

การต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยโคโตซานสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630

มานะ ขาวเมฆ^{1*}

Received : October 25, 2019

Revised : November 24, 2019

Accepted : December 23, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยโคโตซานสจากก้ามปูกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ด้วยอะซิเตตบัพเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 0.0061-10.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม โดยโคโตซานสจากก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองมาเป็นข้าว กข. 6 กระถินบ้าน และข้าวฟ่าง เเคู 630 ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 มีค่าเท่ากับ 4.5, 3.5, 4.5 และ 4.5 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 มีค่าเท่ากับ 45, 45, 45 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของโคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 ที่ใช้เวลาย่อย 30 นาที จะมีโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 ((GlcN)₁₋₆) และจะมีโมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcN)₂ และ (GlcN)₃ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลาย่อยเพิ่มเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ในขณะที่ (GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆ ลดลง โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ((GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆) ที่ใช้เวลาย่อยที่ 30 นาทีของก้ามปูจะมีปริมาณมากที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 ตามลำดับ โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากโคโตซานสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 สามารถต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี 1,10-ฟีแนนทรอลีนได้เหมือนกัน โดยเรียงตามลำดับคือ กระถินบ้าน ก้ามปู ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคู 630 โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากก้ามปูและกระถินบ้าน สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า BHT เมื่อเปรียบเทียบค่า EC₅₀

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โคโตซานส ก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข.6 ข้าวฟ่าง เเคู 630

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

* ผู้มีพันธหลัก e-mail: mana@vru.ac.th

ANTIOXIDANT ACTIVITY BY CHITOOLIGOSACCHARIDES OF CHITOSANASE FROM *SAMANCA SAMAN* (JACQ) MERR., *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT, *ORYZA SATIVA* RD. 6 AND *SORGHUM VULGARE* KU 630

Mana Kaomek^{1*}

Abstract

This research was aimed to study the antioxidant activity by chitooligosaccharides of chitosanase from two weeks seedlings, *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 with 0.1 molar acetate buffer. The specific activity were 0.0061-10.8040 units/mg. The chitosanase from *Samanca saman* (Jacq) Merr. had the highest specific activity and decreased from *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. The optimum pH were extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 of 4.5, 3.5, 4.5 and 4.5, respectively. The optimum temperature were extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 of 45, 45, 45 and 65 °C, respectively. Chitooligosaccharides obtained from the digestion of chitosanase which extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 were used for digestion 30 min that will be chitooligosaccharides of 1-6 ((GlcN)₁₋₆). The small molecules of (GlcN)₂ and (GlcN)₃ were increased when the incubation time is increased to 1, 2 and 4 hours, while (GlcN)₄, (GlcN)₅ and (GlcN)₆ were decreased. The large molecules ((GlcN)₄, (GlcN)₅ and (GlcN)₆) of *Samanca saman* (Jacq) Merr. were incubated for 30 minutes that had the highest and *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. Chitooligosaccharides obtained from chitosanase of *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 can antioxidant when tested using DPPH and 1,10 phenanthroline. In order of which *Leucaena leucocephala* de wit, *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630. Chitooligosaccharides from *Samanca saman* (Jacq) Merr. and *Leucaena leucocephala* de wit were able to antioxidant better than BHT when compared with the EC₅₀.

Keywords : Antioxidant activity, Chitooligosaccharides, Chitosanase, *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630

¹ Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage,

* Corresponding author, e-mail: mana@vru.ac.t

บทนำ

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดหมู่อะซิติลของเอนอะซิติลดีกลูโคซามีนเหลือเป็นดีกลูโคซามีนตั้งแต่ร้อยละ 50 ขึ้นไป ไคโตซานละลายในกรดอ่อน จับกับไอออนของโลหะได้ดี และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น สารตกตะกอนในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม การป้องกันแบคทีเรียและเชื้อรา การกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซานมีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิดอะซิติลและน้ำหนักโมเลกุล (Aam, et al., 2010)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Chotooligosaccharides) คือสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายไคตินและไคโตซานด้วยปฏิกิริยาเคมีของกรดหรือปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไคติโนไลติก เช่น ไคตินเนสและไคโตซานเนส ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์นำมาใช้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรคพืช ใช้ลดริ้วรอยในเครื่องสำอาง (Cui, Kong, & Zhang, 2012) ใช้ในการต้านโรคพืชอีกเสบ ใช้ลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด ใช้ควบคุมการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ (Coelho, et al., 2010) และใช้ในการต้านอนุมูลอิสระโดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด 4-7 โมเลกุลจะสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Salgaonkar, et al., 2015) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำได้และมีประสิทธิภาพการดูดซึมน้ำดีกว่าไคโตซาน ดังนั้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีมูลค่าสูงกว่าไคตินและไคโตซานมาก ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากนักเนื่องจากปกติจะอยู่ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการเปลี่ยนไคโตซานที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยไคโตซานเนส ซึ่งพืชหลายชนิดมีไคโตซานเนสที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะเปลี่ยนไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สำหรับสิ่งมีชีวิตจะมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ กลไกการต้านอนุมูลอิสระมีหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ การเสริมฤทธิ์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด เช่น สารต้านอนุมูลอิสระจากพืช ได้แก่ โคเอนไซม์ เอนไซม์คิวเทน (Beyer, 1992)

จากคุณสมบัติของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยจึงสนใจเอนไซม์ไคโตซานเนสจากพืช 4 ชนิดคือ ข้าว กข 6 กระถินบ้าน ก้ามปู และข้าวฟ่าง เคนู 630 ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ซึ่งมีผลการวิจัยของ รุ่งสรรค์ คำเสื่อ และสุภาณี ภาคารูป (2548) พบว่าต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ของพืชทั้ง 4 ชนิดมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโตซานเนสสูงจะผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี จึงนำไคโตซานสมาย่อยไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชทั้ง 4 ชนิด มาหาชนิดและปริมาณ และนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคโตซานเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข 6 และข้าวฟ่าง เคนู 630 ที่มีอายุ 2 สัปดาห์
2. เพื่อศึกษาไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์ไคโตซานเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข 6 และข้าวฟ่าง เคนู 630 ที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ในการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดไคโตซานจากต้นอ่อนของพืช 4 ชนิด (Pillai, et al., 2009) โดยชั่งต้นอ่อนพืชอายุ 2 สัปดาห์ 10 กรัม บดและเติมโซเดียมอะซิเตดบัฟเฟอร์พีเอช 3.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีฟีนอลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดน 5 % ปั่นเหวี่ยงที่ 25,000 g 30 นาที จะได้สารสกัดไคโตซาน
2. หาค่ากิจกรรมของไคโตซานเนส (Tolaimate, et al, 2003) โดยนำสารสกัดไคโตซาน 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปต้ม 3 นาที แล้ว

ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Schales' Reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 15 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

3. หาปริมาณโปรตีน (Lowry, et al., 1951) โดยนำสารสกัดโคโตซานสมา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตร เขย่า ตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ โพลีน ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

4. ศึกษาผลของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาในช่วง 3.0-10 (ช่วงต่าง 0.5) โดยพีเอช 3.0-6.0 ใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 6.5-8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8.5-10 ใช้ทริสไฮโดรคลอริก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส (ช่วงต่าง 5 องศาเซลเซียส) โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4) บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 เป็นเวลา 20 นาที

6. ศึกษารูปแบบโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Tolaimate, et al., 2003) ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) 6.1 ผสม 1 มิลลิลิตรของสารละลายโคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์และ 1 มิลลิลิตร สารสกัดโคโตซานส บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปต้มให้เดือด 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g 10 นาที จะได้สารโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

6.2 ผสมตัวทำละลาย เอ็นโพรพานอล : $H_2O : NH_3 = 70 : 30 : 1$ ใส่ในแท่งกักปิดฝา สปอตสารบนแผ่น TLC วางในแท่งกักตัวทำละลายเคลื่อนที่ระยะทาง 10 เซนติเมตร ทำให้แห้งและสเปรย์กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่น TLC นำไปวางบน Hot Plate ประมาณ 3-5 นาที วัดระยะทางและหาค่า R_f เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

7. หาปริมาณของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Koga, et al., 1998) ด้วยโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC)

7.1 นำสารมาตรฐานกลูโคซามีน และโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-6 หน่วย เข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารเคลื่อนที่เป็น น้ำ : เมทานอล = 60 : 40 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที คอลัมน์ Shodex Asahipak NH2P-50 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำพื้นที่พีคและค่าความเข้มข้นสารมาตรฐานสร้างกราฟ

7.2 นำสารโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้การย่อยของโคโตซานสจากพืชทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ด้วย HPLC และหาปริมาณร้อยละโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

8. ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-ไดเฟนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (Diphenyl-1-picrylhydrazyl Scavenging Capacity, DPPH) (Brand, et al., 1995)

8.1 เตรียมสารละลาย DPPH radical ในเอทานอลเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของบิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอิน (Butylated Hydroxytoluene; BHT) เข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ในเอทานอล ปิเปตสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานของบิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอิน ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้ง กับค่า log ความเข้มข้นของ BHT

8.3 เตรียมสารตัวอย่างเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ปิเปตสารตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติม DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BHT คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระและค่า EC_{50}

9. ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,10-ฟีแนทอรอลีน (Szydłowska-Czemiak, et al., 2008)

9.1 เตรียมสารละลายเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 50-250 มิลลิกรัม/ลิตร เติมน้ำกลั่น 1,10-ฟีแนทอรอลีนเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

9.2 ปิเปตสารตัวอย่าง 0.60 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 1,10-ฟีแนทอรอลีนเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ทำ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเพอร์ซัลเฟต

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาค่ากิจกรรมและค่ากิจกรรมจำเพาะของโคโตซานเนส

การศึกษาค่ากิจกรรมของโคโตซานเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ พบว่าค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 0.0348-19.2687 ยูนิต/มิลลิลิตร 1.2137-14.0220 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.0061-10.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคซามีนและกราฟมาตรฐานโปรตีน ก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดคือ 10.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม และข้าวฟ่าง เเคยู 630 มีค่ากิจกรรมจำเพาะน้อยที่สุดคือ 0.0061 ยูนิต/มิลลิกรัม พืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะเรียงจากมากไปน้อยคือ ก้ามปู ข้าว กข. 6 กระถินบ้าน และข้าวฟ่าง เเคยู 630 โคโตซานเนสที่สกัดได้จากต้นอ่อนก้ามปูและต้นอ่อนข้าว กข. 6 อายุ 2 สัปดาห์มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าจากแหล่งอื่น เช่น โคโตซานเนสจาก *Bacillus sp.* Strain KCTC0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.9062 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yeon et al., 2004) และโคโตซานเนส จาก *Poenibacillus fukunensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.8614 ยูนิต/มิลลิกรัม (Fukuda et al., 2007) ดังนั้น โคโตซานเนสจากพืชมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์โคโตซานเนสจากแบคทีเรียและเชื้อราเนื่องจากโคโตซานเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิดภายใน จึงสามารถจับกับโครงสร้างโคโตซานได้ดีกว่า

2. การศึกษาพิเอชต่อการเร่งปฏิกิริยา

การศึกษาค่าผลของพิเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ในช่วงพิเอช 3.0 ถึง 10.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในช่วงพิเอช 3.5-4.5

3. การศึกษาค่าผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

การศึกษาค่าผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เเคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส

4. การศึกษารูปแบบโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

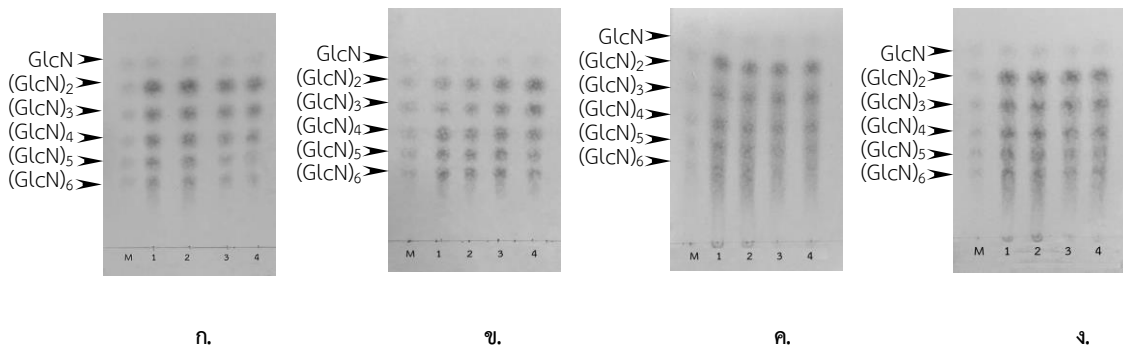
4.1 โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตซานเนสจากต้นอ่อนก้ามปูที่ได้จากการย่อยสลายโคโตซานที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พิเอช 4.5 พบว่าเวลาในการบ่มที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ โดยเวลาในการบ่ม 30 นาที จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดตั้งแต่ (GlcN)₁₋₆ โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่มีโมเลกุลใหญ่ ((GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆) จะมีจุดที่เข้มข้นกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก แสดงว่ามีปริมาณโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่า แต่เมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้นเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จะมีโมเลกุลขนาดเล็ก (GlcN)₂ และ (GlcN)₃ เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 1 ก.

4.2 โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตซานเนสจากกระถินบ้านที่ได้จากการย่อยสลายโคโตซานที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พิเอช 3.5 โดยใช้เวลาดบ่มต่างกันที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง พบว่า เวลาในการบ่มที่ 30

นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ โดยเวลาในการบ่ม 30 นาที่ จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดตั้งแต่ $(\text{GlcN})_1-6$ โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลใหญ่ $(\text{GlcN})_4$, $(\text{GlcN})_5$ และ $(\text{GlcN})_6$ จะมีจุดที่เข้มกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก แสดงว่ามีปริมาณโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่า แต่เมื่อใช้เวลานานการบ่มมากขึ้นเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จะมีโมเลกุลขนาดเล็ก $(\text{GlcN})_2$ และ $(\text{GlcN})_3$ เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 1 ข.

4.3 โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตซานสจากข้าว กข 6 ที่ได้จากการย่อยสลายโคโตซานที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 โดยใช้เวลาบ่มต่างกันที่ 30 นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง พบว่า เวลาที่ใช้ในการบ่ม 30 นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า GlcN และมีขนาดโมเลกุล $(\text{GlcN})_3$, $(\text{GlcN})_4$ และ $(\text{GlcN})_5$ เหมือนกันในการบ่มทุกช่วงเวลา ดังภาพที่ 1 ค

4.4 โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตซานสจากข้าวฟ่าง เคนู 630 ที่ได้จากการย่อยสลายโคโตซานที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 โดยใช้เวลาบ่มต่างกันที่ 30 นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง พบว่า เวลาที่ใช้ในการบ่ม 30 นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะได้โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า GlcN และมีขนาดโมเลกุล $(\text{GlcN})_3$, $(\text{GlcN})_4$ และ $(\text{GlcN})_5$ เหมือนกันในการบ่มทุกช่วงเวลา ดังภาพที่ 1 ง.



ภาพที่ 1 รูปแบบโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตซานสจากต้นอ่อนก้ามปู ก. กระถินบ้าน ข. ข้าว กข.6 ค. และข้าวฟ่าง เคนู 630 ง. M: สารมาตรฐานโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 โมเลกุล $(\text{GlcN})_1-6$, 1: เวลาบ่ม 30 นาที่ 2: เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง 3: ใช้เวลาบ่ม 2 ชั่วโมง และ 4: ใช้เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง

5. การหาปริมาณร้อยละของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโคโตซานส จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคนู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที่ 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนและโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2 – 6 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปูมีกลูโคซามีน (GlcN) โคโตไบโอส $(\text{GlcN})_2$ โคโตไตรโอส $(\text{GlcN})_3$ โคโตเตตรโอส $(\text{GlcN})_4$ โคโตเพนโตส $(\text{GlcN})_5$ และโคโตเฮกซอส $(\text{GlcN})_6$ ร้อยละ 4.34-5.90, 19.90-38.12, 9.91-22.77, 16.34-21.44, 8.58-19.68 และ 8.28-24.73 ตามลำดับ ต้นอ่อนกระถินบ้านมีกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส โคโตเตตรโอส โคโตเพนโตส และโคโตเฮกซอสร้อยละ 4.44-6.09, 21.40-40.89, 12.19-23.02, 15.30-20.67, 7.14-18.81 และ 7.56-22.49 ตามลำดับ ต้นอ่อนข้าว กข. 6 มีกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส โคโตเตตรโอส โคโตเพนโตส และโคโตเฮกซอส ร้อยละ 2.83-4.00, 24.33-29.00, 23.50-23.17, 18.50-20.50, 11.33-16.50 และ 7.17-11.17 ตามลำดับ และต้นอ่อนข้าวฟ่าง 630 มีกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส โคโตเตตรโอส โคโตเพนโตส และโคโตเฮกซอสร้อยละ 2.33-4.17,

23.33-28.00, 23.67-28.00, 19.50-21.67, 13.67-16.67 และ 8.50-10.83 ตามลำดับ ดังนั้นพบว่า พืชทั้ง 4 ชนิดจะมีปริมาณของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่มากกว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อยและจะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น โดยก้ามปูจะมีร้อยละของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีโมเลกุลขนาดใหญ่มากที่สุดรองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข.6 และข้าวฟ่าง เค้า 630 ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ (Moon *et al.*, 2017) ที่สกัดโคตินีน จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 เมื่อย่อยคอลลอลอยไฮโดรไลต์แล้วหาปริมาณของโคโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มสั้นจะมีปริมาณของโคโตเอ็กโซสมากที่สุด รองมาเป็นโคโตเพนโตส และโคโตเตรโตสตามลำดับ

6. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-ไดเฟนิล-1-พิกโคลราซิล (DPPH)

เมื่อนำโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานด้วยโคโตซานสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เค้า 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่เวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการยับยั้ง DPPH ด้วย BHT ที่มี $EC_{50} = 16.60 \pm 0.01$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากโคโตซานสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนก้ามปูที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 15.22 ± 0.01 - 86.43 ± 0.01 , 17.52 ± 0.01 - 83.49 ± 0.01 , 18.37 ± 0.01 - 79.14 ± 0.01 และ 19.78 ± 0.01 - 72.82 ± 0.02 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 11.75 ± 0.01 , 12.59 ± 0.01 , 14.13 ± 0.01 และ 16.98 ± 0.01 ตามลำดับ

โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานด้วยโคโตซานสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 15.22 ± 0.01 - 86.43 ± 0.01 , 17.52 ± 0.01 - 83.49 ± 0.01 , 18.37 ± 0.01 - 79.14 ± 0.01 และ 19.78 ± 0.01 - 72.82 ± 0.02 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.02 ± 0.01 , 3.24 ± 0.01 , 3.89 ± 0.01 และ 4.37 ± 0.01 ตามลำดับ

โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานด้วยโคโตซานสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนข้าว กข.6 ที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 15.22 ± 0.01 - 86.43 ± 0.01 , 17.52 ± 0.01 - 83.49 ± 0.01 , 18.37 ± 0.01 - 79.14 ± 0.01 และ 19.78 ± 0.01 - 72.82 ± 0.02 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.49 ± 0.01 , 16.22 ± 0.01 , 19.05 ± 0.01 และ 23.44 ± 0.01 ตามลำดับ

โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานด้วยโคโตซานสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนข้าวฟ่าง เค้า 630 ที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 15.22 ± 0.01 - 86.43 ± 0.01 , 17.52 ± 0.01 - 83.49 ± 0.01 , 18.37 ± 0.01 - 79.14 ± 0.01 และ 19.78 ± 0.01 - 72.82 ± 0.02 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 20.42 ± 0.01 , 22.91 ± 0.01 , 27.54 ± 0.01 และ 30.90 ± 0.01 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่า EC_{50} จากโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากต้นอ่อนพืช 4 ชนิด อายุ 2 สัปดาห์ กับสารต้านอนุมูลอิสระ BHT พบว่า โคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปูที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง โคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนกระถินบ้านที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง โคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนข้าว กข. 6 ที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ด้วยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ปริมาณน้อยกว่า BHT โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มที่เวลาน้อย (30 นาที) จะมีโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ ($(GlcN)_4$) มากกว่าจึงต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของซาลกอนการ์ (Salgaonkar, *et al.*, 2015) ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี DPPH พบว่า โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ($(GlcN)_{5-6}$) ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็ก ($(GlcN)_{1-3}$) เมื่อเรียงลำดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชทั้ง 4 ชนิดกับ BHT จากค่า EC_{50} คือ กระถินบ้าน 30 นาที > กระถินบ้าน 1 ชั่วโมง > กระถินบ้าน 2 ชั่วโมง > กระถินบ้าน 4 ชั่วโมง > ก้ามปู 30 นาที > ก้ามปู 1 ชั่วโมง > ก้ามปู

2 ชั่วโมง> ข้าว กข. 6 30 นาที> ข้าว กข.6 1 ชั่วโมง> BHT> กัมพู 4 ชั่วโมง> ข้าว กข.6 2 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 30 นาที> ข้าว กข.6 4 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 1 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 2 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

7. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,10-ฟีแนนทรอลีน (1,10-Phenanthroline)

เมื่อนำโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานกับโคโตซานสจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่เวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,10-ฟีแนนทรอลีน และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต พบว่า โคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากโคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที มีการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดคือเปลี่ยนอนุมูลอิสระ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้มากที่สุด คือเท่ากับ 46.67 ± 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รองลงมาเป็นโคโตโลลิโกแซคคาไรด์จากกระถินบ้าน 1 ชั่วโมง> กระถินบ้าน 2 ชั่วโมง> กระถินบ้าน 4 ชั่วโมง> กัมพู 30 นาที> กัมพู 1 ชั่วโมง> กัมพู 2 ชั่วโมง> ข้าว กข.6 30 นาที> ข้าว กข.6 1 ชั่วโมง> BHT> กัมพู 4 ชั่วโมง> ข้าว กข.6 2 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 30 นาที> ข้าว กข.6 4 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 1 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 2 ชั่วโมง> ข้าวฟ่าง เคย 630 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

สรุป

1. โคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 0.0061 - 10.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยโคโตซานสจากกัมพูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองมาเป็นข้าว กข. 6 กระถินบ้าน และข้าวฟ่าง เคย 630 ตามลำดับ
2. พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 4.5, 3.5, 4.5 และ 4.5 ตามลำดับ
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของโคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 45, 45, 45 และ 65 องศาเซลเซียส
4. โคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของโคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาย่อย 30 นาที จะมีโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 ((GlcN)₁₋₅) และจะมีโมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcN)₂ และ (GlcN)₃ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลาบ่มเพิ่มเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ในขณะที่ (GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆ ลดลง โดยโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ((GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆) ที่ใช้เวลาย่อยที่น้อยของกัมพูจะมีที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630
5. โคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของโคโตซานที่สกัดจากต้นอ่อนกัมพู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 อายุ 2 สัปดาห์ สามารถต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และวิธี 1,10 ฟีแนนทรอลีนได้เหมือนกัน โดยเรียงตามลำดับคือ กระถินบ้าน กัมพู ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคย 630 โดยโคโตโลลิโกแซคคาไรด์จากโคโตซานสบ่มที่เวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง จากต้นอ่อนกัมพู และโคโตโลลิโกแซคคาไรด์จากโคโตซานสบ่มที่เวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จากต้นอ่อนกระถินบ้าน และโคโตโลลิโกแซคคาไรด์จากโคโตซานสบ่มที่เวลา 30 นาที และ 1 ชั่วโมง จากต้นอ่อนข้าว กข. 6 สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า BHT เมื่อเปรียบเทียบกับค่า EC₅₀ แสดงว่าโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่คือ (GlcN)₄, (GlcN)₅ และ (GlcN)₆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็ก GlcN, (GlcN)₂ และ (GlcN)₃

ข้อเสนอแนะ

1. นำผลิตผลโคโตโลลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง การเร่งการเจริญเติบโตของพืช และใช้ในการผสมอาหารบางชนิด

2. นำผลิตผลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาแยกขนาดต่าง ๆ ออกจากกัน เพื่อเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีมูลค่าสูง
มาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราช
ภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราช
ภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งสรรค์ คำเสือ และสุภาณี ภาคารูป. (2548). การตรวจหาเอนไซม์ไคโตซานเนสจากแมล็ดพืช. *โปรแกรมเคมี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์*: ปทุมธานี.
- Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2010). Production of
Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs*. 8(5): 1482-
1517.
- Berger, L. R. & Reynold, D. M. (1958). The Chitinase System of a Strain of *Griseus*. *Biochimica et Biophysica
Acta*. 29(3): 522-534.
- Brand, W. W, Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.
Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 28(1):25-30.
- Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Gois, J.R. & Gill, M. H. (2010). Drug Delivery
System: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments. *EPMA
Journal*. 1(1): 164-209.
- Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. (2012). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal
Transduction*. 11(6): 46-354.
- Fukuda, T., Isogawa, D., Takagi, M., Kato-murai, M., Kimoto, H., Kusaoke, H., Ueda, M. & Suye, S.I. (2007). Yeast
Cell-Surface Expression of Chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis*. *Bioscience
Biotechnology and Biochemistry*. 71(11): 2845-2847.
- Koga,D., Yoshioka, T. & Arakane, Y. (1998). HPLC Analysis of Anomeric Formation and Cleavage Pattern by
Chitinolytic Enzyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62(8): 1643-1646.
- Lowry, O. H., Rosebrougly N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol
Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 256-257.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. (2009). Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber
Formation. *Progress in Polymer Science*. 4(2): 641-678.
- Salgaonkar, N., Prakash, D., Nawani, N. N., & Kapadnis, B.P. 2015. Comparative studies on ability of
N-acetylated chitooligosaccharides to scavenge reactive oxygen species and protect DNA from
oxidative damage. *Indian Journal of Biochemistry*. 14: 186-192.
- Szydlowska-Czemiak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovis, G., & Szlyka, E. (2008). Determination of antioxidant
capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76: 899-905.

- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M. & Alagui, A. (2003). Contribution to the Preparation of Chitins and Chitosan with Controlled Physic-chemical Properties. *Polymer*, 44(26): 7939- 7952.
- Yeon, J. C., Eun, J. K., Zhe, P., Young, C. Y. & Yong, C. S. (2004). Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. *Applied Environmental Microbiology*. 70(8): 439-446.