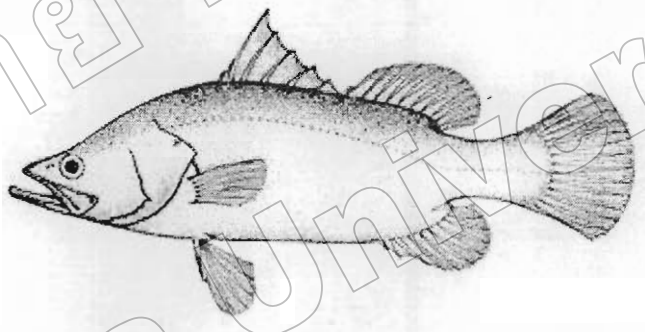
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) มีชื่อสามัญเรียกว่า Giant Perch หรือ Asian seabass หรือ Barramundi มีลักษณะปากกว้างถึงบริเวณหลังตา บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง จะมีสีเทาปนดำบาง ๆ หลังโหนก มีเนื้อมาก โดยทั่วไปปลากะพงขาวเป็นปลาที่กินอาหารมีชีวิตแต่สามารถปรับให้กินเนื้อปลาสดได้ (ฐานันดร์ ทัตตานนท์, 2549)



ภาพที่ 1 ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Bloch) ขนาดโตเต็มวัย (FAO, 2008)

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ของไทยทั้งในแม่น้ำ คลอง ชายฝั่งทะเลทั้งด้านอ่าวไทยและอันดามัน เป็นปลาที่ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมง่าย จึงสามารถนำมาเลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำทะเล มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื้อมีรสชาติอร่อย รับประทานได้ง่าย เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั่วไปทั้งในและนอกประเทศ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549)

รูปแบบการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทย มี 4 รูปแบบ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่เป็นผลพลอยได้จากนาข้าวและนากุ้ง บ่อดิน และกระชัง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549) จากสถิติฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาน้ำกร่อยประจำปี 2545 (กรมประมง, 2547) รายงานว่า ผลผลิตปลากะพงขาวจากการเพาะเลี้ยงทั่วประเทศรวมทั้งสิ้น 11,032.06 ตัน โดยแบ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในกระชัง 9,987.92 ตัน และจากการเพาะเลี้ยงในบ่อ 1044.14 ตัน ผลผลิตรวมดังกล่าวคิดเป็นร้อยละ 90.41 ของผลผลิตปลาน้ำกร่อยทั่วประเทศ เห็นได้ว่า ปลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กะพงขาวมีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในการผลิตปลากะพงขาวขนาดใหญ่ ปลากะพงขาวที่เป็นผลพลอยได้จากนาข้าวหรือนากุ้ง รวมไปถึงการผลิตลูกปลาทั้งในภาครัฐและเอกชน โดยลูกปลากะพงขาวส่วนใหญ่จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงภายในประเทศ และส่งออกไปยังต่างประเทศเป็นอีกส่วนน้อยเท่านั้น (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2549)

ปัญหาการตายของปลากะพงขาวในการเพาะเลี้ยงมีแนวโน้มมาจากความเครียดจากการถูกกักขังในที่แคบ การเลี้ยงอย่างหนาแน่น และสิ่งแวดล้อม เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไป (Sakai, 1999; ชนกันต์ จิตมนัส, 2545; ปภาศิริ บาร์เนท, 2549) โรคที่พบได้บ่อยในปลากะพงขาวมีสาเหตุมาจากโปรโตซัว พยาธิ ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งโรคที่เป็นปัญหาและก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงต่อธุรกิจเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวมีสาเหตุมาจากโรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสำคัญ โดยสามารถแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp. และ *Norcardia* spp. แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Vibrio vulnificus*, *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* และกลุ่ม Enterobactericeae (ปภาศิริ บาร์เนท, 2549) ปัญหาโรคติดเชื้อในระบบเพาะเลี้ยงส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของปลาลดต่ำ อัตราป่วยและตายสูง (Skjermo & Vadstein, 1999) ดังนั้น การจัดการเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในระบบการเลี้ยงควบคู่ไปกับการเพิ่มความต้านทานโรคให้แก่ปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะ (Specific immunity) ด้วยการให้วัคซีนที่จำเพาะต่อโรค และแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) ด้วยการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) จึงเป็นสิ่งที่เกษตรกรผู้เลี้ยงควรตระหนักและให้ความสำคัญ (Sakai, 1999; Skjermo & Vadstein, 1999; ชนกันต์ จิตมนัส, 2545; ปภาศิริ บาร์เนท, 2549)

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Fish immunity)

ภูมิคุ้มกันของปลานั้นใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยส่วนใหญ่สุขภาพปลาจะขึ้นกับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) ถือเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่าง ๆ และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการป้องกันการระบาดของโรคติดเชื้อในลูกปลาวัยอ่อน ในขณะที่ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific immunity) มีการพัฒนาช้ากว่าในการป้องกันการติดเชื้อครั้งแรก แต่จะมีความจำ (Immunological memory) ทำให้ปลาตอบสนองต่อการกระตุ้นจากการสัมผัสหรือติดเชื้อชนิดเดียวกันในครั้งต่อไปได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง (ชนกันต์ จิตมนัส, 2545)

หากพิจารณาตามลักษณะการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองชนิดแล้ว ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับเซลล์ (Cellular immunity) และภูมิคุ้มกันสารน้ำ (Humoral immunity) ภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์จะประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(Phagocytic cells) ได้แก่ เซลล์มาโครฟาจ (Macrophage) และนิวโตรฟิล (Neutrophil) นอกจากนี้ยังรวมไปถึงเซลล์ที่เรียกว่า Nonspecific cytotoxic cell (NCC) ที่มีความสามารถคล้ายกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เรียกว่า Natural killer cell (NK cell) ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง และเซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวก T และ B lymphocytes ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ สำหรับภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำนั้นมีหลายชนิด เช่น ระบบคอมพลีเมนต์ (Complement) ทำหน้าที่ช่วยเสริมการทำงานการกลืนกินของเซลล์ (Phagocytosis) อีกทั้งยังมีระบบเอนไซม์สำคัญอย่างไลโซไซม์ (Lysozyme) ช่วยในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย สารยับยั้งการเจริญและการทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น transferrin, interferon, protease inhibitor และ C-reactive protein ที่ทำหน้าที่ร่วมกับระบบคอมพลีเมนต์ รวมไปถึงไซโตคายน์ (Cytokines) ต่าง ๆ ที่ช่วยส่งสัญญาณในการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2545; Magnadottir, 2006; Saurabh & Sahoo, 2008)

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ความหนาแน่นในการเลี้ยง คุณภาพน้ำ ความเค็ม อุณหภูมิ โภชนาการ การวางยาสลบ ล้วนแต่ทำให้ปลาเกิดความเครียด (Stress) เมื่อร่างกายปลาหลั่ง corticosteroids ที่ออกมาตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น จะทำให้การทำงานของ lysozyme ลดลง จำนวน lymphocyte ต่ำ และรวมถึงการสร้างแอนติบอดีที่ลดลงด้วย (Barton, 1997) แสดงว่าความเครียดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อภูมิคุ้มกันทั้งชนิดจำเพาะและไม่จำเพาะของปลา

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หมายถึง สารที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยให้ระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์เพิ่มสูงขึ้นและสามารถต้านทานการรุกรานของเชื้อโรคได้ในที่สุด ทั้งนี้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ผสมในอาหารปลานั้นสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ ในขณะที่ Antigenic substances เช่น แบคทีรีน หรือวัคซีน จะกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและเกิดการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะออกมาตอบสนองได้ยาวนานกว่า (Gannam & Schrock, 2001) สำหรับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่นิยมนำมาศึกษาเพื่อใช้ในวงการสัตว์น้ำนั้นส่วนใหญ่เป็นสารที่ผลิตได้จากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากเชื้อราหรือยีสต์ แบคทีเรีย โพลิแซคคาไรด์ พืชสมุนไพรต่าง ๆ ฮอร์โมน เป็นต้น (Sakai, 1999; Gannam & Schrock, 2001)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

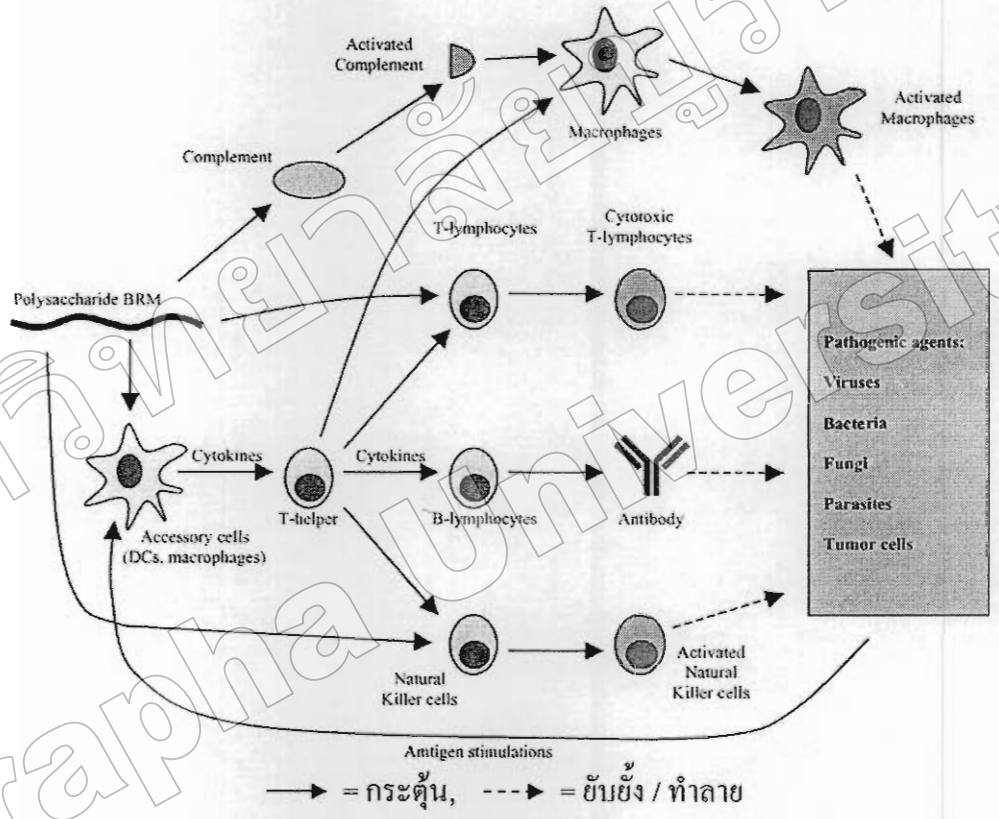
ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงปลาและกุ้ง (ดัดแปลงจาก Sakai, 1999)

สารสังเคราะห์ (Synthetic chemicals)
Levamisole
สารชีวภาพ (Biological substances)
1. แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (Bacterial derivatives)
Beta-glucan
Peptidoglucan (*Brevibacterium lactofermentum*; *Vibrio* sp.)
LPS (lipopolysaccharide)
Vibrio anguillarum cells (Vibrio vaccine)
2. สารประกอบจำพวกโพลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides)
Chitin-chitosan
Lentinan
Oligosaccharide
3. Animal and plant extracts
Ete (Tunicate)
Hde (Abalone)
Firefly squid
Quillaja saponin (soap tree)
Glycyrrhizin (licorice)
4. Nutritional factors
Vitamin C
Vitamin E
5. Hormones, cytokines and others
Lactoferrin
Interferon
Growth hormone
Prolactin

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Polysaccharide Biological Response Modifiers

สารที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ เรียกว่า Biological response modifiers (BRMs) ฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นจากโพลิแซคคาไรด์ไปจับกับตัวรับที่เรียกว่า Pattern Recognition Receptors (PRRs) หรือโปรตีนในพลาสมา แล้วไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งโดยตรงหรือโดยอ้อม นำไปสู่การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของร่างกายในที่สุด (Leung et al., 2006)



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดย Polysaccharide BRMs (Leung et al., 2006)

PRRs ต่อ Polysaccharide BRMs สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Toll-like receptors (TLRs) และ scavenger receptors (SRs) (Leung et al., 2006) เราสามารถพบ TLRs ได้ในปลา zebrafish และ pufferfish เช่นเดียวกับ TLRs ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Bricknell & Dalmo, 2005) ตัวรับดังกล่าวมีความจำเพาะต่อโครงสร้างและรูปแบบของส่วนประกอบต่าง ๆ จากเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะ SRs ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ตรวจพบการแสดงออกของ SRs ได้แก่ เซลล์มาโครฟาจ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Dendritic cell, เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ SRs ที่มีความจำเพาะต่อ Polysaccharide BRMs จัดเป็น Class A SR ตัวรับเหล่านี้ได้แก่ β-glucan receptor, Mannose receptor และ Complement receptor type 3 สำหรับโปรตีนในพลาสมาที่สามารถจับกับ Polysaccharide BRMs ได้แก่ Mannose binding lectin (MBL) ในระบบ Lectin complement pathway และโปรตีนในระบบคอมพลีเม้นต์ทั้งแบบ Alternative and classical pathway โปรตีนชนิด MBL สามารถจับกับ Residues ของโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อ เช่น Mannose, *N*-acetylglucosamine, Fucose และ Glucose การจับระหว่าง MBL และ residues เหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ Lectin complement pathway และทำให้เกิดการตอบสนองการติดเชื้อในรูปแบบของการอักเสบขึ้น (Leung et al., 2006)

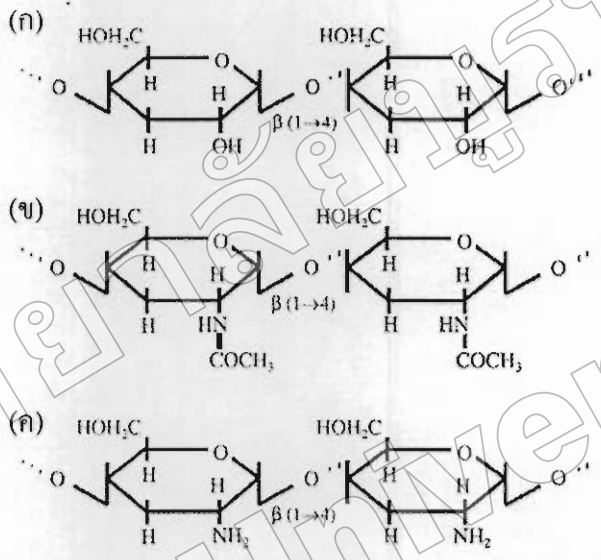
ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของโพลิแซคคาไรด์ BRMs ได้แก่ ค่าประจุ มวลโมเลกุล สายโซ่กิ่ง และ Conformation ของน้ำตาล โดยฤทธิ์ทางชีวภาพของ β-glucan และ Mannan จะเพิ่มขึ้นตามมวลโมเลกุลเนื่องจากขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ย่อมมีจำนวน Repeating units มาก เป็นการเพิ่ม Valency และเพิ่มโอกาสในการจับกับโปรตีนตัวรับได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่า β-glucan ที่มีสายโซ่กิ่งจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า (Leung et al., 2006)

ไคติน-ไคโตซาน (Chitin-chitosan)

ไคติน-ไคโตซาน เป็นสารโพลิเมอร์ชีวภาพ ประเภทสารประกอบแป้งน้ำตาล (Polysaccharide) จัดอยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตผสม กล่าวคือ มีองค์ประกอบเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีธาตุไนโตรเจนประกอบอยู่ด้วย (มนต์สรวง ยางทอง, 2549) และด้วยความเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีคุณสมบัติโดดเด่นและมีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาตินี้เอง ทำให้ไคตินและไคโตซานจึงเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

ไคตินมีโครงสร้างเป็นสายยาวที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลหน่วยย่อยที่เรียกว่า N-acetyl-D-glucosamine มาเรียงต่อกัน คล้ายคลึงกับเซลลูโลสจากพืช (เยาวภา ไหวพริบ, 2547) ไคตินมีชื่อทางเคมีว่า Poly [β-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] และมีโครงสร้างที่แตกต่างกับเซลลูโลสตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของเซลลูโลสเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ในขณะที่ไคตินจะเป็นหมู่อะซีตามิโด (acetamido groups ($-NH(C=O)CH_3$)) (มนต์สรวง ยางทอง, 2549) ส่วนไคโตซาน คืออนุพันธ์ตัวหนึ่งของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลของไคตินหรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา deacetylation ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกตั้งแต่ 50% ขึ้นไป กลายเป็นโพลีเมอร์ของหน่วยย่อยที่ชื่อว่า glucosamine แทน

(เยาวภา ไหวพริบ, 2547) ซึ่งไคโตซานที่ได้นี้มีชื่อทางเคมีว่า Poly [β-(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] เป็นโพลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมดและน้ำที่มีค่า pH เป็นกลางหรือด่าง แต่สามารถละลายในกรดอ่อน เช่น น้ำส้มสายชู เป็นต้น โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคตินและไคโตซานแสดงไว้ในภาพที่ 3(ก), 3(ข) และ 3(ค) ตามลำดับ



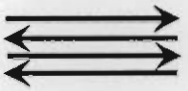
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) เซลลูโลส (ข) ไคติน และ (ค) ไคโตซาน (Hossain et al., 2007)

โดยทั่วไปแล้วในธรรมชาติเรามักไม่พบไคตินที่เป็นโครงสร้างหลักเดี่ยว ๆ ในสิ่งมีชีวิต แต่จะพบไคตินและไคโตซานปนกันรวมไปถึงในรูปที่เป็นสารประกอบปะปนอยู่กับสารอื่น ๆ เช่น อยู่รวมกับหินปูน หรือแคลเซียม และโปรตีน ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน (มนต์สรวง ยางทอง, 2549)

ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่งมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกัน โดยแบ่งตามรูปแบบการจัดเรียงตัวของเส้นใยเป็น 3 ลักษณะ ได้แก่ แอลฟ่าไคติน (α-chitin), เบต้าไคติน (β-chitin), และแกมม่าไคติน (γ-chitin) (เยาวภา ไหวพริบ, 2547) ดังแสดงในภาพที่ 4 ไคตินที่เกิดในคิวติเคิล (Cuticle) ของรา แมลง กุ้งและปูส่วนใหญ่อยู่ในรูปแอลฟ่าไคตินซึ่งมีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกัน (Anti-parallel) และมีความแข็งแรงสูง ส่วนไคตินที่พบมากในพวกมอลลัสกา คือ หอย หรือในแกนปลาหมึกนั้นเป็นเบต้าไคติน ซึ่งมีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน (Parallel) จึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบแอลฟ่า ดังนั้นจึงมีโอกาสที่เบต้าไคตินสามารถจะเปลี่ยนแปลงรูปแบบไปเป็นแอลฟ่าไคตินได้ใน

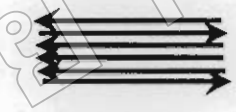
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารละลายของกรดแก่ เช่น กรดเกลือ เป็นต้น สำหรับแกมม่าไคตินเป็นโครงสร้างผสมระหว่างแอลฟ่าและเบต้าไคติน มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะที่ไม่แน่นอน (สวนทางกันสลับทิศทางเดียวกัน) มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา พบได้มากในเห็ด รา พืชชั้นต่ำ และปลอกหุ้มไข่ของตัวด้วงปีกแข็งชนิด *Ptinus tectus* และ *Rhychaenus fagi* (มนต์สรวง ยางทอง, 2549)



(ก) แบบแอลฟ่า (α-chitin)

(ข) แบบเบตา (β-chitin)



(ค) แบบแกมม่า (γ-chitin)

ภาพที่ 4 โครงสร้างการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคติน3 รูปแบบ

การผลิตไคติน ไคโตซานด้วยวิธีทางเคมี

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันในการผลิตไคติน-ไคโตซานระดับเชิงพาณิชย์ มี 3 ขั้นตอนสำคัญ ได้แก่ การกำจัดโปรตีน การกำจัดแร่ธาตุ และการกำจัดหมู่อะซิทิล (เยาวภา ไหวพริบ, 2547) ได้แก่

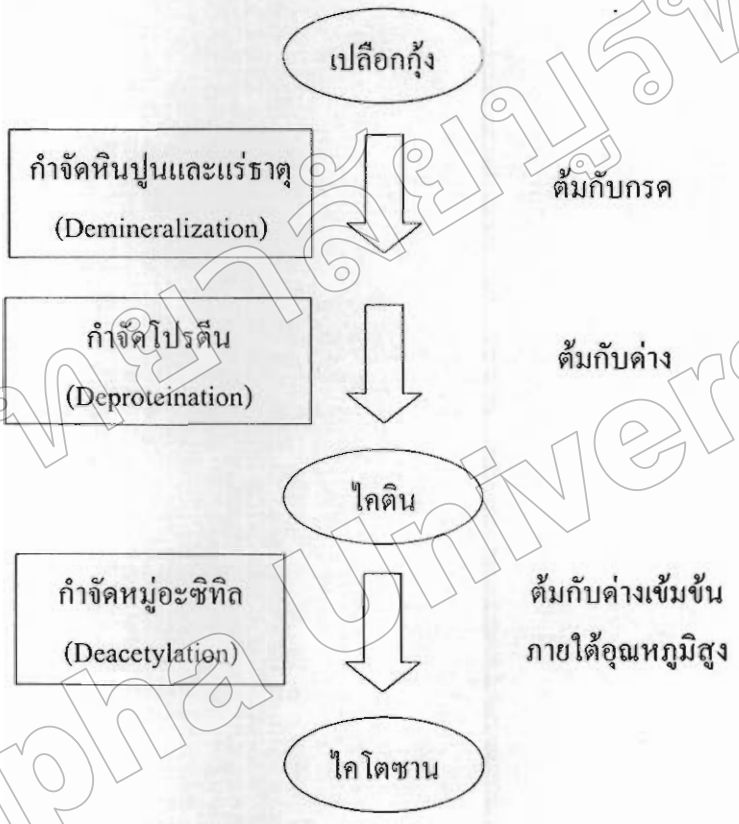
1. กระบวนการกำจัดโปรตีน (Deproteination) โดยนำมาทำปฏิกิริยากับด่างเข้มข้น ซึ่งส่วนใหญ่ใช้โซดาไฟ (NaOH) โปรตีนส่วนใหญ่พร้อมกับไขมันบางส่วนและรงควัตถุบางชนิดจะถูกขจัดออกไปจากวัตถุดิบในกระบวนการนี้ การพิจารณาใช้กระบวนการนี้จะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบที่จะนำมาใช้

2. กระบวนการกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization) โดยนำวัตถุดิบกำจัดโปรตีนออกแล้วมาทำปฏิกิริยากับกรดซึ่งส่วนมากใช้กรดเกลือ (HCl) ดังนั้น แร่ธาตุส่วนใหญ่อันได้แก่ หินปูน (calcium carbonate, $CaCO_3$) จะถูกกำจัดออกไปโดยเปลี่ยนไปเป็นก๊าซ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้จะได้เป็นไคตินออกมา ทั้งนี้ขั้นตอนกำจัดโปรตีนและการกำจัดแร่ธาตุสามารถทำสลับก่อนหลังได้

3. กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิทิล (Deacetylation) ใช้กำจัดหรือลดหมู่อะซิทิล (CH_3CO-) บนโมเลกุลของไคติน โดยใช้ด่างที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40% ขึ้นไป เพื่อให้เกิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เป็นไคโตซานซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน ($-NH_2$) บนโมเลกุลของไคตินแทน หมู่อะมิโนนี้เองที่มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลายซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้น เพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก (Cation) กล่าวได้ว่า ในขณะที่มีการลดลงของหน่วยย่อย N-acetyl glucosamine ก็ย่อมเป็นการเพิ่มขึ้นของหน่วยย่อย glucosamine ในปริมาณที่เท่ากันด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 5 หลักการสำคัญในการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

การจัดระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลหรือเรียกว่า Degree of Deacetylation นั้นมีค่าเป็นร้อยละ (% DD) โดยค่าของ %DD ที่เปลี่ยนแปลงไปย่อมแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางโครงสร้างและเคมีของไคตินและไคโตซานด้วย ทั้งคุณสมบัติด้านการละลาย, Rhelogical และ chelating จึงเรียกได้ว่า %DD เป็นค่าสำคัญที่สะท้อนถึงการเกิดปฏิกิริยาที่ว่องไวกว่ากลุ่มของ N-acetyl-D-glucosamine ในไคติน กล่าวคือเมื่อในโพลิเมอร์มีค่า % DD เกินกว่า 60 % ขึ้นไป การกระจายไคโตซานในกรดอินทรีย์จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนหมู่อะมิโนของ glucosamine ทำให้มีความสามารถในการรับโปรตรอนจากสารละลายได้เพิ่มขึ้น เป็นผลให้การละลายดีขึ้น เพราะมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สมบัติของประจุบวกเพิ่มขึ้น (Polycationic activity) บนโพลิเมอร์ ดังนั้นไคโตซานจึงสามารถละลายได้ดีขึ้นในกรดอินทรีย์ ส่วนไคตินนั้นไม่ละลายในกรดอ่อนแต่จะละลายได้ในกรดอนินทรีย์ที่เข้มข้นสูง ๆ ซึ่งจากคุณสมบัตินี้เองทำให้มีการนำกรดอินทรีย์มาเป็นตัวทำละลายเพื่อใช้ละลายไคโตซานในน้ำ จึงได้เป็นสารละลายไคโตซานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกิจกรรมต่าง ๆ ต่อไป ในขณะที่การนำไคตินไปใช้ในรูปสารละลายนั้นเป็นไปได้ยากกว่า ดังนั้นก่อนนำไคโตซานมาใช้ ผู้ใช้ควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ของสมบัติทางเคมีกายภาพที่มีผลต่อสมบัติการใช้งานด้วย เพื่อให้เกิดการใช้ไคโตซานอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด (เยาวภา ไหวพริบ, 2547)

บทบาทของไคโตซานต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จากการศึกษาของมนต์สรวง ยางทอง (2549) รายงานว่า มี 4 ด้าน ได้แก่

1. การจัดการคุณภาพน้ำและดูดซับโลหะหนัก โดยหมู่อะมิโนของไคโตซานจะแตกตัวให้ประจุบวก ทำให้อนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุเป็นลบเข้ามาเกาะรวมกันกลายเป็นกลุ่มก้อนใหญ่ขึ้นจนตกตะกอนได้ (เยาวภา ไหวพริบ, 2547) โดยจากการศึกษาของ Chung et al. (2005) พบว่าเมื่อใช้ไคโตซานขนาดโมเลกุลสูงจะช่วยลดความขุ่น suspended solids BOD COD ได้ดี ในขณะที่ขนาดโมเลกุลต่ำ ๆ จะช่วยลดแอมโมเนียและฟอสเฟตลงได้ นอกจากนี้ ยังช่วยลดแบคทีเรียในน้ำทิ้งจากบ่อเลี้ยงด้วย สำหรับการดูดซับโลหะหนักนั้น มีรายงานว่าไคโตซานสามารถดูดซับโลหะหนักได้เกิดเป็นพันธะเชิงซ้อน (Coordinate) โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของไคโตซานเป็นตัวให้อิเลคตรอนกับโลหะหนัก

2. ควบคุมการปลดปล่อยวัคซีน โดยใช้ไคโตซานคลือบหุ้มแอนติเจนในวัคซีนที่ให้และควบคุมตำแหน่งของการปล่อยวัคซีนให้ออกฤทธิ์ โดยเลือกใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมกับระดับพีเอชของบริเวณที่ต้องการให้ออกฤทธิ์ได้ ทั้งนี้การศึกษาของ Kumar et al. (2008) พบว่าสามารถใช้ไคโตซานอนุภาคนาโน (nanoparticle) เป็นตัวพาวัคซีน (DNA vaccine) ชนิดกินเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ *V. anguillarum* ให้กับลูกปลากะพงขาวได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tian et al. (2008) ที่ประสบความสำเร็จในการทำวัคซีนป้องกันโรค Lymphocystis Disease Virus (LCDV) ชนิดกินในปลา Japanese flounder (*P. olivaceus*) โดยการใช้ไคโตซานหุ้มห่อ plasmid DNA (microencapsulation) ไว้ อย่างไรก็ดี ยังคงมีข้อจำกัดในการใช้ไคโตซานเพื่อควบคุมการปลดปล่อยวัคซีนชนิด Plasmid DNA ที่ให้ด้วยวิธีแช่ (Immersion) ในลูกปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เนื่องจากการทดลองของ Romøren et al. (2002) แสดงให้เห็นว่า พิษของไคโตซานในวัคซีนจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้เป็นสำคัญ (10-15 μg/ml และ 160 kDa ตามลำดับ) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หน้านี้ของ Bullock et al. (2000) ที่พบว่า การเลี้ยงลูกปลาเทราท์สายรุ้งในน้ำผสมไคโตซานเข้มข้น 0.038-0.75 ppm มีผลให้ลูกปลาตายภายใน 1-14 วัน เนื่องจากประจุบวกบนไคโตซานเข้าจับประจุลบที่อยู่บนพื้นผิวของเหงือกลูกปลา ทำให้เกิดการอุดตันขัดขวางการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนกับน้ำ และทำให้ลูกปลาเกิดภาวะขาดออกซิเจนเฉียบพลัน (Acute hypoxia) ตายในที่สุด

3. อาหารเสริม ช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อและเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้ง โดย นิวัฒน์ วงษ์พยัคฆ์ (2545) ศึกษาพบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่เคลือบสารละลายไคโตซานมีแนวโน้มการเจริญเติบโตสูงกว่ากุ้งที่กินอาหารไม่ได้เคลือบไคโตซาน นอกจากนี้ การเสริมไคโตซานสามารถช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของปลาคาร์พ (*C. carpio*) ได้ด้วย (Gopalakannan & Arul, 2006; อนวัช บุญญภักดี และคณะ, 2550) อย่างไรก็ดี จากการศึกษาของ Shiau and Yu (1999) กลับพบว่า การเสริมอาหารเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) ด้วยไคโตซานตั้งแต่ร้อยละ 2 ขึ้นไป ทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ

4. กระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในปลาและกุ้ง เนื่องจากไคโตซานเป็นสารจำพวกโพลิแซคคาไรด์ สำหรับการทดลองในกุ้งนั้น Wang and Chen (2005) ได้ทดลองฉีดไคโตซานปริมาณ 2-8 μg/g ให้กับกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ผลการทดลองพบว่าสามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดจากการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ และทำให้จำนวนเม็ดเลือดรวม (Total haemocyte count) ความสามารถในการทำลายเชื้อโรคโดยอาศัยออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) การทำงานของเอนไซม์ Phenoloxidase และประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนทำลายของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) เพิ่มสูงขึ้นด้วย

การศึกษาผลของไคโตซานต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาในหลอดทดลอง (*In vitro*) นั้น พบว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวในไตส่วนหน้า (Head kidney) ของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) ให้ผลิต superoxide anion สูงขึ้นได้ (Hoffman et al., 1997) สำหรับการทดลองในสัตว์มีชีวิต (*In vivo*) โดย Siwicki et al. (1994) พบว่าการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหารเม็ด เป็นเวลา 7 วัน สามารถช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ด้วยการเพิ่ม Neutrophil oxidative radical production, myeloperoxidase activity, phagocytic index และ neutrophil killing activity ของเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้น การศึกษาต่อมาของ Gopalakannan and Arul (2006) พบว่าการทดลองเสริมอาหารด้วยไคโตซานร้อยละ 1 ของน้ำหนักอาหารสามารถกระตุ้นการทำงานของ Lysozyme และความสามารถในการทำลายเชื้อโรคโดยอาศัยออกซิเจน (ROS) ของปลาคาร์พ (*C. carpio*) เพิ่มสูงขึ้นได้ ที่สำคัญ ยังมีอัตรารอดจากการทดสอบการติดเชื้อด้วย *Aeromonas hydrophila* สูงถึง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ร้อยละ 80 หลังการเลี้ยงด้วยอาหารเสริมไคโตซานติดต่อกันนาน 45 วัน นอกจากนี้ การทดลองภายหลังในปลาทะเล เช่น *P. olivaceus* พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ เมื่อปลาได้รับอาหารเม็ดที่เคลือบด้วยสารละลายไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 1 นาน 12 สัปดาห์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ Myeloperoxidase activity, Neutrophil respiratory burst และ skin mucus lysozyme activity เพิ่มสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุม (Cha et al., 2008)

กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตซาน

เมื่อไคโตซานเข้าสู่ร่างกายหนูทดลองโดยวิธี Oral administration ไคโตซานจะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum (Zeng et al., 2008) ซึ่งเป็นบริเวณที่ Antigen Presenting Cells (APCs) มีการ uptake ไคโตซานเข้าสู่เซลล์ (Porporatto et al., 2005) ก่อนแพร่กระจายสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองสำคัญอย่าง Peyer's patch (PP), Mesenteric Lymphnode (MLN) ม้าม และไธมัส และยังแพร่กระจายไปสะสมยังอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด (Porporatto et al., 2005; Zeng et al., 2008) ทั้งนี้จากการศึกษาของ Zeng et al. (2008) พบว่า ไคโตซานชนิดละลายน้ำ (M_w = 3.91 x 10^3, 52.6 %DD) สามารถสะสมในม้ามและไธมัสได้ดีกว่าไคโตซานชนิดอื่น ๆ ในระยะเวลาที่เท่ากัน บทบาทของไคโตซานต่อเซลล์ภูมิคุ้มกันนั้น Porporatto et al. (2003, 2005) พบว่า ไคโตซานมีศักยภาพในการกระตุ้นการทำงานของ APCs และ T cell ได้ นอกจากนี้ ไคโตซานยังสามารถเข้าจับกับ MR บนเซลล์มาโครฟาจก่อนถูก uptake เข้าสู่เซลล์ และกระตุ้นให้มาโครฟาจสร้าง Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) และ TNF α มากกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ (Mori et al., 2005; Han et al., 2005)

นอกจากนี้ ไคโตซานสามารถช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารทางลำไส้ได้โดยเพิ่ม Permeability ของเซลล์เยื่อบุลำไส้ (Artursson et al., 1994; Kotzé et al., 1998) ส่งเสริมให้สารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ร่างกายปลาจึงใช้ประโยชน์จากสารอาหารได้เต็มที่ ทำให้ปลาเจริญเติบโตดี

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลการศึกษาของ Siwicki et al. (1994) พบว่า การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหาร เลี้ยงปลา Rainbow trout เป็นเวลา 7 วัน ทำให้ Neutrophil oxidative radical production, myeloperoxidase activity, phagocytic index และ neutrophil killing activity ของเม็ด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เลือดขาวเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่ค่าเม็ดเลือดอัดแน่น (Haematocrit) และจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือดไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

Hoffman et al. (1997) ทดลองบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากไตส่วนหน้า ของปลา Atlantic Salmon, (*S. salar*, L.) กับสารละลายไคโตซาน (min. 80 %DD) เป็นเวลา 2 และ 7 วัน พบว่า เซลล์ที่บ่มในสารละลาย chitooligomer นาน 2 วัน สามารถสร้าง superoxide anion ได้มากกว่าเซลล์ที่บ่มด้วยสารละลายไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า และเมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารละลายไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลสูงนาน 7 วัน การผลิต superoxide anion จะเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

Shiau and Yu (1999) ศึกษาเปรียบเทียบผลระหว่างการเสริมไคตินและไคโตซานในอาหารเลี้ยงปลานิล (*O. niloticus x O. aureus*) เข้มข้น 0, 2, 5 และ 10 เปอร์เซนต์ ทดลองเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ พบว่าการเสริมไคตินและไคโตซานทำให้อัตราแลกเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR) สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเสริมไคโตซานมีผลลดน้ำหนักปลามากกว่ากลุ่มที่เสริมไคติน ($P<0.05$)

เมื่อศึกษาผลของไคโตซานต่อ Arginine metabolic pathways ของมาโครฟาจในหนูทดลอง พบว่าไคโตซานชนิดมวลโมเลกุลต่ำ (LMW, 50 kDa, 75-80 %DD) มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้น resident macrophage ทั้ง nitric oxide synthase (iNOS) and arginase pathways ในขณะที่การทดลองใน inflammatory macrophage จะพบว่า LMW จะกระตุ้น arginase activity ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) (Porporatto et al., 2003)

Mori et al. (2004) ทดลองใช้ไคโตซานในมาโครฟาจของหนู Mice พบว่าไคโตซานทำให้เกิด cell apoptosis และเกิดเซลล์ตายคิดเป็น 58.3% และ 18.6% ภายใน 12 ชั่วโมงหลังสัมผัสกับไคโตซานและไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ (MW 400-20,000) ตามลำดับ และเมื่อติดตาม macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) ด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ไคโตซานมีศักยภาพในการกระตุ้นให้มาโครฟาจสร้าง MIP-2 ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) และยังพบด้วยว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นมาโครฟาจผ่านทาง Mannose receptor

การศึกษาของ Han et al. (2005) เกี่ยวกับผลของไคโตซานที่มีตั้งแต่ 80% DD ขึ้นไป ต่อ murine macrophage-like cell line ผลการศึกษาพบว่า เซลล์มาโครฟาจสามารถจับและ uptake ไคโตซานเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง Mannose receptor ligands และกระตุ้นให้มาโครฟาจสร้าง TNF α มากกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Porporatto et al. (2005) วิจัยการดูดซึมไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ (80 kDa, 85 %DD) ในหนู Rat โดยให้หนูทดลอง (น้ำหนักเฉลี่ย 180-230 กรัม) กินสารละลายไคโตซาน 1 หรือ 3 มิลลิกรัมในกรดอะซิติก 0.1 M ปริมาตร 200 ul และเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมงจึงติดตามการแพร่กระจายของไคโตซานสู่อวัยวะน้ำเหลืองต่าง ๆ คณะผู้วิจัยพบว่า ลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นบริเวณที่ Antigen presenting cells มีการ uptake ไคโตซาน ก่อนแพร่กระจายสู่เนื้อเยื่อน้ำเหลืองสำคัญอย่าง Peyer's patch, Mesenteric lymphnode และม้าม นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นการทำงานของ T cell ในม้ามได้ด้วย

Gopalakannan and Arul (2006) ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลาคาร์พ (*C. carpio*) ต่อการเสริมอาหารด้วยไคติน (ร้อยละ 1) ไคโตซาน (ร้อยละ 1) และ Levamisole (250 mg/kg of feed) พบว่าเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารเสริมไคโตซานนาน 90 วัน ปลาจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น (น้ำหนักเฉลี่ย 94.92±9.36 g) ในขณะที่ ระดับ Serum lysozyme activity และ Neutrophil respiratory burst activity เพิ่มสูงสุดที่ระยะการเลี้ยง 30 วัน และมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ที่ระยะการเลี้ยงเท่ากัน เมื่อทดสอบการติดเชื้อด้วย *A. hydrophila* พบว่า การเลี้ยงปลาคาร์พด้วยอาหารเสริมไคโตซานติดต่อกันนาน 45 วันสามารถลดอัตราตายและเพิ่มประสิทธิภาพความคุ้มโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$)

ผลการทดลองเลี้ยงปลา Olive flounder (*P. olivaceus*) ด้วยอาหารเคลือบสารละลายไคโตซาน (1% chitosan, 1% tamarind gum, 0.5% vitamin C, 0.3% glucosamin sulfate, 0.1% chitooligossacharide, and 0.5% asthaxanthin) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักปลาทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ ระดับของ Myeloperoxidase, Neutrophil respiratory burst และ Skin mucus lysozyme activity ของกลุ่มที่กินอาหารเคลือบไคโตซานกลับเพิ่มสูงกว่าของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Cha et al., 2008)

น้ำหนักโมเลกุลและความสามารถในการละลายน้ำของไคโตซานมีผลต่อการดูดซึม การแพร่กระจายภายในร่างกาย และการขับออกด้วย จากการศึกษาของ Zeng et al. (2008) แสดงให้เห็นว่า ไคโตซานชนิดมวลโมเลกุลต่ำ ($M_w = 0.99 \times 10^3$, 85.7% DD) สามารถดูดซึมผ่านลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum เข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดไปยังอวัยวะภายในต่าง ๆ และถูกขับออกจากร่างกายสัตว์ได้รวดเร็วกว่า ในขณะที่ไคโตซานชนิดมวลโมเลกุลสูง ($M_w = 3.27 \times 10^4$-7.6×10^5, 52.6-85.5% DD) จะสะสมตามอวัยวะต่าง ๆ ได้มากกว่า สำหรับไคโตซานชนิดละลายน้ำ ($M_w = 3.91 \times 10^3$, 52.6% DD) นั้นสามารถสะสมในม้ามและไธมัสได้ดีกว่าไคโตซานชนิดอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University