การผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า(เซลลูเลสและเพคทิเนส) และผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

Production of Chitooligosaccharides from Shrimp Shells Using Commercial Enzyme (Cellulase and Pectinase) and Its Effect on Antimicrobial Activity

สมาพร บุญวิเศษ[1] และ ทานตะวัน พิรักษ์[1]

Samaporn Boonviset[1] and Tantawan Pirak[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (COS) จากการไฮโดรไลซิสสายไคโตซานด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือ เซลลูเลสและเพคทิเนส โดยแปร pH ของสภาวะที่ศึกษาเป็น 4.0 4.5 และ 5.0 และ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานเท่ากับ 1:1 1:2 และ 1:4 สำหรับเพคทิเนส และ 1:2 1:3 และ 1:4 สำหรับเซลลูเลส เก็บตัวอย่างหลังบ่มที่ 50 °C 180 นาที พบว่าเพคทิเนสให้ COS ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) สูงและร้อยละผลผลิตสูงสุด โดยสภาวะการผลิตที่ให้ MWและร้อยละผลผลิตสูงสุด (1.91×10^5 Da และ 97.35%) คือ pH 4.5 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน 1:4 ในขณะที่เซลลูเลสจะตัดสายไคโตซานได้จำเพาะ เป็นผลให้ COS ที่ได้มี MW ต่ำกว่า แต่ส่งผลให้ร้อยละผลผลิตที่ได้ต่ำลงด้วย และสภาวะที่ให้ MW ต่ำสุด (1.08×10^4 Da) คือ สภาวะการผลิตด้วยเซลลูเลส ที่ pH 4.0 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน 1:2 ปัจจัยที่ศึกษาไม่มีผลต่อ aw ของ COS ที่ผลิตได้ ($p<0.05$) การทดสอบด้วยวิธี disc diffusion แสดงให้เห็นว่า COS ที่ผลิตด้วยเพคทิเนสสามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella thyphimurium* ได้ดี ในขณะที่ COS ที่ผลิตด้วยเซลลูเลสสามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดี

ABSTARCT

This research investigated the optimal condition for producing chitooliogosaccharide (COS) by enzymatic hydrolysis of chitosan with commercial enzyme (cellulase and pectinase). The system pH was varied at 4.0, 4.5 and 5.0 and the weight ratio of enzyme to chitosan was varied at 1:2 1:3 and 1:4 for cellulase and 1:1 1:2 and 1:4 for pectinase, respectively. Samples were incubated at 50 °C for 180 min. The production with pectinase resulted in COS with higher MW and yield, when comparing with cellulase production. Pectinase production at pH 4.5 and the weight ratio at 1:4 yielded COS with the highest MW (MW = 1.91×10^5 Da) and yield (97.35%). In contrast, cellulase was able to hydrolyze chitosan chain specifically, which resulted in COS with low MW and yield. COS with lowest MW (1.08×10^4 Da) was obtained from cellulase hydrolysis at pH 4.0 and the weight ratio at 1:2. The results showed that all factors studied were not significantly affected aw of COS ($p<0.05$). The disc diffusion results revealed antimicrobial activity of COS. The retardation of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Salmonella thyphimurium* was obtained from pectinase hydrolysis, while the retardation of *Escherichia coli* was received from COS produced with cellulase.

Key Words: Chitooligosaccharide, Hydrolysis , Commercial Enzyme, Cellulase, Pectinase

e-mail address: glay2me@hotmail.com

[1] ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok, 10900

คำนำ

ในแต่ละปีอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีการผลิตและส่งออกเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้มีกากของเหลือจากการผลิต เช่น เปลือกกุ้ง ในปริมาณสูง แนวทางหนึ่งในการแปรรูปกากของเหลือให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น โดยการแปรรูปเป็น ไคติน ไคโตซาน (สุพจน์ และคณะ, 2546) และอนุพันธ์ของไคโตซาน ไคตินและไคโตซานสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหาร เครื่องสำอาง เวชภัณฑ์ การเกษตร สิ่งแวดล้อม การบำบัดน้ำเสีย (Kim and Rajapakse, 2005) อุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษ และด้านการแพทย์ เป็นต้น

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharides, COS) จัดเป็นอนุพันธ์หนึ่งของไคโตซาน โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้านเช่น การเป็นสารยับยั้งแบคทีเรียในอาหาร สารต่อต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง และยังมีฤทธิ์ในการสร้างภูมิต้านทาน เป็นต้น (Park *et al*., 2004) สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารมีการวิจัยนำ COS มาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น เต้าหู้ (Kim and Han, 2002) ไส้กรอกหมู (Jo *et al*., 2001) เนื้อกวางขึ้นรูป (ขวัญสุดา, 2547) และซูริมิ (Benjakul *et al*., 2000) COS สามารถผลิตได้ด้วยวิธีทางเคมีโดยตัดสายพันธะด้วยกรด หรือด้วยเอนไซม์ (Jung *et al*., 2007) โดยการใช้กรดจะก่อให้เกิดของเสียที่มีพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม (Sashiwa *et al*., 2002) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต COS จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดคือ เซลลูเลส (Cellulast®) และเพคทิเนส (Pectinex®) เพื่อให้ได้สภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตสูงและต้นทุนการผลิตต่ำสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรได้อย่างเหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้

เปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาดได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ต้าหมิง เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด จ.สมุทรสาคร สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็น Analytical grade ยกเว้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในขั้นตอน กำจัดหมูอะซิทิลออก (deacetylation) และ 95% ethanol ใช้เป็น Commercial grade ส่วนเอนไซม์เซลลูเลส(Cellulast® 1.5 L) และเพคทิเนส (Pectinex® Ultra SP-L) ยี่ห้อ Novozymes® ในการศึกษาสภาวะในการตัดสายพันธะไคโตซานเป็นเอนไซม์ทางการค้า

วิธีการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

สกัดแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2 ครั้ง) แยกแร่ธาตุต่างๆ ออก โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2 ครั้ง) ได้ไคติน จากนั้นนำไคติน แช่ใน 95% ethanol ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อสกัดสีออก และในขั้นตอนสุดท้ายกำจัดหมู่อะซิทิลออกจากสายโมเลกุลของไคตินโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% w/w ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง และแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50% w/w อีกครั้งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Tolaimate *et al*., 2003 และ Kachanechai *et al*. 2008) จากนั้นวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุล (MW), Percent Degree of Deacetylation (%DD), ค่าร้อยละความชื้น (%MC) Water activity (aw) ของไคโตซานที่ผลิตได้ และคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ (%Yield)

การศึกษาสภาวะในการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เพคทิเนส

เตรียม Chitosan stock solution ความเข้มข้น1% โดยน้ำหนัก ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัพเฟอร์ pH 4.0, 4.5 และ 5.0 จากนั้นเติมเอนไซม์ตามอัตราส่วนที่แปร (1:2, 1:3 และ 1:4 สำหรับเอนไซม์เซลลูเลส และ 1:1, 1:2 และ 1:4 สำหรับเอนไซม์เพคทิเนส) นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C ใน shaker waterbath เก็บตัวอย่างที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 180 นาที จากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการยุติการทำงานของเอนไซม์ ตกตะกอน COS โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ลงในสารละลายที่ได้ 10% โดยน้ำหนัก จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ COS ที่มี pH 7.0 เก็บตัวอย่างของแข็งผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ และวิเคราะห์ MW และ aw

การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion test

นำไคโตซานและ COS ที่ผลิตได้มาทำการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion test (อุดมลักษณ์, ม.ป.ป. อ้างอิงโดย วลัยรัตน์, ม.ม.ป.) ซึ่งทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis* และ แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* เปรียบเทียบกับสารละลาย 1% acetic acid ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย COS

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 2x3x3 Factorial in CRD นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าคุณภาพ มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Dancan ตามแผนการทดลอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 12.0

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งซึ่งขั้นตอนในการเตรียมโดยเริ่มจากการนำเอาเปลือกกุ้งมาสกัดแยกโปรตีนออก การสกัดแร่ธาตุออก การสกัดสี และการกำจัดหมู่อะซิติลโดยได้ดัดแปลงตามวิธีของ Tolaimate *et al*. (2003) และ Kachanechai *et al*. (2008) พบว่า ไคโตซานที่เตรียมได้มี MW 3.62 x 10^5 Daltons และ %DD เท่ากับ 100% ความชื้น เท่ากับ 13.07% ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 76.5 และ aw เป็น 0.521 (Table 1) ศิริกรณ์ (2545) ได้กล่าวว่า สภาวะที่แตกต่างกันในการเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งมีผลต่อคุณสมบัติของไคโตซานที่เตรียมได้ ซึ่งไคโตซานที่เตรียมได้นี้จะนำไปเป็นไคโตซานที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเพคทิเนสต่อไป

ผลการศึกษาสภาวะในการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เพคทิเนส

จากการศึกษาสภาวะในการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเพคทิเนสเพื่อให้ได้ COS พบว่า COS ที่ผลิตได้จากเอนไซม์เซลลูเลสจะมี MW ต่ำกว่า COS ที่ผลิตได้จากเอนไซม์เพคทิเนส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถตัดสายพันธะของไคโตซานได้ดีกว่าเอนไซม์เพคทิเนส ปัจจัยที่ศึกษาทั้ง pH และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน ส่งผลต่อ MW ของ COS ที่ได้รับ โดยสภาวะที่ใช้ COS ที่มี MW สูงที่สุดคือ สภาวะที่ใช้เอนไซม์เพคทิเนส pH ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ 4.5 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน 1:4 (MW = 19.10x10^4 Da) และ COS ที่มี MW ต่ำสุดคือ COS ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

pH ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ 4.0 และ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซาน 1:2 (MW = 1.08×10^4 Da) (Figure 1 and 2)

Table 1 Properties of the Obtained Chitosan

Properties	
Moleculer weight(Daltons)	3.62×10^5
Percent Degree of Deacetylation (%DD)	100
Moisture Content(%)	13.07
Yield(%)	76.5
Water activity(aw)	0.521

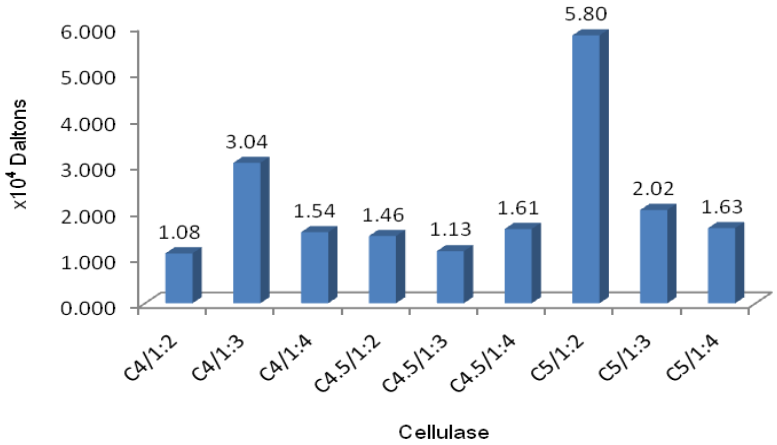

Figure 1 Molecular Weight of Chitooligosaccharides Hydrolyzed by Cellulase at pH 4.0, 4.5 and 5.0 and ratio of enzyme:chitosan were 1:2, 1:3 and 1:4.

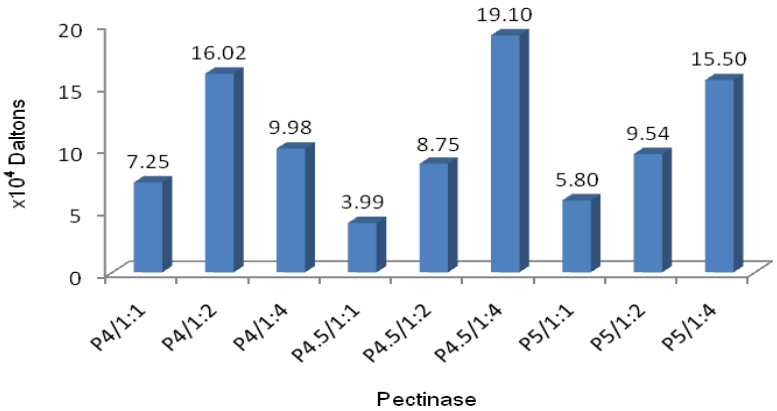

Figure 2 Molecular Weight of Chitooligosaccharides Hydrolyzed by Pectinase at pH 4.0, 4.5 and 5.0, ratio of enzyme:chitosan were 1:1, 1:2 and 1:4.

ผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า aw ของ COS ทุกตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) บ่งชี้ว่าสภาวะที่ศึกษาไม่มีผลต่อค่า aw ซึ่งอาจเนื่องมากจากวิธีการที่ทำให้ COS แห้งในแต่ละสภาวะนั้นเป็นวิธีเดียวกัน โดยค่า aw จะอยู่ระหว่าง 0.565-0.579 สำหรับผลของร้อยละผลผลิตของ COS ที่ผลิตได้พบว่า การผลิต COS ด้วยเอนไซม์เพคทิเนสให้ร้อยละของผลผลิตที่สูงกว่าการผลิตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่ง pH

ของโซเดียมอะซิเตทบัพเฟอร์และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานไม่มีผลต่อร้อยละของผลผลิต สำหรับ COS ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เพคทิเนสพบว่า การเพิ่มขึ้นของ pH ของโซเดียมอะซิเตทบัพเฟอร์จาก 4.0 เป็น 4.5 และ 5.0 จะทำให้ร้อยละผลผลิตลดต่ำลง ดังนั้นสภาวะที่ทำให้ผลิต COS ได้มากที่สุดคือ สภาวะที่ใช้เอนไซม์เพคทิเนสที่ pH ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ pH 4.5 และอัตราส่วนเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:4 ซึ่งทำให้ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 97.35 และสภาวะที่ผลิต COS ได้น้อยที่สุดคือ สภาวะที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลส pH ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ pH 5.0 และอัตราส่วนเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:3 ซึ่งได้ร้อยละของการผลิตเป็น 5.85 จากการศึกษาของ Sashiwa *et al.* (2003) ที่ได้มีการใช้เอนไซม์ เช่น ไลเปส เฮมิเซลลูเลส เซลลูเลส และเพคทิเนส ในการผลิตเอ็นอะซิทิลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า ปัจจัยของการใช้เอนไซม์ และสภาวะในการผลิตที่แตกต่าง จะมีผลทำให้ค่าร้อยละการผลิตที่แตกต่างกัน โดยการใช้เอนไซม์เพคทิเนสจะทำให้ได้ร้อยละของการผลิตมากกว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้

Table 2 The aw and yield(%) of the obtained COS.

Condition			aw^{ns}	%yield
	pH	Enz : Chitosan		
Cellulase	4.0	1:2	0.570±0.004	62.75^{b}
		1:3	0.565±0.001	68.85^{b}
		1:4	0.570±0.009	63.55^{b}
Cellulase	4.5	1:2	0.569±0.004	36.95^{cd}
		1:3	0.577±0.003	35.25^{cd}
		1:4	0.569±0.011	21.55^{d}
Cellulase	5.0	1:2	0.571±0.001	21.10^{d}
		1:3	0.573±0.006	**5.85^{d}**
		1:4	0.570±0.013	10.95^{d}
Pectinase	4.0	1:1	0.567±0.004	92.95^{a}
		1:2	0.569±0.001	95.30^{a}
		1:4	0.569±0.004	98.00^{a}
Pectinase	4.5	1:1	0.566±0.003	68.00^{b}
		1:2	0.574±0.007	78.55^{a}
		1:4	0.568±0.003	**97.35^{a}**
Pectinase	5.0	1:1	0.565±0.002	92.95^{a}
		1:2	0.568±0.005	91.85^{a}
		1:4	0.572±0.007	90.45^{a}

^{ns} means in the same column were not significantly different .

$^{a-d}$means followed by different lower case letters indicate significant difference. ($p<0.05$)

Table 3 The clear zone diameter (mm) of all COS samples obtained from disc diffusion test.

Condition			Disc diffusion test (mm.)			
			Gram Positive		Gram Negative	
	pH	Enz : Chitosan	*S. aureus*	*Strep. faecalis*	*E. coli*	*Sal. typhimurium*
Chitosan			7.00^{ijk}±0.00	8.50^{cdef}±0.71	6.75^{klm}±0.35	7.50^{efg}±0.71
Acetic acid			6.00^{p}±0.00	7.15^{hij}±0.92	6.90^{jkl}±0.85	6.00^{p}±0.00
Cellulase	4.0	1:2	7.75^{def}±0.35	8.20^{efgh}±0.85	8.75^{cde}±0.35	7.00^{ijk}±0.00
		1:3	6.30^{nop}±0.28	6.75^{jlm}±0.35	8.50^{cdef}±0.71	7.50^{efg}±0.71
		1:4	6.55^{lmn}±0.64	7.00^{ijk}±0.00	**11.75^{a}±0.35**	6.75^{klm}±0.35
Cellulase	4.5	1:2	6.65^{lmn}±0.49	6.75^{klm}±0.35	7.00^{ijk}±0.00	8.40^{cdefg}±0.85
		1:3	6.30^{nop}±0.28	6.25^{nop}±0.35	8.15^{efgh}±0.92	6.15^{op}±0.21
		1:4	7.50^{efg}±0.71	6.10^{op}±0.00	6.75^{klm}±0.35	8.5^{cdef}±0.71
Cellulase	5.0	1:2	6.35^{mnop}±0.21	6.15^{op}±0.07	7.00^{ijk}±0.00	6.55^{lmn}±0.64
		1:3	6.50^{lmn}±0.00	6.50^{lmn}±0.71	7.00^{ijk}±0.00	8.50^{cdef}±0.71
		1:4	6.80^{klm}±0.71	6.20^{nop}±0.14	6.15^{op}±0.07	6.50^{lmn}±0.00
Pectinase	4.0	1:1	7.50^{efg}±0.71	6.16^{op}±0.06	8.50^{cdef}±0.71	8.75^{cde}±0.35
		1:2	7.50^{efg}±0.71	7.00^{ijk}±0.71	6.65^{lmn}±0.49	7.25^{ghi}±0.35
		1:4	8.65^{cdef}±0.49	7.00^{ijk}±0.71	6.50^{lmn}±0.00	8.15^{efgh}±0.92
Pectinase	4.5	1:1	7.75^{def}±0.35	6.75^{klm}±0.35	6.75^{klm}±0.35	**10.50^{bc}±0.71**
		1:2	7.65^{efg}±0.21	8.00^{efgh}±0.71	9.00^{cd}±0.00	9.30^{c}±0.99
		1:4	7.10^{hij}±0.14	8.50^{cdef}±0.71	10.5^{bc}±0.71	7.35^{fgh}±0.92
Pectinase	5.0	1:1	**10.75^{ab}±1.06**	**9.30^{c}±0.71**	8.75^{cde}±0.35	8.25^{efgh}±0.35
		1:2	7.75^{def}±0.35	8.00^{efgh}±0.00	7.00^{ijk}±0.00	7.50^{efg}±0.00
		1:4	7.25^{ghi}±0.35	7.50^{efg}±0.71	6.75^{klm}±0.35	6.90^{jkl}±0.85

$^{a-p}$means followed by different lower case letters indicate significant difference. ($p<0.05$)

ผลการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion test

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion test ซึ่งทดสอบด้วยเชื้อ *S. aureus*, *Strep. faecalis, E. coli* และ *Sal. thyphimurium* เปรียบเทียบกับสารละลาย 1% acetic acid พบว่า COS ที่สกัดได้จากสภาวะที่ใช้เอนไซม์เพคทิเนสที่ pH ของสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ 5.0 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:1 มีความสามารถในการต้านทานเชื้อ *S. aureus* และ *Strep. faecalis* มากที่สุดเนื่องจากทำให้เกิด clear zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้างที่สุดเท่ากับ 10.75±1.061 และ 9.30±0.707 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *E. coli* COS ที่ผลิตได้จากสภาวะที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ pH ของสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ 4.0 และอัตราส่วนโดยน้ำหนัก

ของเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:4 จะมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด ทำให้เกิด clear zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.75±0.354 มิลลิเมตร และสำหรับเชื้อ *Sal. thyphimurium* พบว่าสภาวะที่ใช้เอนไซม์เพคทิเนสที่ pH ของสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ 4.5 และอัตราส่วนเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:1 จะมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อดังกล่าวได้ดีที่สุดซึ่งทำให้เกิด clear zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง 10.50±0.707 มิลลิเมตร จากการทดลองจะเห็นได้ว่า COS ที่ด้วยเอนไซม์เพคทิเนสมี MW ที่สูงกว่า COS ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ส่งผลให้มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่า Kim และ Rajapakse (2005) ได้รายงานถึงการใช้ COS ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกพบว่า MW และ %DD มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ Jeon *et al*. (2001) ได้กล่าวว่า COS ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบและ แลคติกแบคทีเรียนั้นจะต้องมี MW ที่มากกว่า 10,000 daltons ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Park *et al*., (2004) ที่พบว่าเมื่อ COS ที่มี MW เพิ่มสูงขึ้นจะมีแนวโน้มที่จะสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น และสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้

สรุป

COS สามารถผลิตได้จากเอนไซม์ทางการค้า โดยชนิดของเอนไซม์ pH ของบัพเฟอร์ และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานที่ใช้ มีผลต่อค่าคุณภาพของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ร้อยละของผลผลิต และ ความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า การผลิต COS ผลิตได้จากเอนไซม์เพคทิเนสมีร้อยละของผลผลิตและน้ำหนักโมเลกุล สูงกว่าด้วยเอนไซม์เซลลูเลส สำหรับสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถผลิต COS และให้ร้อยละของผลผลิตสูงสุดคือ สภาวะที่ใช้เอนไซม์เพคทิเนสที่ pH ของโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เท่ากับ pH 4.5 และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:4 ซึ่งทำให้ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 97.35 ผลจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์แสดงให้เห็นว่า COS ที่ผลิตได้มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดย COS ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เพคทิเนสจะมีความสามารถในการต้านเชื้อ *S. aureus*, *Strep. faecalis* และ *Sal. Typhimurium* ได้ดี และ COS ที่ผลิตด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจะมีความสามารถในการต้านเชื้อ *E. coli* ได้ดี และจุลินทรีย์แต่ละชนิดตอบสนองต่อการต้านการเจริญจาก COS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ดังนั้นการนำ COS ไปใช้กับจุลินทรีย์ชนิดใดควรเลือก COS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

ขวัญสุดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. 2547. **การใช้ไคโตซานโอลิโกเมอร์ในผลิตภัณฑ์เนื้อกวางขึ้นรูป**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีอาหาร , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วลัยรัตน์ จันทรปานนท์. มมป. น. 46 – 52. **คู่มือปฏิบัติการการวัดค่าปัจจัยคุณภาพทางชีวภาพ**. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริกรณ์ เจียรพสุอนันต์. 2545. **ไคโตซานและการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร**. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กระทรวงสาธารณสุข.

สุพจน์ หารหนองบัว, สุวลี จันทร์กระจ่าง, ปราณี เลิศสุทธิวงศ์, กฤษณา ศิรเลิศมุกุล, ปราณี รัตนวลีดิโรจน์ และ สุทธิรัตน์ ลิศนันท์. 2546. **การศึกษาวิเคราะห์สถานภาพของโรงงานผู้ผลิตและตลาดการใช้ไคตินและไคโตซาน**. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ร่วมกับ สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Benjakul, S., W. Visessanguan, M. Tanaka, S. Ishizaki, R. Suyhidham and O. Sungpech. 2000. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiramphus far*). **J. Sci. Food Agric**. 81: 102-108.

Jeon, Y.J., Park, P.J. and S.K., Kim. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**. 44: 71-76.

Jo, C., J.W., Lee, K.H., Lee and M.W., Byun. 2001. Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. **Meat Science**, 59: 369-375.

Jung, W.J., A., Souleimanov, R.D., Park and D.L., Smith. 2007. Enzymatic production of *N*-acetyl chitooligosaccarides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* KJA-424. **Carbohydrate Polymers**, 67: 256-259.

Kachanechai, T., Jantawat, P. and R., Pichyangkura. 2008. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel. **Food Hydrocolloids**, 22: 74-83.

Kim, M. and J.S., Han. 2002. Effects of Chitooligosaccharide on The Physicochemical, Textural and Sensory Properties of Tofu. **J. Texture Study**, 33(1): 1-14.

Kim, S.K. and N., Rajapakse. 2005. Enzymatic production and biological activities of Chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, 62: 357-368.

Park, P. J., Je, J. Y., Byun, H. G., Moon, S. H., and S. K., Kim. (2004). Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 14, 317–323.

Sashiwa, H., S., Fujishima, N., Yamano, N., Kwasaki, A., Nadayama, E., Muraki, K., Hiraga, K., Oda and S., Aiba. 2002. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from **α**-chitin by crude enzymes from *Aerononas hydrophila* H-2330. **Carbohydrate Research**, 337: 761-763.

Sashiwa, H., S., Fujishima, N., Yamano, N., Kawasaki, A., Nadayama, E., Muraki, M., Sukwattanasinitt and R., Pichyangkura. 2003. Enzymatic production of *N*-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of *N*-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. **Carbohydrate Polymers**, 51: 391-395.

Tolaimate, A., J., Desbrieres, M., Rhazi and A., Alagui. 2003. Contribution to the preparation of chitins and chitosan with controlled physic-chemical properties. **Polymer**, 44(26): 7939-7952.