การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้าน

มานะ ขาวเมฆ[1*] ปรานอม ขาวเมฆ[2]

Received : May 31, 2023
Revised : October 18, 2023
Accepted : November 20, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของโมเลกุลขนาดใหญ่ $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ รวมเท่ากับ 93.74 ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853*, V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.390/0.390 และ 0.390/0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง มีค่าร้อยละของโมเลกุลขนาดใหญ่ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ เท่ากับ 94.09 ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853*, V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 0.195/0.195, 0.195/0.195, 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.390/0.390 และ 0.390/0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง จะมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง

คำสำคัญ: ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ต้นอ่อนกระถินบ้าน ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์ไคโตซาเนส

[1] *รองศาสตราจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี อีเมล: mana@vru.ac.th*

[2] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต อีเมล: pranom.k@rsu.ac.th*

** ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: mana@vru.ac.th*

A COMPARISON OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOOLIGOSACCHARIDES PRODUCED BY CHITINASE AND CHITOSANASE EXTRACT FROM SEEDLINGS OF LEUCAENA LEUCOCEPHALA (LAM.) DE WIT

Mana Khaomek[1*] Pranorm Khaomek[2]

Abstract

This research aimed to compare the antibacterial activity of chitooligosaccharides (COS) produced by chitinase and chitosanase extracted from two-week-old seedlings of Leucaena leucocephala de Wit. It was observed that COS obtained from chitinase through the hydrolysis of 1 percent weight per volume of colloidal chitin for 0.5 hours contained a percentage of larger molecules such as $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$, and $(GlcNAc)_8$, which made up 93.74% of the total. This COS exhibited the strongest inhibition against six bacterial strains, including gram-positive bacteria such as B. cereus ATCC 11778, L. monocytogenes ATCC 15313, and S. aureus ATCC 25923, as well as gram-negative bacteria like E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853, and V. parahaemolyticus ATCC 17802. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were both measured at 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.390/0.390, and 0.390/0.390 μg/mL, respectively. For chitosanase, COS obtained from the hydrolysis of one percent weight per volume of chitosan for 0.5 hours contained a percentage of total larger molecules such as $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$, and $(GlcN)_8$, accounting for 94.09% of the total. This COS exhibited the strongest inhibition against six bacterial strains, including gram-positive bacteria such as B. cereus ATCC 11778, L. monocytogenes ATCC 15313, and S. aureus ATCC 25923, as well as gram-negative bacteria like E. coli ATCC 25922, P. aeruginosa ATCC 27853, and V. parahaemolyticus ATCC 17802. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were both measured at 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.195/0.195, 0.390/0.390, 0.390/0.390, and 0.390/0.390 μg/mL, respectively. Therefore, it can be concluded that COS obtained by digesting one percent chitosan by mass per volume with chitosanase for 0.5 hours exhibited better antibacterial activity than COS obtained by digesting one percent colloidal chitin by mass per volume with chitinase enzyme for 0.5 hours.

Keywords: Chitooligosaccharides, Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit Seedlings Antibacterial activity, Chitinase, Chitosanase

[1] Associate Professor of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province, e-mail: mana@vru.ac.th

[2] Assistant Professor of Chemistry, Faculty of Science, Rangsit University, e-mail: pranom.k@rsu.ac.th

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

บทนำ

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคตินได้ผลผลิตเป็นเอนอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) และไคตินโอลิโอแซคคาไรด์ที่มีความยาวของโมเลกุลขนาด 2-10 โมเลกุล สำหรับเอนไซม์ไคโตซาเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคโตซาน ได้ผลผลิตเป็นกลูโคซามีน (GlcN) และไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวขนาด 2-10 โมเลกุล เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อยีสต์ มีความสำคัญโดยประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และแมลงที่เป็นอันตรายต่อพืช (Chernin et al., 1997)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคตินและไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ของมอนอแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล ต่อด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของเอนอะซิติลกลูโคซามีนกับเอนอะซิติลกลูโคซามีน และกลูโคซามีนกับกลูโคซามีนตามลำดับ ซึ่งเป็นสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยไคตินและไคโตซานด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสหรือ ปฏิกิริยาเคมีจากกรด ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถใช้ต้านโรคต่าง ๆ เช่น ไขข้ออักเสบ ลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด การปล่อยตัวยาสำคัญ (Coelho et al., 2010) และยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Baureithel et al., 1994; Shibuya et al., 1993) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำและดูดซึมดีกว่าไคตินและไคโตซาน จึงทำให้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีมูลค่ามากกว่าไคตินและไคโตซาน ดังนั้น จึงมีการเปลี่ยนไคตินและไคโตซานพอลิเมอร์ให้เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนส โดยพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะเปลี่ยนไคตินและไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี เช่น ก้ามปูและกระถินบ้าน (มานะ ขาวเมฆ, 2562ข)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืชสามารถยับยั้งเชื้อราและต้านอนุมูลอิสระได้ดี เช่น งานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2565) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ พบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละรวมโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_4$, $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ เท่ากับ 94.99 จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดทั้ง 8 สายพันธุ์คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Vibrio parahaemolyticus* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 0.39/0.39, 0.78/0.78, 0.39/0.39, 0.39/0.39, 0.39/0.78, 0.39/0.39, 0.78/1.56/ และ 0.78/0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2563) ศึกษาการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ของไคโตเพนโตส ($(GlcNAc)_5$) ไคโตเฮกโซส ($(GlcNAc)_6$) ไคโตเฮปโตส ($(GlcNAc)_7$) และไคโตออกโตส ($(GlcNAc)_8$) มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของเอนอะซิติลกลูโคซามีน ($(GlcNAc)_1$) ไคโตไบโอส ($(GlcNAc)_2$) ไคโตไตรโอส ($(GlcNAc)_3$) และไคโตเตโตรส ($(GlcNAc)_4$) โดยมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส ไคโตเฮกโซส ไคโตเฮปโตส และไคโตออกโตส ร้อยละ 1.14, 1.55, 2.33, 8.07, 10.23, 23.16, 25.49 และ 28.03 ตามลำดับ สามารถยังยั้งเชื้อราจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Bipolaris oryzae, Curvularia lunata, Magnaporthe oryzae และ*

Setosphaeria oryzae ที่ความเข้มข้นของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5-10 ไมโครกรัม และจากงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2562ก) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT) โดยมีค่า EC_{50} ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เท่ากับ 1.15±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ 1.34 ±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ และวรางคณา เทศทอง (2564) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ พบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT) โดยมีค่า EC_{50} ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เท่ากับ 1.21±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} ของสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ 1.34±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Yamada et al. (1993) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ 6-8 โมเลกุล ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก 1-4 โมเลกุล โดยใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ผลิตจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและต้านอนุมูลอิสระได้ดีมาใช้ทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้ต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ หนัก 10 กรัม บดให้ละเอียดแล้วเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์หนัก 0.017 กรัม และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดน 0.50 กรัม นำของผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 25,000 g เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายใสข้างบนเป็นสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส (Boller et al., 1983)

2. หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส โดยนำสารสกัดเอนไซม์ไคติเนสปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับคอยลอยด์ไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร (Berger et al., 1958) ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำของผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำของผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสด้านบน 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมเตตระบอเรตเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำของผสมไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มของผสมในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีน (Boller et al., 1983)

3. หาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ไคติเนส โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคติเนสปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 490 ไมโครลิตร แล้วเติม

สารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตร เขย่าของผสมแล้วตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโฟลินเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าของผสมและตั้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Lowry et al., 1951)

4. สกัดเอนไซม์ไคโตซาเนส โดยนำต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ หนัก 10 กรัม มาบดให้ละเอียดและเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์หนัก 0.017 กรัม และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดนหนัก 0.50 กรัม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 25,000 g เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายใสข้างบนเป็นสารสกัดเอนไซม์ไคโตซาเนส (Pillai et al., 2009)

5. หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโตซาเนส โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคโตซาเนสปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของผสมไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายใส 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Schales'Reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน (Tolaimate et al., 2003)

6. หาปริมาณโปรตีนเอนไซม์ไคโตซาเนส โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคโตซาเนสปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ให้เป็น 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายผสมของคอปเปอร์ซัลเฟตปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายโฟลินเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) (Lowry et al., 1951)

7. หาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ (Koga et al., 1998)

7.1 นำสารมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 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 นำพื้นที่พีคและค่าความเข้มข้นสารมาตรฐานสร้างกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

7.2 นำสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้การย่อยของไคติเนสจากพืชทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ด้วย HPLC และหาปริมาณร้อยละโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

8. หาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จาการย่อยไคโตซาน (Koga et al., 1998)

8.1 ปิเปตสารมาตรฐานของกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-8 หน่วย ที่เข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สารเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นน้ำและเมทานอลในอัตราส่วน 60 : 40 โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ใช้คอลัมน์ Shodex Asahipak NH2P-50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำค่าพื้นที่ใต้กราฟและค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาสร้างกราฟมาตรฐาน

8.2 ปิเปตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้การย่อยด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนส มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC หาปริมาณร้อยละโดยนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

9. ทดสอบฤทธิ์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ แกรมบวกประกอบด้วย *B. cereus* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *S. aureus* ATCC 25923 และแกรมลบประกอบด้วย *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ด้วยวิธีดิสก์ดีฟิวส์ชันของ Cockerill และคณะ (Cockerill et al., 2012a)

9.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารนิวเทรียนอาการ์ (Nutrient agar) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้อาหารนิวเทรียนอาการ์ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตันบรอท (Mueller Hinton broth; MHB) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้ทริปติกซอยบรอท (Tryptic soy broth; TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ ชุบเชื้อแบคทีเรียแล้วเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตันอาการ์ (Mueller Hinton Agar; MHA) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้ทริปติกซอยอาการ์ (Tryptic Soy Agar)) ทิ้งไว้ 5 นาที นำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหยดไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่บนแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร รอให้แห้งประมาณ 15 นาที ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control) และตัวควบคุมผลบวก (Positive control) กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus, L. monocytogenes, S. aureus* ใช้ยาปฏิชีวนะแวนมัยซิน (Vancomycin) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli, P. aeruginosa, V. parahaemolyticus* ใช้ยาปฏิชีวนะเซฟตาซิดิม (Ceftazidime) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition Zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

9.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution Technique (Cockerill et al., 2012b)

นำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมงที่สามารถยับยั้งได้จากข้อ 9.1 มาใช้ทดสอบ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวมูลเลอร์ฮินตันบรอท (สำหรับ *V. parahaemolyticus* ใช้ทริปติกซอยบรอท) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ทำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อย 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วเติมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมผลบวกประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชุดควบคุมผลลบประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) โดยสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านความเข้มข้นของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

9.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) นำหลอดที่ไม่มีความขุ่นจากข้อ 9.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (MBC)

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวน (ANOVA) หาค่า F-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนส

เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 19.262 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.891 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าเท่ากับ 21.616 ยูนิต/มิลลิกรัม

2. ผลการหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

เอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.5 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 20.006 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.897 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าเท่ากับ 22.310 ยูนิต/มิลลิกรัม

เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ มีค่าใกล้เคียงกันคือ 21.616 และ 22.310 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ แต่จะค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากแหลงอื่นๆ เช่น เอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. KCTC0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.958 ยูนิต/มิลลิกรัม (Senol et al., 2014) และเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคโตซาเนสจากเชื้อรา *Paenibacillus fukunensis* ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.861 ยูนิต/มิลลิกรัม (Fukuda et al., 2007) ดังนั้น เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืชมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซฒ์ไคโตซาเนสจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิดภายในที่สลายพันธะแบบสุ่มจึงสามารถจับกับโครงสร้างไคตินและไคโตซานได้ดีกว่าเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

3. ผลการหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จาการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มาหาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2 – 8 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มในช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงมี $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ ร้อยละ 1.27-26.01, 1.43-23.38, 2.28-20.17, 3.08-10.13, 3.12-18.23, 4.43-21.36, 5.12-25.14 และ 7.64-27.21 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อย (0.5 ชั่วโมง) จะมีปริมาณมาก คือ 18.23, 23.16, 25.14 และ 27.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_4$ เพิ่มขึ้น เมื่อนำปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง รวมกันจะได้เท่ากับ 93.74

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moon et al. (2017) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* PRNK-1 แล้วนำมาย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ด้วยเวลา 0.5 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มสั้นมีปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_8$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_6$ มีมากกว่าปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$ และ $(GlcNAc)_7$

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดที่ได้จากการบ่มไคตินในรูปคอลลอยด์เข้นข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มต่างกัน

เวลาที่ใช้บ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์							
	$(GlcNAc)_1$	$(GlcNAc)_2$	$(GlcNAc)_3$	$(GlcNAc)_4$	$(GlcNAc)_5$	$(GlcNAc)_6$	$(GlcNAc)_7$	$(GlcNAc)_8$
0.5	1.27	1.43	2.28	3.08	18.23	23.16	25.14	27.21
1	11.96	10.24	8.08	6.10	11.06	14.24	18.14	20.18
2	21.09	20.09	16.01	6.99	5.11	8.71	10.37	11.63
4	26.01	23.38	20.17	10.13	3.12	4.43	5.12	7.64

4. ผลการหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จาการย่อยไคโตซาน

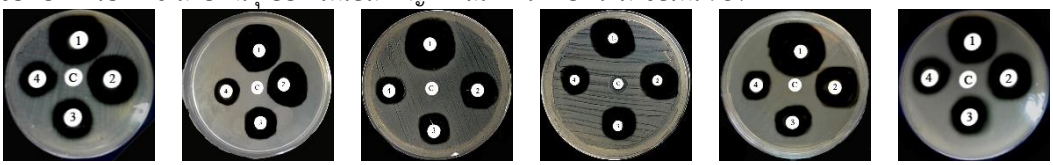
ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนส จากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2 – 8 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการบ่มในช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงมี $(GlcN)_1$, $(GlcN)_2$, $(GlcN)_3$, $(GlcN)_4$, $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ ร้อยละ 1.09-25.12, 1.24-22.06, 1.46-21.12, 2.12-9.39, 3.62-18.61, 4.56-21.61, 5.69-25.81 และ 8.44-28.06 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 โดยปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อย (0.5 ชั่วโมง) จะมีปริมาณมาก คือ 18.61, 21.61, 25.81 และ 28.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcN)_1$, $(GlcN)_2$, $(GlcN)_3$ และ $(GlcN)_4$ เพิ่มขึ้น เมื่อนำปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง รวมกันจะได้เท่ากับ 94.09 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan et al. (2007) สกัดเอนไซม์ไคโตซาเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* CUY8 แล้วนำมาย่อยไคโตซานด้วยเวลา 0.5 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มสั้นจะมีปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ มาก

ตารางที่ 2 ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดที่ได้จากการบ่มไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มต่างกัน

เวลาที่ใช้บ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์							
	$(GlcN)_1$	$(GlcN)_2$	$(GlcN)_3$	$(GlcN)_4$	$(GlcN)_5$	$(GlcN)_6$	$(GlcN)_7$	$(GlcN)_8$
0.5	1.09	1.24	1.46	2.12	18.61	21.61	25.81	28.06
1	11.09	9.94	8.42	5.81	11.76	14.43	18.67	19.88
2	20.69	19.64	16.36	6.18	5.47	8.88	10.71	12.07
4	25.12	22.06	21.12	9.39	3.62	4.56	5.69	8.44

5. ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

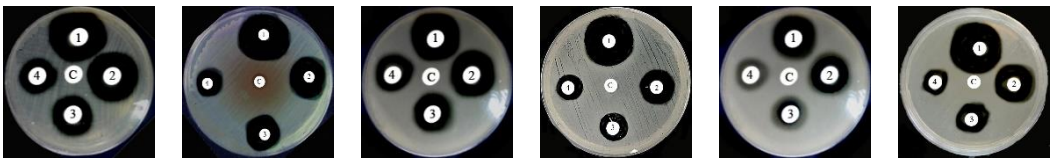
เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีเทคนิคดิสก์ดีฟิวส์ชัน (Disc Diffusion Technique) โดยใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อดิสก์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการใช้เวลาในการบ่ม 0.5 ชั่วโมง ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus, L. monocytogenes* และ *S. aureus* มีความกว้างของ Clear Zone เท่ากับ 30.86±0.12, 29.22±0.15, 30. 84±0.15 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli, P. aeruginosa* และ *V. parahaemolyticus* มีความกว้างเท่ากับ 28.92±0.14, 29.47±0.12, 29.41±0.15 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 3 ตัวควบคุมผลลบและตัวควบคุมผลบวกไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



A B C D E F

ภาพที่ 1 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ได้จาการบ่ม 1 = บ่ม 0.5 ชั่วโมง 2 = บ่ม 1 ชั่วโมง 3 = บ่ม 2 ชั่วโมง และ 4 = บ่ม 4 ชั่วโมง A = *B. cereus,* B = *L. monocytogenes,* C = *S. aureus*, D = *E. coli,* E = *P. aeruginosa* และ F = *V. parahaemolyticus*

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มายังยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีเทคนิคดิสก์ดีฟิวส์ชัน (Disc Diffusion Technique) โดยใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อดิสก์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการบ่ม 0.5 ชั่วโมง ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus, L. monocytogenes* และ *S. aureus* มีความกว้างของ Clear Zone เท่ากับ 31.16±0.19, 30.91±0.19, 31.88±0.19 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli, P. aeruginosa* และ *V. parahaemolyticus* มีความกว้างเท่ากับ 29.02±0.18, 29.89±0.12, 29.93±0.15 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 4 ตัวควบคุมผลลบและตัวควบคุมผลบวกไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



A B C D E F

ภาพที่ 2 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ได้จาการบ่ม 1 = บ่ม 0.5 ชั่วโมง 2 = บ่ม 1 ชั่วโมง 3 = บ่ม 2 ชั่วโมง และ 4 = บ่ม 4 ชั่วโมง A = *B. cereus,* B = *L. monocytogenes,* C = *S. aureus*, D = *E. coli,* E = *P. aeruginosa* และ F = *V. parahaemolyticus*

ตารางที่ 3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาบ่มไคตินในรูปคอลลอยด์ 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ไคติเนส

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	COS จากการบ่ม (ชั่วโมง)	บริเวณยับยั้ง (mm)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (µg/ml)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (µg/ml)
แกรมบวก				
B. cereus	0.5	30.86±0.12	0.195	0.195
ATCC 11778	1	19.43±0.15	0.390	0.390
	2	12.79±0.21	0.780	0.780
	4	9.48±0.23	1.560	1.560
L. monocytogenes	0.5	29.22±0.15	0.390	0.390
ATCC 15313	1	18.96±0.15	0.780	0.780
	2	11.21±0.23	1.560	1.560
	4	8.97±0.12	3.120	3.120
S. aureus	0.5	30.84±0.15	0.195	0.195
ATCC 25923	1	19.11±0.19	0.390	0.390
	2	12.42±0.21	0.780	0.780
	4	9.49±0.23	1.560	1.560
แกรมลบ				
E. coli	0.5	28.92±0.14	0.390	0.390
ATCC 25922	1	18.73±0.12	0.780	0.780
	2	11.82±0.15	1.560	1.560
	4	8.87±0.23	3.120	3.120
P. aeruginosa	0.5	29.47±0.12	0.390	0.390
ATCC 27853	1	18.97±0.15	0.780	0.780
	2	11.67±0.18	1.560	1.560
	4	9.10±0.23	3.120	3.120
V. parahaemolyticus	0.5	29.41±0.15	0.390	0.390
ATCC 17802	1	18.89±0.12	0.780	0.780
	2	11.64±0.18	1.560	1.560
	4	8.78±0.21	3.120	3.120

ตารางที่ 4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาบ่มไคโตซาน 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนส

ชนิดเชื้อแบคทีเรีย	COS จากการบ่ม (ชั่วโมง)	บริเวณยับยั้ง (mm)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (µg/ml)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (µg/ml)
แกรมบวก				
B. cereus	0.5	31.16±0.19	0.195	0.195
ATCC 11778	1	20.23±0.15	0.390	0.390
	2	13.94±0.23	0.780	0.780
	4	10.84±0.21	1.560	1.560
L. monocytogenes	0.5	30.91±0.19	0.195	0.195
ATCC 15313	1	19.92±0.15	0.390	0.390
	2	12.26±0.23	0.780	12.500
	4	9.76±0.29	1.560	1.560
S. aureus	0.5	31.88±0.19	0.195	0.1950
ATCC 25923	1	19.43±0.18	0.390	0.3900
	2	12.78±0.24	0.780	0.780
	4	10.44±0.12	1.560	1.560
แกรมลบ				
E. coli	0.5	29.02±0.18	0.390	0.390
ATCC 25922	1	18.16±0.14	0.780	0.780
	2	11.96±0.12	1.560	1.560
	4	9.04±0.19	3.120	3.120
P. aeruginosa	0.5	29.89±0.12	0.390	0.390
ATCC 27853	1	18.99±0.15	0.780	0.780
	2	11.84±0.21	1.560	1.560
	4	9.76±0.23	3.120	3.120
V. parahaemolyticus	0.5	29.93±0.15	0.390	0.390
ATCC 17802	1	18.98±0.15	0.780	0.780
	2	11.94±0.23	1.560	1.560
	4	9.08±0.12	3.120	3.120

6. ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923, *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เท่ากับ 0.195, 0.390, 0.195, 0.390, 0.390, และ 0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 3 สำหรับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC)) *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923, *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เท่ากับ 0.195, 0.195, 0.195, 0.390, 0.390, และ 0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

7. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (MBC)

จากการทดสอบฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากย่อยไคตินในรูปคอลลอลยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923, *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เท่ากับ 0.195, 0.390, 0.195, 0.390, 0.390 และ 0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3) สำหรับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923, *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เท่ากับ 0.195, 0.195, 0.195, 0.390, 0.390 และ 0.390 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Rios & Recio (2005) และ Van Vuuren (2008) ที่แบ่งกลุ่มการออกฤทธิ์ของสารจากค่า MIC เป็น 3 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งดีค่า MIC น้อยกว่า 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 2. กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางค่า MIC อยู่ระหว่าง 1-2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 3 กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งอ่อนค่า MIC มากกว่า 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซาน

เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการบ่มทุกช่วงเวลาจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 มีฤทธิ์ยับยั้งดี โดยใช้เวลาในการบ่มน้อย 0.5 ชั่วโมงจะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือ มีค่า MIC และ MBC น้อยที่สุด เนื่องจากไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการบ่มน้อยจะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ จากไคตินในรูปคอลลอยด์มากเท่ากับ 93.74 เปอร์เซ็นต์ และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ จากไคโตซานมากเท่ากับ 94.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsai et al. (2000) ศึกษาไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากย่อยไคโตซานจากเปลือกกุ้งโดยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์คือ *E. coli*, *L. monocytogenes, S.* typhimurium และ *S. aureus* ได้ดีด้วยความเข้มข้น 5-29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Yamada et al. (1993) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ 6-8 หน่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีโดยใช้ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อีกทั้งจากงานวิจัยของ Ikigai et al. (1993) ศึกษาสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสามารถต้านทานสารประกอบพอลิฟีนอลิกได้สูงกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีสารลิโปพอลิแซคคาไรด์ช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรีย จึงสามารถป้องกันความเสียหายจากสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ รวมทั้งโครงสร้างของผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแกรมลบซับซ้อนกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการการย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ได้จากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 6 สายพันธุ์ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.195-0.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น Benhabiles et al. (2012) ศึกษาการใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยไคโตซานด้วยเอนไซม์ปาเปนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 12 สายพันธุ์พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Laoluldilok et al. (2017) ศึกษาการใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยไคโตซานด้วยเอนไซม์ปาเปนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 4 สายพันธุ์พบว่าค่า MIC อยู่ในช่วง 16-32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Tsai et al. (2000) ศึกษาการใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยไคโตซานเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์เซลลูเลสยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 10 สายพันธุ์ของ พบว่า มีค่า MIC อยู่ในช่วง 5-29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดโมเลกุล 6-8 หน่วย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี เพราะไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดโมเลกุล 6-8 หน่วย สามารถผ่านชั้นผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเข้าไปภายในเซลล์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการแสดงออกของยีน (Gene Expression) (Tsai & Su, 1999)

สรุป

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มีอายุ 2 สัปดาห์ จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_5$ $(GlcNAc)_6$, $(GlcNAc)_7$ และ $(GlcNAc)_8$ เท่ากับ 93.74 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAC)_2$, $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_4$ และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ เท่ากับ 94.09

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcN)_1$, $(GlcN)_2$, $(GlcN)_3$ $(GlcN)_4$, เมื่อเปรียบเทียบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากากรย่อยด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจะมีร้อยละของโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนสเล็กน้อยคือ 0.35

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากากรย่อยด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสและเอนไซม์ไคติเนสสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก 3 สายพันธุ์คือ *B. cereus* ATCC 11778*, L. monocytogenes* ATCC 15313*, S. aureus* ATCC 25923 เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 3 สายพันธุ์คือ *E. col* ATCC 25922*, P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากัน ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากากรย่อยด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสเข้มข้นน้อยกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากากรย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส เนื่องมาจากไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสมีปริมาณมากกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส เพราะโมเลกุลขนาดใหญ่ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_5$, $(GlcN)_6$, $(GlcN)_7$ และ $(GlcN)_8$ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง จะมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. นำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไปใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระในอาหารบางชนิด
2. แยกไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตามขนาดต่าง ๆ ให้บริสุทธิ์เพื่อเพิ่มมูลค่า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

เอกสารอ้างอิง

มานะ ขาวเมฆ. (2562ก). การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยไคโตซาเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข.6 และข้าวฟ่าง เคยู 630. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**,14(3), 62-71.

มานะ ขาวเมฆ. (2562ข). การตรวจหา คุณลักษณะ และการยับยั้งเชื้อราของไคโตซาเนสจากพืชไทย. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 14(1), 1-10.

มานะ ขาวเมฆ. (2563). ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 15(2), 119-130.

มานะ ขาวเมฆ. (2565). ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 17(3), 17-31.

มานะ ขาวเมฆ, และวรางคณา เทศทอง. (2564). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้าน. **วารสารวิจัยและนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 2(2), 16-27.

Baureithel, K., Felix, G. & Boller, T. (1994). Specific, High Affinity Binding of Chitin Fragments Tomato Cells and Membranes, Competitive Inhibition of Binding by Derivatives of Chitooligosaccharides and a Nod Factor of Rhizobium. **Journal of Biological Chemistry**, 269(27), 17931-8.

Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A. & Mameri, N. (2012). Antibacterial Activity of Chitin, Chitosan and its Oligomers Prepared from Shrimp Shell Waste. **Food Hydrocolloids**, 29, 48-56.

Berger, L. R. & Reynold, D. M. (1958). The Chitinase System of a Strain of Griseus. **Biochimica et Biophysica Acta**, 29(3), 522–534.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. & Vogeli, U. (1983). Chitinase in Bean Leaves: Induction by Ethylene, Purification, Properties and Possible Function. **Planta**, 157, 22-31.

Chernin, L. S., Fuente, L. D., Sobolev, L. V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. & Chet, I. (1997). Molecular Cloning, Structural Analysis and Expression in *Escherichia coli* of a Chitinase Gene from *Enterobacter agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(3), 834–839.

Cockerill, F. R., Hindler, J. A., Wikler, M. A., Patel, J. B., Alder, J. & Powell, M. (2012a). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-eleventh Edition**, CLSI document M02-A11. Vol.32 no.1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania USA.

Cockerill, F. R., Hindler, J. A., Wikler, M. A., Patel, J. B., Alder, J. & Powell, M. (2012b). Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Vol.32 no.2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania USA.

Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C. & Gois, J. R. (2010). Drug Delivery System: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments. **EPMA Journal**, 1(1), 164-209.

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.

Ikigai, H., Nakae T., Hara, Y. & Shimamura,T. (1993). Bactericidal Catechins Damage the Lipid Bilayer. **Biochimica et BiophysicaActa**, 1147(1), 132–136.

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.

Laokuldiloka, T., Potivasa, T., Kanhaa, N., Surawanga, S., Seesuriyachana, T., Wangtueaia, S., Phimolsiripola, Y., & Regensteina, J. M. (2017). Physicochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Chitooligosaccharides Produced Using three Different Enzyme Treatments. **Food Bioscience**, 18, 28-33.

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.

Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., Hong, S. H., Choi, S. H. & Jung, W. J. (2017). Antifungal Activity and Patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide Degradation via Chitinase Produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. **Microbial Pathogenesis**, 113, 218–224.

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.

Rios, J. L. & Recio, M. C. (2005). Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100(1), 80-84.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N. & Kotan, R. (2014.) Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* Bacteria TV-125, Investigation of Kinetic Properties and Antifungal Activity against *Fusarium culmorum*. **Analytical of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 13(1), 3-41.

Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K. & Maliarik, M. J. (1993). Identification of a Novel High-Affinity Binding Site for N-acetylchitooligosaccharide Elicitor in the Plasma Membrane Fraction from Suspension-Cultured Rice Cells. **Federation of European Biochemical Societies**, 329, 75–78.

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.

Tsai, G. J. & Su, W. H. (1999). Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, 62, 239-243.

Tsai, G. J., Wu, Z. Y. & Su, W. H. (2000). Antibacterial Activity of a Chitooligosaccharide Mixture Prepared by Cellulase Digestion of Shrimp Chitosan and Its Application to Milk Preservation. **Journal of Food Protection**, 63(6), 747-752.

Van Vuuren, S. F. (2008). Antimicrobial Activity of South African Medicinal Plants. **Journal of Ethno-pharmacology**, 119(3), 462-472.

Yamada, A., Shibuya, N. & Kodama, O. (1993). Induction of Phytolexin Formation in Suspension-cultured Rice by N-Acetyl-chitooligodaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 57(3), 405-409.

Yan, W., Peigen, Z., Jianxing, Y., Xiaorong, P., Pingping, W., Weiqing, L. & Shendan, T. (2007). Antimicrobial Effect of Chitooligosaccharides Produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 16(1), 174-177.