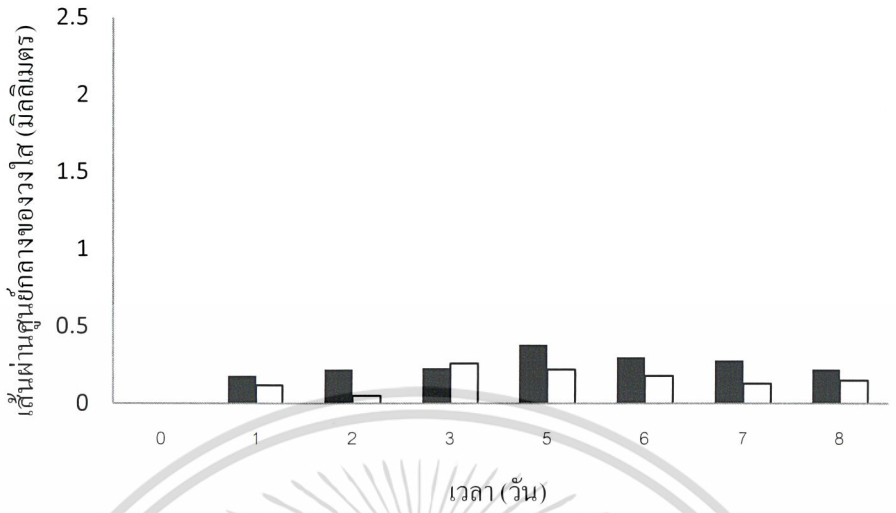


(ก) (ข)

รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Serratia sp.*ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5) และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

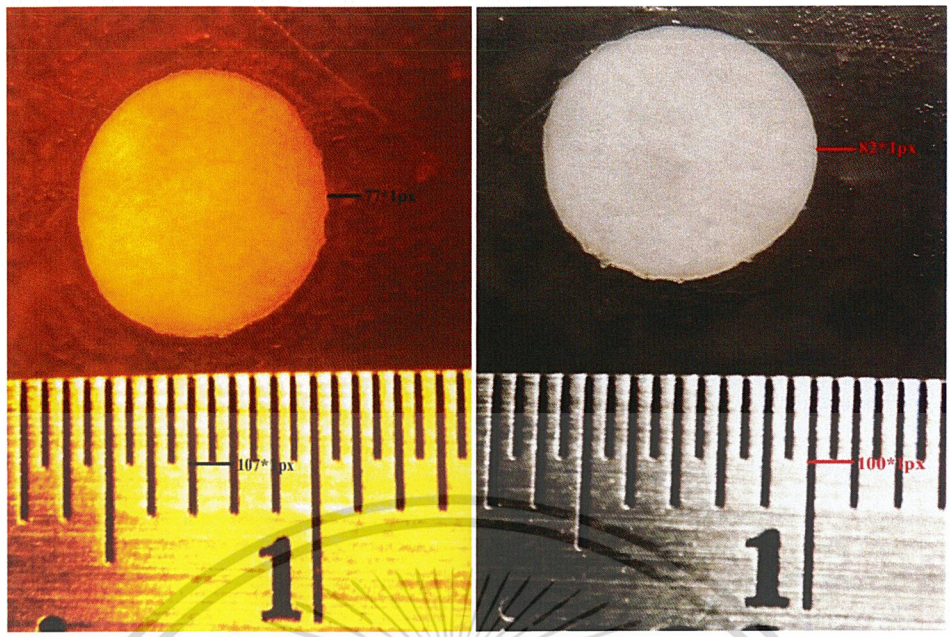
4.3.5 ผลการยับยั้งเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.12 แสดงผลการยับยั้ง *Candida utilis* TISTR 5001 ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์คอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จาก เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

จากรูป 4.12 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์คอลไคติน เปรียบเทียบกับผงไคติน ในการยับยั้งเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 พบว่าคอลลอยด์คอลไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดในวันที่ 5 โดยให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.38 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งได้สูงสุดในวันที่ 3 โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.26 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13

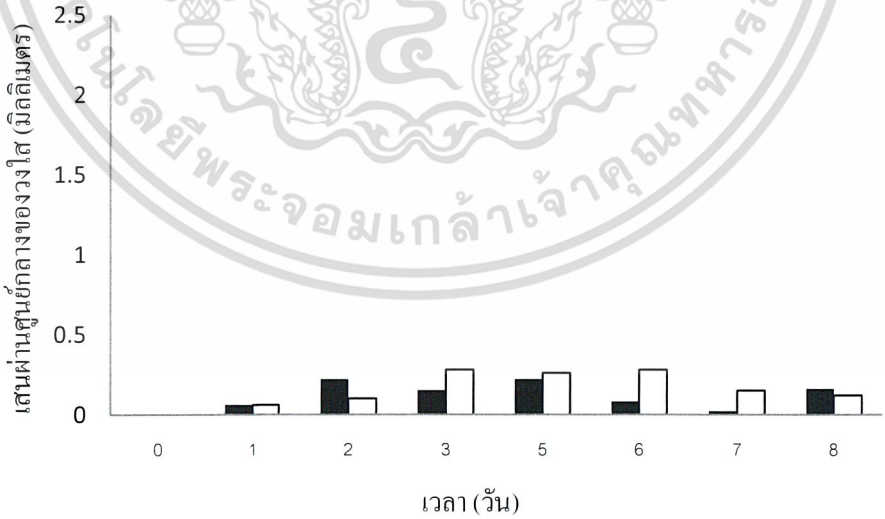
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida utilis* TISTR 5001 ของไคโตโอลิโกเมอร์ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 5) และอาหารผงไคติน (ข) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 3)

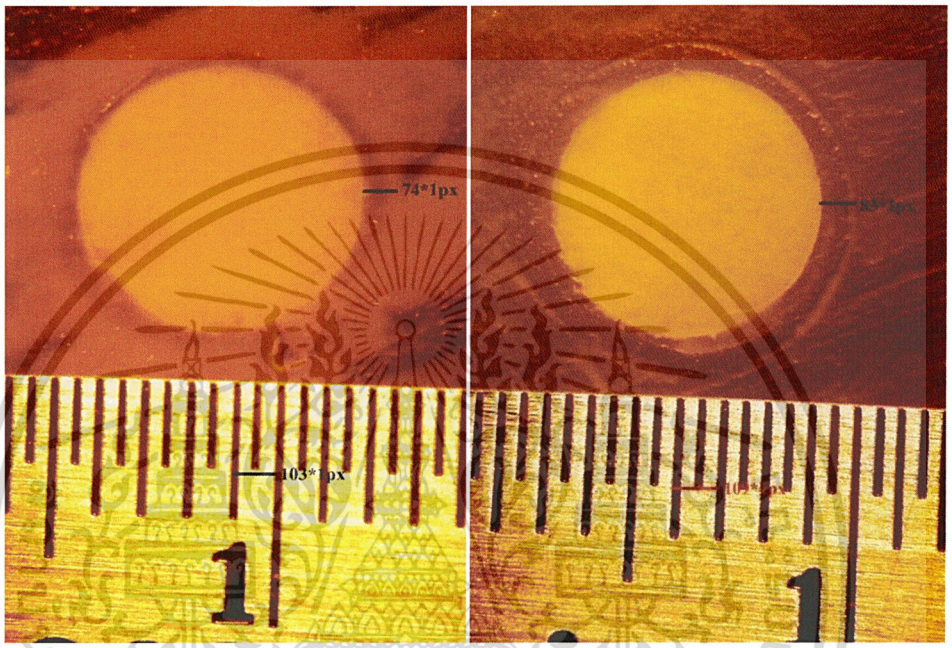
4.3.6 ผลการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์



รูปที่ 4.14 แสดงผลการยับยั้ง *Candida albicans* ของสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ที่เวลาต่างๆกันในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (■) และผงไคติน (□) จากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) (มิลลิเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูป 4.14 เมื่อพิจารณาสารละลายไคโตโอลิโกเมอร์ที่ถูกผลิตจากคอลลอยด์ดอลไคติน เปรียบเทียบกับผงไคติน ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* พบว่าคอลลอยด์ดอลไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดในวันที่ 2 และวันที่ 5 โดยให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.22 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งได้สูงสุดในวันที่ 3 และวันที่ 5 โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.28 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.15



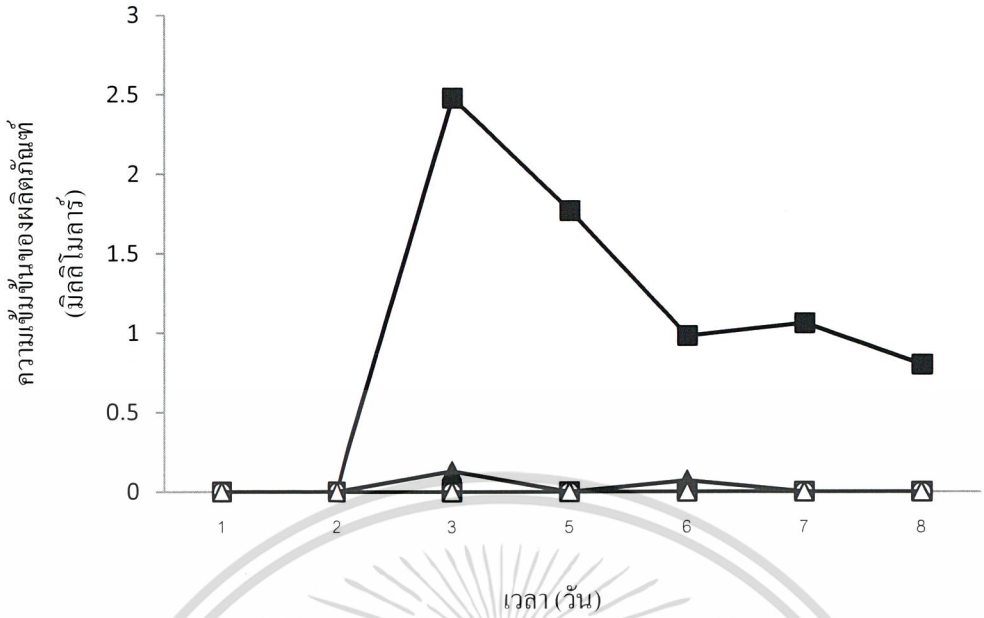
(ก) (ข)

รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะวงใส (clear zone) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน (ก) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 2, 5) และผงไคติน (ข) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (วันที่ 3, 5)

4.4 ผลการศึกษาการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหาร คอลลอยด์ดอลไคติน

การศึกษาการสะสมไคโตโอลิโกเมอร์โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารไคตินที่มีคอลลอยด์ดอลไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในอาหารคอลลอยด์ดอลไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี HPLC (ภาคผนวก ข.) พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.48 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 3) และไคโตเพนโตส 0.13 (วันที่ 3) ดังแสดงในรูปที่ 4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

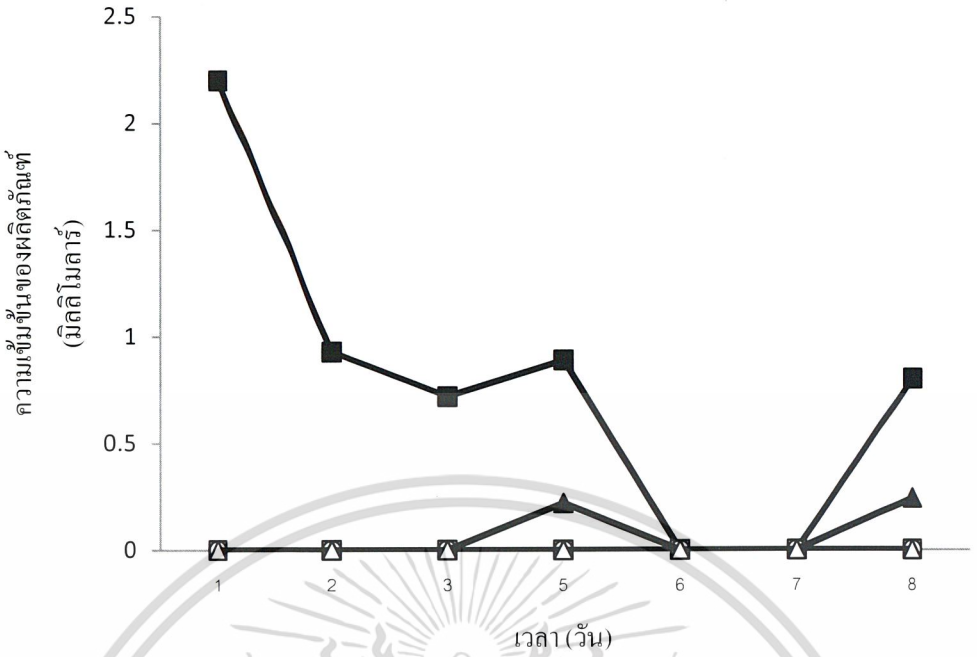


รูปที่ 4.16 แสดงการสะสมผลิตภัณฑ์ (■) เอนอะซิทิลกลูโคซามีน (□) ไคโตไบโอส (●) ไคโตไตรโอส (○) ไคโตเตโตรส (▲) ไคโตเพนโตส และ (△) ไคโตเฮกโซส ที่ได้จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลวที่มีคอลลอยด์คอลไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.5 ผลการศึกษาการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารผงไคติน

การศึกษาการสะสมไคโตโอลิโกเมอร์โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารไคตินที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในอาหารผงไคติน โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีHPLC (ภาคผนวก ข.) พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.20 มิลลิโมลาร์ (วันที่ 1) และไคโตเพนโตส 0.24 (วันที่ 8) ดังแสดงในรูปที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดงการสะสมผลิตภัณฑ์ (■) เอนอะซิทิลกลูโคซามีน (□) ไคโตไบโอส (●) ไคโตไตรโอส (○) ไคโตเตโตรส (▲) ไคโตเพนโตส และ (△) ไคโตเฮกโซส) ที่ได้จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลวที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวไคตินมีเดียม จากนั้นย้ายเชื้อแบคทีเรีย 6.1 ลงบนจานอาหารแข็งไคตินมีเดียมที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีโคโลนีเดี่ยวๆสีขาวขุ่น ลักษณะกลมขนาดเล็ก โค้งนูน มีเมือกเล็กน้อย และเมื่อนำไปศึกษารูปร่างด้วยการย้อมแกรม และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มีลักษณะเป็นรูปท่อน จะย้อมสีติดแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 ในอาหารเหลวไคตินมีเดียมที่มี
เปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส พบปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 10^7 เป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารไคตินมีเดียมที่มีคอลลอยด์คอลเป็นแหล่งคาร์บอนจากเริ่มต้น 6.98 เป็น 7.85 และในอาหารไคตินมีเดียมที่มีผงไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนพบการเปลี่ยนแปลงพีเอชจากเริ่มต้น 6.86 เป็น 7.83 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อวิเคราะห์น้ำหมักที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในอาหารคอลลอยด์คอลไคตินโดยเชื้อแบคทีเรียรหัส 6.1 มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.48 มิลลิโมลาร์และไคโตเพนโตส 0.13 มิลลิโมลาร์ ในอาหารผงไคติน พบการสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2.20 มิลลิโมลาร์ ไคโตเพนโตส 0.24 มิลลิโมลาร์

การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ผลิตจากคอลลอยด์คอลไคตินและผงไคตินจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) พบว่าไคโตโอลิโกเมอร์ที่ผลิตจากคอลลอยด์คอลไคตินและผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดังนี้ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 2.34 มิลลิเมตรและ1.35 มิลลิเมตร ตามลำดับ , *Staphylococcus aureus* ATCC 259d3 โดยคอลลอยด์คอลไคตินให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1.77 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.40 มิลลิเมตร, *Salmonella typhirecenium* DMST 0562 พบว่าคอลลอยด์คอลไคตินและผงไคตินให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ0.83 มิลลิเมตรและ 0.70 มิลลิเมตร ตามลำดับ, *Serratia sp.* พบว่าคอลลอยด์คอลไคตินให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.47 มิลลิเมตร และการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida utilis* TISTR 5001 พบว่าคอลลอย์ดอลไคตินให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.38 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินมีฤทธิ์ยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.26 มิลลิเมตร และ *Candida albicans* พบว่าคอลลอย์ดอลไคตินมีให้ผลการยับยั้งจากเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.22 มิลลิเมตร แต่ผงไคตินให้ผลการยับยั้งจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 0.28 มิลลิเมตร

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกเมอร์ที่ผลิตได้จากคอลลอย์ดอลไคตินและผงไคตินที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการนำไคโตโอลิโกเมอร์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น การไปขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม การใช้เป็นตัวขนส่งยา และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ
3. ควรมีการศึกษาการผลิตไคโตโอลิโกเมอร์จากแหล่งไคตินชนิดอื่นๆ เช่น แกนปลาหมึก กระดองปู เส้นใยเชื้อรา เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ เชาวลิตสุขุมาวาสี. 2544. ประสิทธิภาพของไคโตซานโอลิโกเมอร์และพอลิเมอร์จากแหล่งต่างๆ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐิติมา สุขมาก. 2550. ประสิทธิภาพของไคโตซานออลิโกเมอร์และพอลิเมอร์จากแหล่งต่างๆ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, 3 - 5 กุมภาพันธ์ 2010, กรุงเทพมหานคร.

ธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2547. การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active cell และ Resting cell.วิทยานิพนธ์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. จุลชีววิทยาทางอาหาร.มหาวิทยาลัยทักษิณ. หน้า 12-35.

นันทนา นิ่มเจริญนิยม.2542. การผลิตและการทำไคตินดีอะเซทิลเลสจาก *Rhizopus oligosporus* NSI ให้บริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์. 2542. การผลิตและคุณสมบัติของไคโตซานจากจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รังสิมา สูตรอนันต์.2542.การยับยั้งแบคทีเรียของสารผสมไคแซคคาร์ไรด์จากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา.

ภาวดี เมธะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟูชาติ และ ก้องเกียรติ คงสุวรรณ.2543. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน. MTECH เมษายน-มิถุนายน. หน้า 69-75.

ภาวดี เมธะคานนท์, สุรพิชญ ลอยกุลนันท์ และ ปวีณา อุปนันต์.2550.ความเป็นไปได้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ของไคโตซานโอลิโกเมอร์และอนุพันธ์. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สุวบุญ จิรชาญชัย. 2544. การผลิตไคติน-ไคโตซาน. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 11-40

อังคณา โทการกุล. 2540. การแยกเชื้อยีสต์ที่มีเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

A.K.Bledzki and J.Gassan. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibers, Prog. Polym. Sci.,24, 1999,221-274

Cheng,C.Y. and Li, Y. 2000. An Aspergillus chitosanase with protential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnol.Appl.Biochem**.32: 197-203

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chao-Ming Shih a, Yeong-Tarng Shieh band Yawo-Kuo Twu a.2009.Preparation and characterization of cellulose/chitosan blend films.Carbohydrate Polymers 78: 169–174

Dong, T.M., Chuang, C.L. and Chiu,W.Y. 2002. Studies on the Degradation Behavior of Chitosan-g-Poly(acrylic acid) Copolymers. *J.of Science and Engineering*. 5, 235-240.

F.Devliehere , A. Vermeulen , J. Debrvere.2004. Chitosan: antimicrobial activity, interaction with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiology 21: 703-714

J. Simunek ,G. Tishchenko ,B. Hodrova, H.Bartonova.2006.Effect of chitosan on the growth of human bacteria.Folia Microbiol 51(4), 306-308

Houston, D.R., K., Arai.,Omura, S., Peter, M.G., Turberg, A., Synstad, B., Eijsink, V.G.H. and Aalten, D.M.F. 2002. "High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors : Mimicry of carbohydrate substrate." PNAS. 99(14) : 9127-9132.

Knorr,D. 1984. Use of chitinous polymer in food. Food Technol. 38:85-97

Krairak, S. and Budda. 2002." The Production of Short Chitin Oligomer by Chitinolytic Microorganism.'' P. 60.in5th **Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition**. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.

Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin. Pergamon Press. New York. Patent Abatracts of Japan(1988). 55-181

Pranee Lertsutthiwong.2002. Chitosan as a dry strength agent for paper. Appita Jornal.55(3): 208-212

Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Sukwattanasinitt, M.,Pichyangkura, R. and Aiba, S.I. 2003. "Enzymatic production of N-acetyl-D-dlucosamine from chitin degradation studynto N-acetyl chitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes" Carbohydrate Polymers. 51(1) : 391-395.

S. Tripathi, G.K. Mehrotraand P.K. Dutta. 2009. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications.Carbohydrate Polymers 79: 711–716.

[Online].Available:http:http://www.fibersource.com/f-tutor/chitin.htm (24 พฤศจิกายน 2553)

[Online].Available:http: http://www.fibersource.com/f-tutor/cellulose.htm (24 พฤศจิกายน 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available:http:http: http//www.iboro.ac.uk/department/project/2002 (24 พฤศจิกายน 2553)

[Online].Available:http:http: : http//www.iboro.ac.uk/department/cg/project/2002 (24 พฤศจิกายน 2553)

[Online].Available:httphttp://www.seikagakubb.co.jp/bio/cgibin/search/ndetail.php?code=40042 (10 กุมภาพันธ์ 2554)

[Online].Available:http: http://www.kitchenzones.com/food-poisoning/e-coli/What-Is-EColi.html (28 มีนาคม 2554)

[Online].Available:http : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1079 (28 มีนาคม 2554)

[Online].Available:http : http://en.wikipedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_VISA_2.jpg (31 มีนาคม 2554)

[Online].Available:http : http://th.asiaonline.com/en/article?article=Serratia_marcescens (28 มีนาคม 2554)

[Online].Available:http : http://52070145.exteen.com (28 มีนาคม 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารไคตินมีเดียม(ดัดแปลงจาก Krairak and Budda. 2002)

ประกอบด้วย

ผงคอลลอยย์ดอลไคติน	1.0	กรัม
ยีสต์สกัด	0.1	กรัม
เปปโตน	0.5	กรัม

ชั่งผงคอลลอยย์ดอลไคติน ยีสต์สกัด และเปปโตน ใส่ในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เวลา 15 นาที

อาหารแข็งไคตินมีเดียม(ดัดแปลงจาก Krairak and Budda. 2002)

ประกอบด้วย

ผงคอลลอยย์ดอลไคติน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	1	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ±0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

Nutrient broth (NB)	13.0	กรัม
วุ้น	30.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ±0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารเคมีที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างในการละลายไคติน

เตรียมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.0 โมลาร์ โดยละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 56.11 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

อะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์

อะซิโตไนไตรล์	700	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน (Deionization water)	300	มิลลิลิตร

ผสมแล้วกรองผ่านเมมแบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (ธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีทดสอบและการวิเคราะห์

1.การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

การย้อมแกรมแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองที่มีอาหารแข็งนิวเทรียน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สเมียร์ (smear) เซลล์แบคทีเรียบนสไลด์ และตรึงเซลล์ (fixing) เซลล์โดยผ่านเปลวไฟ 2 ถึง 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วยสีย้อมคริสตัลไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที ย้อมทับด้วยสีย้อมแกรมไอโอดีน เป็นเวลา 1 นาที ล้างเบาๆด้วยน้ำ ย้อมซ้ำด้วยสีซาฟรานีน-โอ (safranin-O) เป็นเวลา 60 วินาที ล้างเบาๆด้วยน้ำอีกครั้ง ซับด้วยกระดาษหรือวางเอียง 45 องศา ปล่อยไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 × 100 เท่า

2.วิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์และสับสเตรท

การวิเคราะห์ปริมาณไคโตโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส 3 ส่วนผสมกับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ คอลัมน์ Asahipak Shodex NH2P-50 4E โดยมีอะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock solution)

เตรียมสารละลานมาตรฐานเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนความเข้มข้น 10 มิลลิโลลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 20.42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไคโตไบโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตไบโอส 42.46 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลายไคโตไตรโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตไตรโอส 62.76 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไคโตเตตระโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตเตตระโอส 8.31 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไคโตเพนโตสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตเพนโอส 10.34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไคโตเฮกซะโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งไคโตเฮกซะโอส 12.37 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตร เป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อที่ 1. แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

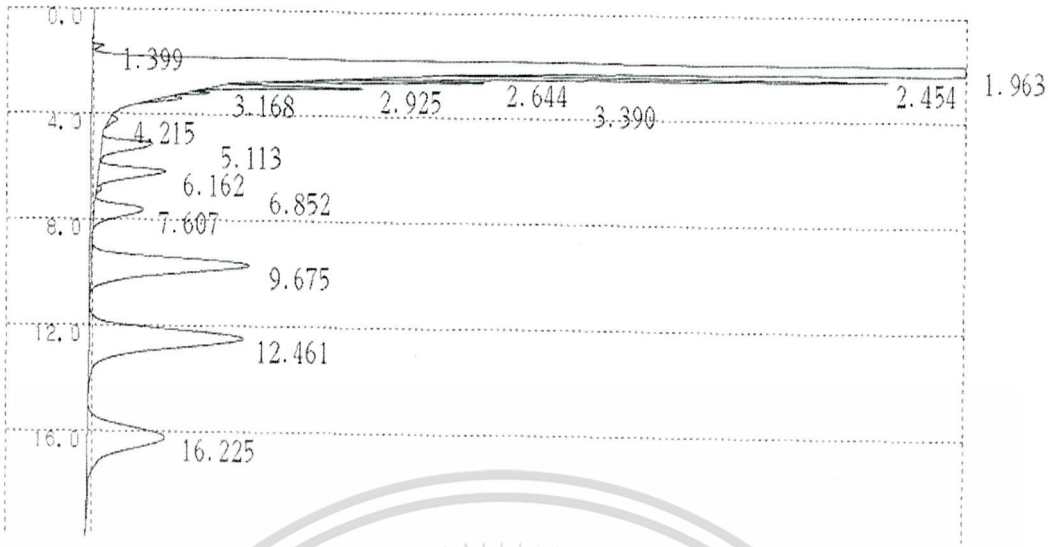
3. ผสมสารละลายมาตราฐานที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 3 ส่วน กับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน

4. กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

5. วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

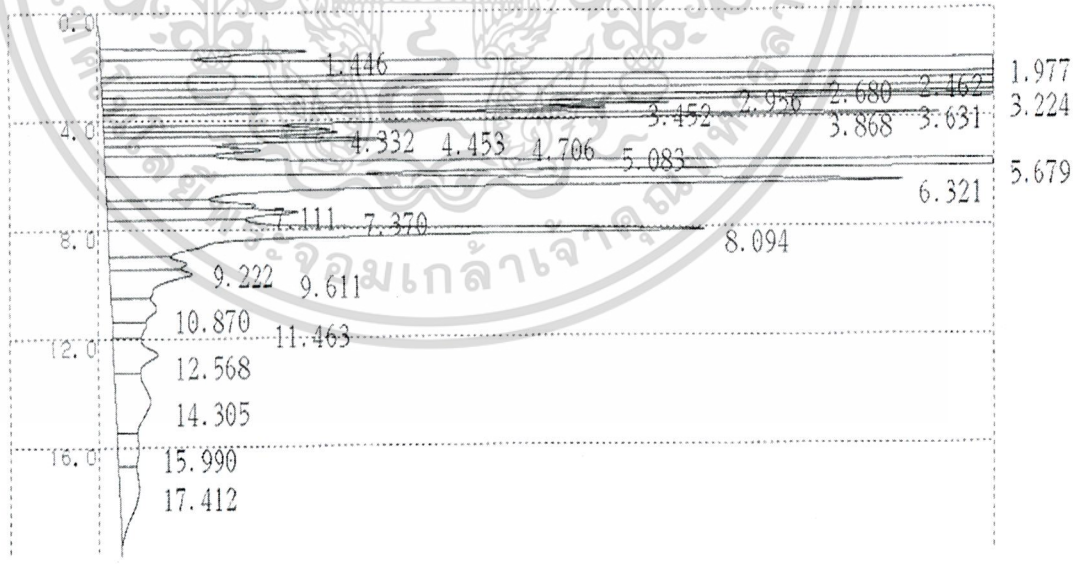
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



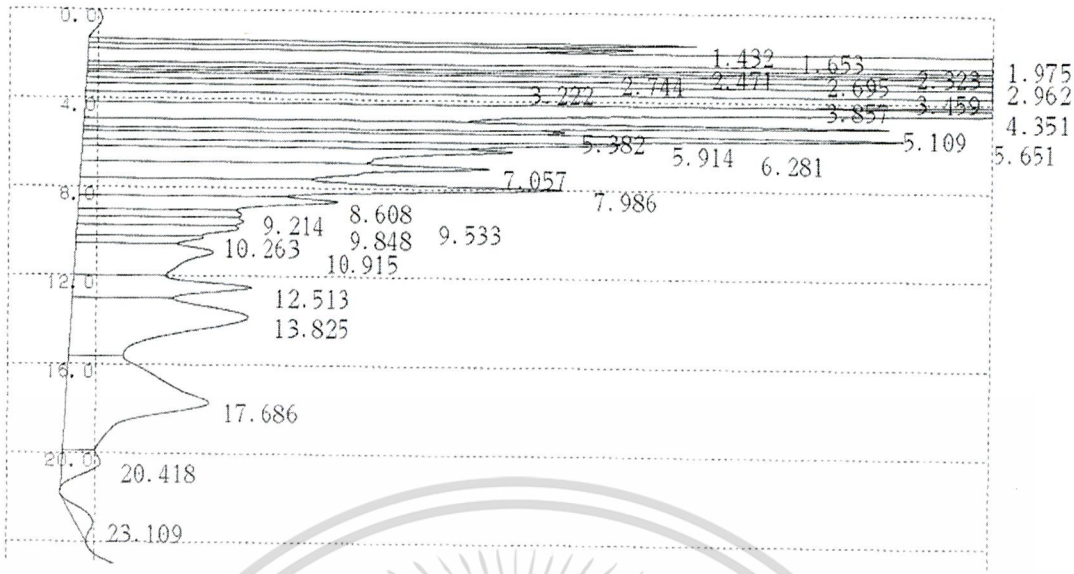
รูปที่ ข.1 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.113 นาที) ไคโตไบโอส (6.162 นาที) ไคโตไตรโอส (7.607 นาที) ไคโตเตโตรส (9.675 นาที) ไคโตเพนโตส (12.461 นาที) ไคโตเฮกโซส (16.225 นาที)

ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์การสะสมเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกเมอร์ด้วยวิธี HPLC

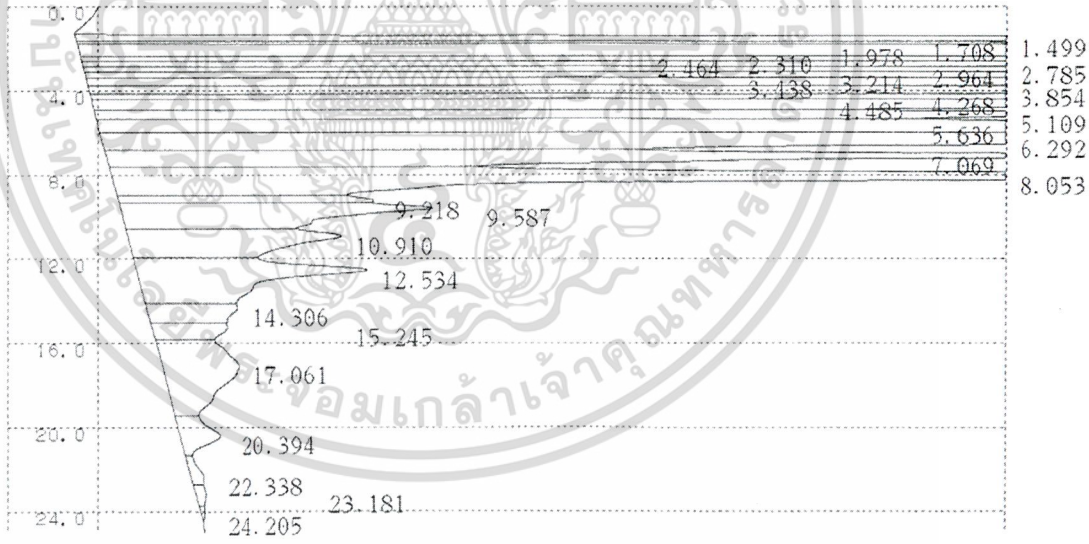


รูปที่ ข.2 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.083นาที) ไคโตเพนโตส (12.568 นาที) ในอาหารคอลลอยด์ดอลไคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

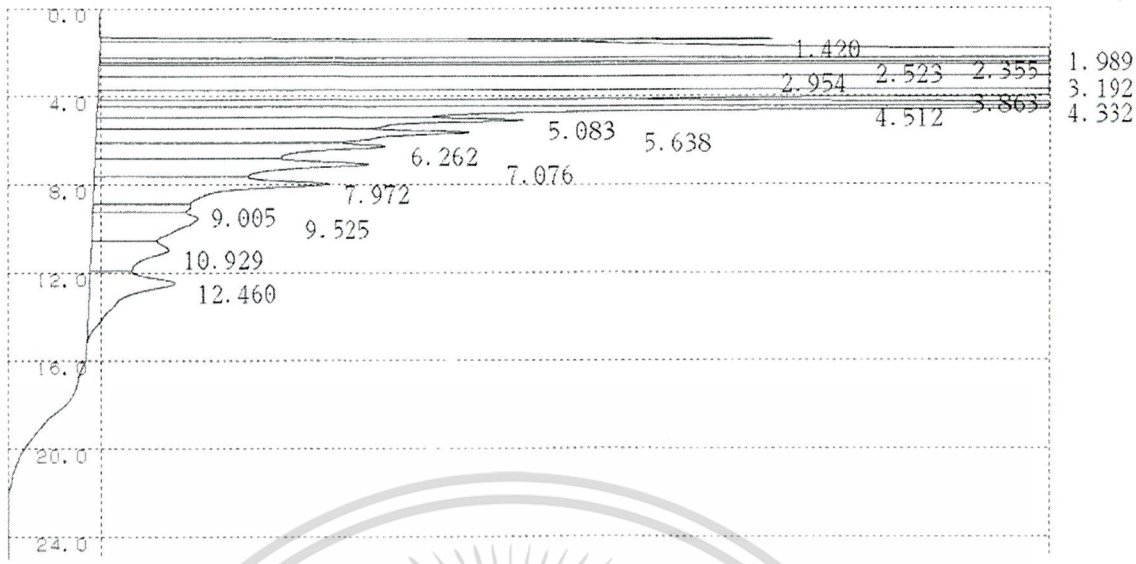


รูปที่ ข.3 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.109 นาที) ในอาหารคอลลอย์ดอลไคติน



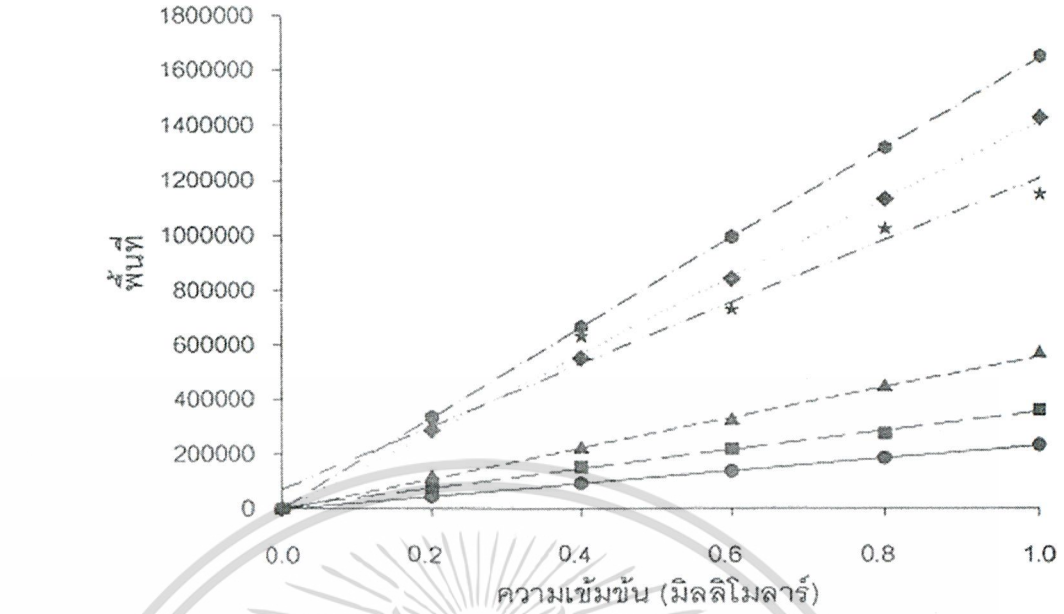
รูปที่ ข.4 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน (5.109 นาที) ในอาหารผงไคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.5 แสดงเวลารีเทนชัน (Retention time) ของไคโตเพนโตส (12.460 นาที) ในอาหารผงไคติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอน-อะซิทิลกลูโคซามีน	สมการเส้นตรง	(Y) = 229477(X) – 1373
		R^2 = 0.9997
ไคโตไบโอส	สมการเส้นตรง	(Y) = 346742(X) + 5892
		R^2 = 0.9969
ไคโตไตรโอส	สมการเส้นตรง	(Y) = 556925(X) - 3067
		R^2 = 0.9983
ไคโตเตตระโอส	สมการเส้นตรง	(Y) = 1427125(X) - 7232
		R^2 = 0.9996
ไคโตเพนโตส	สมการเส้นตรง	(Y) = 1653704(X) + 1401
		R^2 = 1.0000
ไคโตเฮกซะโอส	สมการเส้นตรง	(Y) = 1139208(X) - 72114
		R^2 = 0.9769

รูปที่ ข.6 แสดงกราฟมาตรฐานของเอนอะซิทิลกลูโคซามีนและไคตินโอลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่โดยวิธี HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้