บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไคตินและไคโตซาน (Chitin and Chitosan)

1. ไคติน (Chitin)

ไคติน (Polyacetyl Amino Glucose หรือ Poly-β-(1,4)-2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucose หรือ Poly (N-Acetylglucosamine) เป็นพอลิเมอร์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเซลลูโลส โมเลกุลของพอลิเมอร์ประกอบด้วยกลูโคสที่มีหมู่อะซีตามิโน ($-NHCOCH_3$) เชื่อมต่อด้วยพันธะ β-(1,4) มีสูตรทั่วไปเป็น $(C_8H_{13}NO_5)_n$ มีหน่วยย่อยคือ N-Acetylglucosamine ไคตินพบได้ในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ สัตว์ใน Phylum Arthropoda ใน Class Crustacean เช่น กุ้ง ปู และกั้ง และ Class Insecta แสดงได้ดังตารางที่ 2-1 โดยไคตินจะทำหน้าที่เป็นโครงร่างแข็งภายนอก (Exoskeleton) ของเปลือกหุ้มแข็งของแมลง เปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก โดยไคตินที่พบในเปลือกหุ้มแข็งของแมลง จะอยู่ในรูปสารประกอบของไคตินที่จับกับโปรตีน (Chitin-Protein Complex) ส่วนในเปลือกกุ้ง และกระดองปู จะพบหินปูนหรือแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium Carbonate) หรือพบร่วมอยู่กับสารทั้งสองชนิด ทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ การแยกหรือทำให้บริสุทธิ์จึงต้องใช้วิธีที่รุนแรง ซึ่งมีผลให้เกิดการสลายตัว (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์, 2547) นอกจากนี้ยังพบไคตินในผนังเซลล์ของเห็ด รา สาหร่ายบางสาย พันธุ์ ยีสต์ และ สัตว์ชั้นต่ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) รวมทั้งอาจพบได้ในพืชบางชนิด อาจมีไคตินแทนเซลลูโลสหรือเกิดร่วมกับเซลลูโลส

โครงสร้างผลึกของไคตินที่พบมี 3 ลักษณะ คือ แอลฟาไคติน (α-Chitin) เบตาไคติน (β-Chitin) และแกมมาไคติน (γ-Chitin) โดยแอลฟาไคตินมีการเรียงตัวของสายโมเลกุลลักษณะสวนทางกัน (Anti-Parallel Chain Alignment) สายโมเลกุลมีการเรียงตัวแน่นและมีความแข็งแรงสูงสุด พบในเปลือกกุ้งและกระดองปู ส่วนเบตาไคตินมีการเรียงตัวของสายโมเลกุลในทิศทางเดียวกัน (Parallel Chain Alignment) สายโมเลกุลมีการเรียงตัวได้ไม่แน่นมาก พบใน แกนหมึก และแกมมาไคตินเกิดจากการเรียงตัวสลับกันระหว่างอัลฟาไคตินและเบตาไคติน พบใน เห็ด รา และยีสต์ โดยแกนหมึกมีหินปูนและเม็ดสีซึ่งยากต่อการกำจัดน้อยกว่าเปลือกกุ้งและกระดองปู ทำให้ไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู มีสมบัติต่างจากไคติน จากแกนหมึก คือไคตินจากแกนหมึกมีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าไคตินจากเปลือกกุ้งและกระดองปู ทำให้การผลิตไคโตซานและอนุพันธ์ อื่น ๆ ง่ายขึ้น และเกิดการเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุล (Chain Degradation)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีในเปลือกของสัตว์ทะเล

วัตถุดิบ	ปริมาณ(%)						Chitin From	เอกสารอ้างอิง
	ไคติน	ความชื้น	เถ้า	ไนโตรเจน	โปรตีน	แคลเซียมคาร์บอเนต		
กุ้งกุลาดำ	30.50	3.93	0.146	6.36	39.75	-	α	Atchareeya (2004)
กุ้งโอดัก	27.82	4.02	0.158	6.36	39.75	-	α	
กุ้งลายน้ำตาล	32.78	4.03	0.142	6.41	40.06	-	α	
กุ้งขาว	29.33	3.99	0.153	6.40	40.00	-	α	
กุ้งลายหิน	28.61	4.00	0.142	6.37	39.81	-	α	
Blue Crab	14.00	2.90	4.000	6.70	41.88	-	α	
Red Crab	1.3-1.8	2.40	0.700	7.10	44.39	-	α	
Brown Shrimp (*Penaeus* aztecus) Shells (BS)	21.53	-	-	-	29.50	48.97	α	Abdou, Nagy and Elsabee (2007)
Pink Shrimp (*Penaeus durarum*) Shells (PS)	23.72	-	-	-	34.02	42.26	α	
Cuttlefish Pens (CT)	5.40	-	-	-	6.12	88.48	β	
Squid Pens (SQ)	49.00	-	-	-	46.23	4.74	β	
Crabs Shells (CR)	16.73	-	-	-	16.68	66.58	α	
Crayfish Shells (CF)	20.60	-	-	-	15.46	63.94	α	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

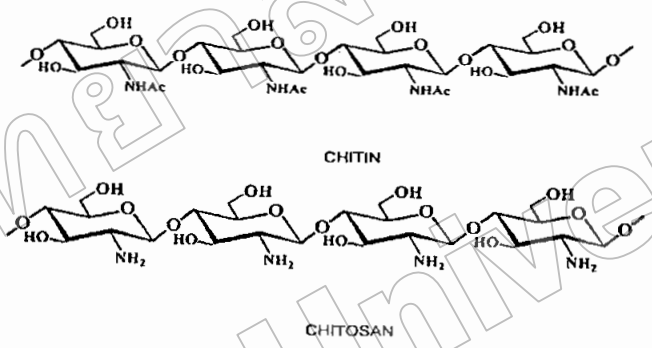
ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีในเปลือกของสัตว์ทะเล (ต่อ)

วัตถุดิบ	ปริมาณ(%)						Chitin From	เอกสารอ้างอิง
	ไคติน	ความชื้น	เถ้า	ไนโตรเจน	โปรตีน	แคลเซียมคาร์บอเนต		
Barnacle (*Lepas anatifera*)	7.00	-	-	-	-	-	α	Tolaimate, Desbrieres and Alagui
Marbled Crab (*Grapsus marmoratus*)	10.00	-	-	-	-	-	α	(2003)
Red Crab (*Portunus puber*)	10.00	-	-	-	-	-	α	
Spider Crab (*Maia squinado*)	16.00	-	-	-	-	-	α	
Lobster (*Homarus vulgaris*)	17.00	-	-	-	-	-	α	
Locust Lobster (*Scyllarus arctus*)	25.00	-	-	-	-	-	α	
Spiny Lobster (*Palinurus vulgaris*)	32.00	-	-	-	-	-	α	
Crayfish (*Astacus fluviatilis*)	36.00	-	-	-	-	-	α	
Shrimp (*Palamon fabricius*)	22.00	-	-	-	-	-	α	
Squilla (*Squilla mantis*)	24.00	-	-	-	-	-	α	
Cuttlefish (*Sepia officinalis*)	20.00	-	-	-	-	-	β	
Squid (*Loligo vulgaris*)	40.00	-	-	-	-	-	β	
Squid (Loligo lessoniana)	36.06	-	0.025	-	-	-	β	Chandumpai, Singhpibulporn,
Squid (Loligo formosana)	36.55	-	0.04	-	-	-	β	Faroongsarng and Sornprasit (2004)
Prawn shells (P. monodon)	22.18	-	-	-	-	-	α	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ไคโตซาน (Chitosan)

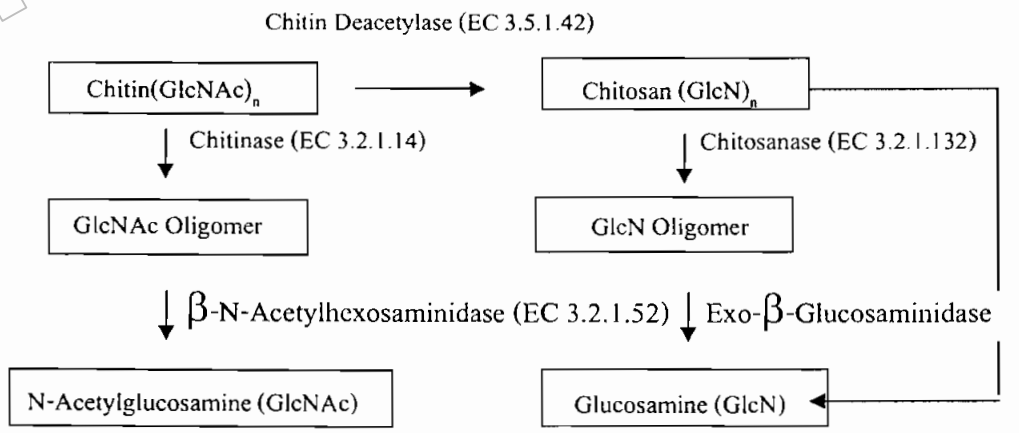
ไคโตซาน (Poly-β-(1,4)-2-Amino-2-Deoxy-D-Glucose; D-Glucosamine (2-Amino-2-Deoxy-D-Glucose) เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะซิติล (Deacetylation) หมู่อะซิตามิโด ($-NHCOCH_3$) เป็นหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ด้วยปฏิกิริยาเคมี ความร้อน ด่างเข้มข้น หรือด้วยปฏิกิริยาเอนไซม์ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2544; Cho, Han, & Ko, 2000) การเกิดไคโตซานขึ้นอยู่กับปริมาณของการเกิดปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติล โดยถ้าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลมากกว่าร้อยละ 50 พอลิเมอร์จะมีหมู่อะซิติลในไคตินลดลง ทำให้มีหมู่อะมิโนเพิ่มขึ้น เป็นการเพิ่มประจุเป็นบวก ทำให้พอลิเมอร์สามารถละลายกรดอินทรีย์ได้ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2544) ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างแสดงได้ดังภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2544)

กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินและไคโตซาน

ไคตินและไคโตซานอาจเกิดการย่อยสลายโดยกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินและไคโตซาน เป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ N–Acetylglucosamine และ Glucosamine แสดงได้ดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 ระบบการย่อยสลายไคตินด้วยเอนไซม์ (Mitsutomi, Hata, & Kuwahara, 1995)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคติน (Chitinolytic Enzyme)

กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินแบ่งตามเกณฑ์ต่าง ๆ ได้ดังนี้

1.1 แบ่งตามลักษณะการทำงาน (Mode of Action)

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินตามลักษณะการทำงานใช้หลักเกณฑ์เดียวกับกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulolytic Enzymes) โดยแบ่งตามการย่อยสลายพันธะในโมเลกุล แสดงได้ดังตารางที่ 2-2 (Patil, Ghormade, & Deshpande, 2000) เนื่องจากไคตินและเซลลูโลส (Cellulose) มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน แม้ว่าการจัดกลุ่มเอนไซม์คล้ายกับเซลลูเลส (Cellulase) แต่ EC Number ต่างกัน

1.2 แบ่งตาม Enzyme Classification Number (EC Number)

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินตามระบบ EC Number โดย International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) และ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) เป็นการแบ่งกลุ่มตามชนิดของปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายไคตินเป็น 2 กลุ่ม คือ EC 3.2.1.14 และ EC 3.2.1.52 แสดงได้ดังตารางที่ 2-2 (Gohel et al., 2006)

2. กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคโตซาน (Chitosalinolytic Enzyme)

กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคโตซานประกอบด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม ไคโตซาเนส ไคติเนส โปรตีเอส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส โปรเนส ไลเปส เพคติเนส และเปปซิน เป็นต้น

2.1 ไคโตซาเนส (Chitosanase, EC 3.2.1.132)

ไคโตซาเนสสามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานแบบเจาะจงตรงตำแหน่งพันธะ β-1,4 Glycosidic ได้เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (รัฐ พิชญางกูล, 2544; Jeon et al., 2001; Jeon, & Kim, 2000(a); Abdel-Aziz, & Moafi, 2008) แบ่งเป็นกลุ่มตามแอคติวิถีของเอนไซม์ได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

- Class I ย่อยสลายพันธะ β-1,4 Glycosidic ของ Glucosamine กับ Glucosamine และ N-Acetylated-Glucosamine กับ Glucosamine
- Class II ย่อยสลายพันธะ β-1,4 Glycosidic ของ Glucosamine กับ Glucosamine
- Class III ย่อยสลายพันธะ β-1,4 Glycosidic ของ Glucosamine กับ Glucosamine และ Glucosamine - N-Acetylated กับ Glucosamine

2.2 ไคติเนส (Chitinase)

ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะ β-1,4 Glycosidic ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของน้ำตาล N-Acetylated-Glucosamine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สายโซ่โมเลกุลของไคติน (รัฐ พิชญางกูล, 2544; Jeon et al., 2001; Jeon, & Kim, 2000 (a); Li, Wang, Chen, Huangfu, & Xie, 2009; Lin, Chen, & Peng, 2008)

ไคโตซาเนสและไคติเนสมีความสามารถในการย่อยไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลแตกต่างกัน ไคติเนสย่อยสายพอลิเมอร์ที่มี N-Acetylated สูงได้ดีแต่มีความสามารถในการย่อยไคโตซานต่ำ

2.3 เฮกโซซามินิเดส หรือ ไคโตไบเอส (Hexosaminidase or Chitobiase, Family 20) แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

- ไคโตไบเอส (Chitobiase, EC 3.2.1.29) ย่อยสลายพันธะ β-1,4 Glycosidic ของไคโตไบโอส (Chitobiose) หรือย่อยสลายพันธะจากปลายด้านที่เป็น Non Reducing Sugar ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-Acetylglucosamine

- เอ็นอะซีทิลเบต้า 1,4 ดีกลูโคซามินิเดส (N-Acetyl-β-1,4-D-Glucosaminidase, EC 3.2.1.30) สามารถย่อยโซ่โมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-Acetylglucosamine โดย เอ็นอะซีทิลเบต้า 1,4 ดีกลูโคซามินิเดส

- เฮกโซซามินิเดส หรือ เอ็นอะซีทิลเบต้าเฮกโซซามินิเดส (N-Acetyl-β -Hexosaminidase, EC 3.2.1.52) สามารถย่อยโซ่โมเลกุลของไคตินซ้ำ ๆ จากปลายสายที่เป็น Non Reducing End ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-Acetylglucosamine

2.4 เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (Cellulase and Hemicellulase)

เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส เป็นเอนไซม์กลุ่มย่อยพันธะ β1,4-Glycosidic Linkage ของสายโมเลกุลไคโตซาน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีระดับขั้นพอลิเมอร์อยู่ในช่วง 2-16 (Zhang et al., 1999; Qin et al., 2002; Qin et al., 2004; Liu, & Xia, 2006; นริศา เหละดุหวิ และคณะ, 2547)

2.5 เอนไซม์อื่น

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใช้เอนไซม์อื่น ๆ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไคโตซาเนส เอนไซม์เปปซิน (Pepsin; EC 3.4.23) จาก Porcine Stomach Mucosa, เอนไซม์โปรเนส (Pronase; EC 3.4.24.4) จาก *Streptomyces griseus* และเอนไซม์ปาเปน (Papain; EC 3.4.22.2) จาก Papaya Latex (EC 3.4.22.2) (Kumar et al., 2004; Muzzarelli et al., 2002) แสดงได้ดังตารางที่ 2-4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินตามลักษณะการทำงาน

Mode of Action	Cellulolytic Enzymes	EC Number	Chitinolytic Enzyme	EC Number
ย่อยสลายพันธะแบบสุ่มในสายโมเลกุล	Endo-1,4-β-Glucanase	3.2.1.4	Chitinase 1,4-β-Poly-N-Acetylglucosaminidase	3.2.1.14
ย่อยสลายพันธะจากส่วนที่เป็น Non Reducing Sugar	Cellobiase, β-Glucosaminidase	3.2.1.21	Chitobiase;	3.2.1.29
			β-D-Acetylglucosaminidase	3.2.1.30
ย่อยสลายพันธะทีละ 1หน่วยต่อเนื่องกันจากส่วนที่เป็น Non Reducing Sugar	Exo-Glucanase, Exo-1,4-β-glucosidase	3.2.1.74	β- N-Acetylhexosaminidase	3.2.1.52
ย่อยสลายพันธะทีละ 2หน่วยต่อเนื่องกันจากส่วนที่เป็น Non Reducing Sugar	Exo-Cellobiohydrolase, Cellulose 1,4-β-Cellobiosidase	3.2.1.91	Chitobiohydrolase	

Patil et al. (2000)

ตารางที่ 2-3 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคตินตามระบบ EC Number

EC Number	Chitinolytic Enzyme	Mode of Action
3.2.1.14	Endochitinase, Poly[1,4-(N-Acetyl-β-D-Glucosamine)] Glycanohydrolase	ย่อยสลายพันธะ 1,4 แบบสุ่มในสายโมเลกุลของไคตินและไคโตเดกทริน
3.2.1.52	Exochitinase, Chitobiase, β-N-Acetylhexaminidase, β-N-Acetyl-D-Hexosaminidase, N-Acetylhexosaminohydrolase	ย่อยสลายพันธะจากส่วนที่เป็น Non Reducing Sugar ใน N-Acetyl-β-D-Hexosamides

Gohel, Singh, Vimal, Ashwini and Chatpar (2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-4 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคโตซานตามระบบ EC Number และตามลักษณะการทำงาน

ชนิด	EC. number	แหล่งที่มา	ตำแหน่งการย่อย	เอกสารอ้างอิง
Cellulase	3.2.1.4	*Trichoderma viride*	ย่อยพันธะ β1,4-Glycosidic Linkage	Muraki, et al. (1993); Qin et al. (2004); Tsai et al. (2004); Lehduwi et al. (2002)
		Aspergillus *niger*		Lehduwi et al. (2002)
Chitosanase	3.2.1.132	*Bacillus pumilus*	ตัดสายไคโตซาน โดยไม่ตัดสายไคตินซึ่งย่อยโมเลกุลของ ไคติน แบบสุ่ม (random) ตรงตำแหน่งพันธะ (β1,4-Linkage)	Jeon and Kim (2000) (a,b); Jeon et al. (2001); Chiang et al. (2003); Kumar, Gowda and Tharanathan (2004); Molloy et al. (2004)
Chitosanase	3.2.1.132	*Bacillus alvei*		Abdel-Aziz and Moafi (2008)
Chitinase	3.2.1.14	*Streptomyces* griseus HUT6037	ย่อยโมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม (Random) ได้ทั้งบริเวณปลายสายและในสายตรงตำแหน่งพันธะ (β1,4-Linkage)	Tanabe et al. (2000); Mitsutomi et al. (1995); Lin, Chen and Peng (2008)
Chitinase	3.2.1.14	*Trichoderma harzianum* (BCRC 30 821)		Li et al. (2009)
Hemicellulase		*Aspergillus niger*	ย่อยพันธะ β1,4-Glycosidic Linkage	นริศา เหละดุหวิ และคณะ (2547); Lehduwi et al. (2002)
Lipase	3.1.1.3	*Aspergillus niger*	ย่อยพันธะเอสเทอร์	Lehduwi et al. (2002)
Amylase	3.3.1.1	*Bacillus subtilis*	ย่อยพันธะ β1,4-Glycosidic Linkage ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ β-1,6	Lehduwi et al. (2002)
Pectinase	3.3.1.11	*Aspergillus niger*	ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์	Lehduwi et al. (2002); Kittur et al. (2003)
Hydrolase		*Aspergillus niger*	ย่อยสลายพันธะไกลโคซิล, พันธะเอสเทอร์และะพันธะเปปไทด์	Lehduwi et al. (2002)
Immobilized Papain	3.4.22.2	Papaya latex-EC		Lin et al. (2002); Kumar, Gowda and Tharanathan (2004)
Pepsin		จากกระเพาะหมู		Kumar, Gowda and Tharanathan (2004)
Pronase		*Streptomyces griseus* -EC		Kumar, Gowda and Tharanathan (2004)

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase; Celluclast 1.5L)

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอ็นไซม์กลุ่มย่อยพันธะ β1,4-Glycosidic Linkage ของสายโมเลกุลไคโตซาน มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 4.2 - 5.2 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 40 - 50 องศาเซลเซียส ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บสารละลายเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 - 7 เก็บที่ 4 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ได้นาน 24 ชั่วโมง โดยเอนไซม์ไม่เสียสภาพ และหากเก็บในที่แห้งร่วมกับสภาวะดังกล่าวสามารถเก็บไว้ได้นานเป็นเวลาหลายเดือน แต่จะเสียสภาพที่อุณหภูมิ 80 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส 10 - 15 นาที

การตรวจสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสจะใช้สับสเตรทสังเคราะห์ เช่น โซเดียมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส และวัดจากความหนืดที่ลดลง หรือปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ปล่อยออกมา เช่น Unit Definition โดย 1 U คือปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อย 1 มิลลิโมลของกลูโคสจากโซเดียมคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

กระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ คือ กระบวนการแยกสารละลายที่ประกอบด้วยโมเลกุลของสารตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป โดยเยื่อแผ่นสังเคราะห์ยอมให้ตัวทำละลายและโมเลกุลชนิดหนึ่งผ่านไปได้มากกว่าโมเลกุลอีกชนิดหนึ่ง การจำแนกกระบวนการเยื่อแผ่นสังเคราะห์นี้แยกตามแรงผลักดันและขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่สามารถกักไว้ได้กระบวนการอัลตราฟิลเตรชันใช้สำหรับแยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน โพลีแซคคาไรด์ เอ็นไซม์ออกจากน้ำและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ความดันในการป้อนสารละลายอยู่ในช่วง 2 - 10 บรรยากาศ เยื่อแผ่นที่ใช้ มีชั้นผิวหนาประมาณ 0.1 - 2.0 μm มีขนาดรูพรุน 20 – 200° A หรือเทียบเป็น Molecular Weight Cut - Off (MWCO) 500 – 300,000 ค่า MWCO นี้จะเป็นค่าที่บอกคร่าว ๆ ถึงความสามารถในการแยกโมเลกุลของสารของเยื่อแผ่นนั้น ๆ เป็นตัวเลขที่แสดงถึงน้ำหนักโมเลกุลของตัวถูกละลายในหน่วยดาลตัน (Daltons, Da) ที่ถูกกักกันด้วยเยื่อแผ่นตั้งแต่ 90 เปอร์เซนต์ ขึ้นไป ส่วนตัวถูกละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่านี้จะผ่านเยื่อแผ่นไปได้บ้างหรือมีค่าการกักกันต่ำกว่า ส่วนโมเลกุลที่เล็กจะผ่านเยื่อแผ่นออกมา ซึ่งจะทำให้สารที่มีโมเลกุลใหญ่เข้มข้นขึ้น ทั้งนี้ต้องเลือกขนาดของรูพรุนของเยื่อแผ่นที่เหมาะสม ตัวทำละลายและสารโมเลกุลเล็กที่ไหลผ่านเยื่อแผ่นไปได้ เรียกว่า เพอร์มิเอท (Permeate) ส่วนตัวถูกละลายที่มีโมเลกุลใหญ่ที่ถูกกักไว้ เรียกว่า รีเทนเทต (Retentate) ส่วนที่ต้องการอาจเป็นเพอร์มิเอทหรือรีเทนเทตแล้วแต่ประโยชน์ที่จะนำไปใช้กระบวนการเยื่อแผ่นมีข้อได้เปรียบกระบวนการอื่น ๆ (บูชิตา ตัณจะโนดม, 2546)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มี 3 ปัจจัยหลัก คือ สมบัติของไคโตซาน ชนิดของเอนไซม์ และภาวะในการเกิดปฏิกิริยา มีรายละเอียดดังนี้

1.1 สมบัติของไคโตซาน

สมบัติของไคโตซานที่มีผลต่อกระบวนการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล (Degree of Deacetylation; %DD) น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (Molecular Weight) ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานและชนิดของตัวทำละลายไคโตซาน

1.1.1 ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล

ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล คือ สัดส่วนของหน่วยไคโตซานจากหน่วยของพอลิเมอร์ทั้งหมด ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซีติลสูงจะแสดงสมบัติการเป็นไคโตซาน ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติการละลายโดยไคตินจะละลายได้ยากในตัวทำละลายเนื่องจากโมเลกุลที่มีอยู่อย่างหนาแน่น มีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล ส่วนไคโตซานไม่ละลายน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์แต่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์เกือบทุกชนิดที่มีค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่า 6 (นันทิยา เฉียบแหลม, 2548; สุวบุญ รังรอง และโกสุม สมัครรันต์, 2544) ระดับการกำจัดหมู่อะซีติลของไคโตซานที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยทั่วไปมีค่าอยู่ในช่วง 53.00 - 99.84 แสดงได้ดังตารางที่ 2-5 ผลของระดับการกำจัดหมู่อะซีติลของไคโตซานที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เมื่อระดับการกำจัดหมู่อะซีติลลดลงอัตราการย่อย ไคโตซานเพิ่มขึ้นได้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง เนื่องมาจากระดับการกำจัดหมู่อะซีติลที่ลดลงทำให้ค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดเพิ่มขึ้นมีผลต่อความสัมพันธ์ของเอน ไซม์และสับสเตรท (Qin et al., 2002; Li et al., 2005; Lehduwi et al., 2002; Chen et al., 2005)

1.1.2 น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 100 ถึง 1,200 kiloDaltan (kDa) ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2543) น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าอยู่ในช่วง 98 - 110 kDa และที่สูงกว่า 200 kDa แสดงได้ดังตารางที่ 2-5 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่อความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ลดลงมีผลทำให้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง เป็นผลเนื่องมาจากความสัมพันธ์ของน้ำหนักโมเลกุลและระดับค่าการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซาน (Li et al., 2005; Qin et al., 2004)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.1.3 ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน

ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ใช้มีผลต่อความสัมพันธ์ของเอนไซม์และสับสเตรท โดยในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ใช้มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.20 - 6.25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แสดงได้ดังตารางที่ 2-5

1.1.4 ชนิดของตัวทำละลายไคโตซาน

ไคโตซานไม่ละลายน้ำ ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์แต่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดทุกชนิด ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างน้อยกว่า 6 และสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาวดี เมธะคานนท์ และคณะ, 2543; นันทิยา เฉียบแหลม, 2548) โดยสารละลายที่นิยมใช้ในเป็นตัวทำละลายไคโตซานได้แก่ กรดแลคติก (Jeon & Kim, 2000; Jeon et al., 2000 (a); Mitsutomi et al., 1995) กรดอะซิติก (Chiang et al., 2003; Kittur et al., 2003; Kumar & Tharanathan, 2004; Qin et al., 2004) อะซิเตต บัฟเฟอร์ (Mitsutomi et al.,1995; Tanabe et al., 2000; Lin et al., 2002; นริศา เหละคุหวิและคณะ, 2547; Li et al., 2005; Abdel-Aziz & Moafi, 2008; Li et al., 2009) เป็นต้น แสดงได้ดังตารางที่ 2-5

1.2 ชนิดของเอนไซม์

การผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมี คือ ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท (ไคตินและไคโตซาน) และมีความจำเพาะต่อผลิตภัณฑ์มากกว่าการใช้สารเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยไคโตซาน เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ ไคโดซาเนส ไคติเนส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส เปปซิน โปรเนส และปาเปน

1.2.1 ไคโตซาเนส (Chitosanase)

การผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนส จาก *Bacillus pumilus* และ *Bacillus alvei* ย่อยสารละลายไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดอะซิติก ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4 - 5.5 ทำปฏิกิริยาที่ 37 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที - 24 ชั่วโมง พบว่าได้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่ามวลโมเลกุล 25,000 - 3,000 Da และมีค่าระดับขั้น พอลิเมอร์อยู่ในช่วงมากกว่า 6 (Jeon et al., 2000 (b); Chiang et al., 2003; Abdel-Aziz & Moafi, 2008)

1.2.2 ไคติเนส (Chitinase)

การผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนส จาก *Streptomyces griseus* HUT6037 และ *Streptomyces* N-174 ย่อยสารละลายไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 53 และ 77 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 3 และ 0.6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน

อะซิเตตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 5.5 และ 6.0) และเอนไซม์ไคติเนส จาก *Trichoderma harzianum* ย่อยสารละลายไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดอะซิติก ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 - 5.5 ทำปฏิกิริยาที่ 37 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 - 96 ชั่วโมง พบว่าได้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่ามวลโมเลกุล 25,000 - 3,000 Da มีค่าระดับขั้นพอลิเมอร์อยู่ในช่วงมากกว่า 1 - 8 (Mitsutomi et al.,1995; Tanabe et al., 2000; Molloy et al., 2004) ส่วนการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนส จาก *T. harzianum* (BCRC 30 821) ในการย่อยตัวอย่างอัลฟาไคโตซาน และ เบต้าไคโตซาน ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอะซิเตต บัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 4) ทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตจากอัลฟาไคโตซาน มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลในช่วงร้อยละ 47 - 74 ไม่สามารถอ่านค่าได้ ส่วนสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตจากอัลฟาไคโตซาน มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลในช่วงร้อยละ 70 - 90 ผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่ามวลโมเลกุลในช่วง 156.5 - 8.8 kDa (Li et al., 2009)

1.2.3 เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (Cellulase and Hemicellulase)

การผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส จาก ย่อยสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 2.0 - 6.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอะซิเตต บัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 4.5 และ 6.0) ย่อยสารละลายไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดอะซิติก ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 4.0 - 5.5 ทำปฏิกิริยาที่ 37 - 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที - 10 วัน พบว่าได้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่าน้ำหนักโมเลกุล 3.2×10^{-3} - 16 kDa มีค่าระดับขั้นพอลิเมอร์อยู่ในช่วงมากกว่า 1-10 (Zhang et al., 1999; Qin et al., 2002; Qin et al., 2004; นริศา เหละดุหวิ และคณะ, 2547)

1.2.4 เอนไซม์อื่น

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใช้เอนไซม์อื่น ๆ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไคโตซาเนส เปปซิน จาก Porcine Stomach Mucosa, โปรเนส จาก *Streptomyces griseus* และ ปาเปนจาก Papaya Latex (Kumar et al., 2004; Muzzarelli et al., 2002) พบว่าได้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่าระดับขั้นพอลิเมอร์อยู่ในช่วง 2 - 10

1.3 สภาวะในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ปัจจัยเกี่ยวกับสภาวะในการผลิตที่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อัตราส่วนของไคโตซานต่อเอนไซม์ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และเวลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.3.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ต้องเพียงสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเพราะถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยเกินไปทำให้ใช้เวลานานในการเกิดปฏิกิริยา ส่วนถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไปเป็นการสิ้นเปลือง สำหรับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-5 Jeon and Kim (2000) (a) ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนส จาก *Bacillus pumilus* พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้นจาก 5, 10, 15 และ 20 หน่วยต่อกรัมโปรตีน ไม่มีความแตกต่างของปริมาณ Reducing Sugar

1.3.2 อัตราส่วนของไคโตซานต่อเอนไซม์

อัตราส่วนของไคโตซานต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-5 Lehduwi et al. (2002) ศึกษาผลอัตราส่วนของไคโตซานต่อเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส จาก *Aspergillus niger* ที่ระดับ 100:10 และ100 : 20 พบว่า อัตราส่วนของไคโตซานต่อเอนไซม์ที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงใช้อัตราส่วน 100 : 10 ในการผลิตขั้นต่อไป

1.3.3 ค่าความเป็นกรดด่าง

เอนไซม์แต่ละชนิดทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้ดีที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรดด่างหนึ่ง ๆ เท่านั้น ถ้าค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไปก็ทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนไปด้วย ค่าความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด (Optimum pH) อยู่ในช่วง 5.0 - 7.0 แสดงได้ดังตารางที่ 2-5

Tanabe et al. (2000) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนส จาก *Streptomyces griseus* HUT6037 พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส เอ มีค่าที่ 5.5 - 7.0 ส่วน ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส บี มีค่าที่ 5.0 - 9.0

Kumar and Tharanathan (2004) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เปปซิน, ปาเปน และโปรเนส พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปปซิน, ปาเปน และโปรเนส มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.0, 3.5 และ3.5 ตามลำดับ

Li et al. (2005) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus subtilis* พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Qin et al. (2004) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 แต่สามารถใช้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 - 5.5 ในการผลิตได้

1.3.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์มีค่าอยู่ในช่วง 37 - 65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ แสดงได้ดังตารางที่ 2-5

Tanabe et al. (2000) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนส จาก *Streptomyces griseus* HUT6037 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส เอ คือ 60 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส บี คือ 40 องศาเซลเซียส

Kumar and Tharanathan (2004) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เปปซิน ปาเปน และ โปรเนส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปปซิน, ปาเปน และ โปรเนส คือ 45, 37 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Li et al. (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus subtilis* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส คือ 50 องศาเซลเซียส และสามารถทำงานได้จนถึง 60 องศาเซลเซียส

Qin et al. (2004) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส จาก *Trichoderma viride* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส คือ 50 องศาเซลเซียส

1.3.5 เวลา

เวลาที่ใช้ในการผลิตอยู่ในช่วง 1 ชั่วโมงจนถึง 10 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และระดับการผลิต ซึ่งแสดงได้ดังตารางที่ 2-5

Lehduwi et al. (2002) ศึกษาผลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส ที่ระยะเวลา 15 นาที 30 นาที 45 นาที 1 ชั่วโมง 1.5 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาที่ 2 ชม. และ 24 ชม. สามารถผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์น้ำหนัก 19 และ 16.8 kDa ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ไคโตซาน(CS)					เอนไซม์ (E)			สภาวะการเตรียม COS					เอกสารอ้างอิง
ความเข้มข้น	MW kDa	DD	สารละลาย	ชนิด	แหล่งที่มา	Activity Enzyme	ความเข้มข้น	อัตราส่วนของ CS : (E)	pH	อุณหภูมิ	เวลา	อื่น ๆ	
3% (w/v)		95	Sodium Acetate Buffer	Cellulase	*Ttrichoderma viride*	-	180 mgmL-1	-	5.6	50°C	2 ชม. 4 ชม. 5 ชม. 6 ชม.	- - - -	Muraki, Yaku and Kojima (1993)
0.6% (w/v)	-	53	Acetate Buffer	Chitinase	*Streptomyces griseus* HUT6037	5 U	0.5 UmL-1	50:1	5.5	37°C	48 ชม.		Mitsutomi et al. (1995)
1% (w/v)	-	89	Lactic Acid	Chitosanase	*Bacillus pumilus*	50 U;649 Ug^{-1}protein	5 UmL^{-1} 0.05 UmL^{-1}	- -	5.5 5.5	60 °C 60 °C	ต่อเนื่อง ต่อเนื่อง	Dual UF-Membrane Reactor	Jeon and Kim (2000) (a,b)
1% (w/v)	-	89	Lactic Acid	Chitosanase	*Bacillus pumilus*	649 Ug^{-1} protein	0.05 UmL^{-1}	100:5	5.5	50 °C	60 นาที	UF-Membrane	Jeon et al. (2001)
4.5%(w/v)	-	90	Acetate Buffer	Cellulase	*Ttrichoderma viride*	-	15 UmL^{-1}	-	5.6	50°C	14 ชม.		Tasai et al. (2000)
1%(w/v)	98 +-4	99.84	Actic Acid	Pectinase	*Aspergillus niger*	3.31 Umg^{-1}	6mgmL-1	100:10	3	25°C	1 ชม.		Kittur et al. (2003)
0.6%(w/v)	-	54	Acetate Buffer	Chitinase (49-kDa)	*Streptomyces griseus* HUT6037	2U	0.4 UmL^{-1}	100:1	6	37 °C	96 ชม.		Tanabe et al. (2000)

ตารางที่ 2-5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ต่อ)

ไคโตซาน(CS)				เอนไซม์ (E)				สภาวะการเตรียม COS					เอกสารอ้างอิง
ความเข้มข้น	MW kDa	DD	สารละลาย	ชนิด	แหล่งที่มา	Activity Enzyme	ความเข้มข้น	อัตราส่วนของ CS : (E)	pH	อุณหภูมิ	เวลา	อื่น ๆ	
6.25% (w/v)	-	95และ80 86และ70	Acetate Buffer	Hemicellulase	*Aspergillus niger*	0.135 Umg^{-1}	-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		Lehduwi et al. (2002)
				Cellulase A	*Aspergillus niger*	Enzyme	-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
				Cellulase T	*Trichoderma viride*			100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
				Lipase A	*Aspergillus niger*		-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
				Amylase A	*Bacillus subtilis*		-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
				Pectinase 2	*Aspergillus niger*		-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
				Hydrolase	*Aspergillus niger*		-	100:8	4.5	37 °C	11 วัน		
0.2%(w/v)	-	77	Acetic Acid	Chitosanase	*Streptomyces N-174*	1.5 U	-	50 mL: 1.5U	5.5	37°C	65 นาที		Molloy et al. (2004)
1%(w/v)	235,	67.2,	Sodium Acetate	Neutal	*Bacillus subtilis1.398*	-	100 $mgmL^{-1}$	20:1	5.4	50 °C	0.5,1,1.5, 2		Li et al. (2004)
5%(w/v)	280,	72.6,	Acetic Acid	Cellulase	*Ttrichoderma viride*	-	103 $mgmL^{-1}$	20:1	5.5	50°C	1 ชม.		Qin et al. (2004)
6.25%(w/v)	529	80	Sodium Acetate buffer 0.2 M (pH)	Hemicellulas	*Aspergillus niger*	53.45 U	-	2.5g:53.45 U	4.5	37 °C	10 วัน		นริศา แหละดุหวิ และคณะ (2547)
1%(w/v)	-	-	Acetic Acid	Pepsin	จากกระเพาะหมู	4.98 U		100:1	5	45°C	1 ชม.		Kumar and Tharanathan (2004)
				Papain	Papaya latex	1.78 U		100:1	3.5	37°C	1 ชม.		
				Pronase	*Streptomyces griseus*	1.16 U		100:3	3.5	37°C	1 ชม.		
0.5%(w/v)	-	83	-	Chitosanase	*Aspergillus* sp.*CJ22-326*	6.46 Umg^{-1}	-	1:1	4	50 °C	2 ชม		Chen et al. (2004)
				ChiB		18.26 Umg^{-1}	-	1:1	6	65°C	2 ชม		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ต่อ)

ไคโตซาน(CS)					เอนไซม์ (E)			สภาวะการเตรียม COS					เอกสารอ้างอิง
ความเข้มข้น	MW kDa	DD	สารละลาย	ชนิด	แหล่งที่มา	Activity Enzyme	ความเข้มข้น	อัตราส่วนของ CS : (E)	pH	อุณหภูมิ	เวลา	อื่น ๆ	
1 % (w/v)	-	70	Acetate Buffer	Chitosanase	*Bacillus alvei*	0.8 Umg^{-1}	-	20:1	5.5	37 °C	3 ชม.		Abdel-Aziz, and Moafi (2008)
1 % (w/v)			Sodium Acetate	Chitinase	*Trichoderma harzianum* (BCRC 30.821)	1 Umg^{-1}		10:1	4	42 °C	0, 24, 72, 168		Li, Wang, Chen, Huangfu and Xie (2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

1. กลไกของไคโตซานและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

หมู่อะมิโนของไคโตซานและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถดูดซับสารอาหารและอิออนของโลหะที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Roller, & Covill, 1999; Tsai et al., 2004) จึงลดอัตราการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

พอลิเมอร์ประจุบวกของ ไคโตซาน สามารถเกิดแรงกระทำกับประจุลบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Choi et al., 2001; Roller, & Covill, 1999) ส่งผลให้ผนังเซลล์เกิดความเสียหาย

ไคโตซานสามารถเกิดเป็นสารประกอบที่ซับซ้อนบริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์จุลินทรีย์ โดยก่อตัวเป็นชั้นบาง ๆ รอบเซลล์ขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้สมบัติเลือกผ่านของเซลล์สูญเสียไป (Choi et al., 2001)

ไคโตซานเข้าไปรบกวนระบบและกลไกการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ให้ผิดปกติไป (Muzzarelli et al., 2002) รวมทั้งยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน แม้ว่าโมเลกุลของไคโตซานมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะแพร่ผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่เมื่อไคโตซานถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซม์ที่มีในจุลินทรีย์บางชนิด เช่น ไคโตซาเนส ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์และขัดขวางการสังเคราะห์ mRNA ได้ (Hadwger, Beckman, & Adams, 1981; Li et al., 2009)

2. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานและสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานและสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วย น้ำหนักโมเลกุลและความหนืดของไคโตซาน ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ระดับขั้นพอลิเมอร์ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายไคโตซาน ความเป็นกรดด่างของอาหาร ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ลักษณะของอาหาร และอุณหภูมิของอาหาร มีรายละเอียดดังนี้

2.1 น้ำหนักโมเลกุลและความหนืดของไคโตซาน

ไคโตซานมีความสามารถในการละลายต่ำ (Poor Solubility) สารละลายซึ่งเตรียมจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดมาก ไม่สะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตอาหาร จึงมีการพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติด้านนี้ของไคโตซานและอนุพันธ์ให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยผ่านกรรมวิธีทางเคมีหรือเอนไซม์ตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของไคโตซานให้

มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยผ่านกรรมวิธีทางเคมีหรือเอนไซม์ตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของไคโตซานให้สั้นลง เพื่อลดน้ำหนักโมเลกุล เพิ่มความสามารถในการละลายให้ดีขึ้น ลดความหนืดของสารละลาย และเพิ่มคุณสมบัติด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อสมบัติของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-6

No et al. (2002) รายงานว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,671, 1,106, 764, 470, 224 และ 28 kDa สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าโอลิโกเมอร์ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22, 10, 7, 4, 2 และ 1 kDa โดยไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเป็น 746 kDa จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. fluorescens* ดีที่สุด และไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 470 kDa สามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* และ *V. parahaemolyticus* ได้ดี ส่วนโอลิโกเมอร์ของไคโตซานยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลง การยับยั้ง *E. coli* และ *Bacillus* sp.ของไคโตซานจะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนืดลดลงจาก 1,000 ถึง 10 เซนติพอยต์ (cps) และพบว่า โอลิโกเมอร์ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10 ถึง 1 kDa ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้โดยประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลง

2.2 ระดับขั้นพอลิเมอร์ (Degree of Polymerization ;DP)

ผลของระดับขั้นพอลิเมอร์ที่มีผลต่อสมบัติของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-6

Tsai et al. (2004) พบว่านำสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่าระดับขั้นพอลิเมอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 6 มาใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนม สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้มากกว่า 4 วัน เช่นเดียวกับ Molloy et al. (2004) พบว่าสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีระดับขั้นพอลิเมอร์เท่ากับ 7 สามารถลดอัตราการเน่าเสียของแครอทจากเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ถึงร้อยละ 5

2.3 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล

ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคตินไคโตซาน ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลมีผลต่อการละลาย ความสามารถในการจับไอออน และสมบัติทางกายภาพและชีวภาพอื่น ๆ ของไคโตซาน มีงานวิจัยพบว่าเมื่อใช้ไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับร้อยละ 80 - 85 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ต้องใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 แต่ถ้าใช้ไคโตซานที่มี ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับร้อยละ 90 - 95 สามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.0075 (รัฐ พิญางกูล, 2544)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

85 - 93 ในขณะที่การกำจัดหมู่อะซิติลโดยใช้ด่างความเข้มข้นเดียวกันแต่มีสภาวะไม่รุนแรง คือ อุณหภูมิต่ำ ไคโตซานที่ได้จะมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลร้อยละ 48 - 55 ส่วนการกำจัดหมู่อะซิติลโดยเอนไซม์ไคตินดีอะซิติเลส (Chitin Deacetylases) พบว่าให้ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลได้สูง คือ มากกว่าร้อยละ 97 แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสีย คือ เอนไซม์มีราคาแพงและไม่สามารถควบคุมการกำจัดหมู่อะซิติลให้คงที่ได้

2.4 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายไคโตซาน

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานจะแตกต่างกันไปในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดทั้งกรดอินทรีย์ และกรดอนินทรีย์ การนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารจึงเป็นข้อจำกัดให้สามารถใช้ได้เพียงกรดอินทรีย์เท่านั้น โดยทั่วไปกรดอินทรีย์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยตัวของกรดเอง และการลดค่าความเป็นกรดด่างของระบบ ดังนั้นกรดอินทรีย์จึงช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน

No et al. (2002) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ พบว่า การยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซานในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก, กรดฟอร์มิก, กรดแลคติก, กรดโปรปิโอนิก และ กรดแอสคอบิก แตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ตัวทำละลายกรดอะซิติกและกรดฟอร์มิกร้อยละ 1.0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงกว่า กรดแอสคอบิก และ กรดโปรปิโอนิก ที่ต้องใช้ความเข้มข้นของกรดสูงกว่าร้อยละ 1.0 หรือใช้ความร้อนช่วยจึงจะละลายไคโตซานได้อย่างสมบูรณ์ กรดอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรีย คือ กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยกเว้น เชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria) จะถูกยับยั้งด้วยไคโตซานที่ละลายใน กรดฟอร์มิกได้ดีกว่า กรดอะซิติก

2.5 ความเป็นกรดด่างของอาหาร

ความเป็นกรดด่างมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซาน ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานแตกต่างกันไปในอาหารที่แตกต่างกัน

No et al. (2002) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.5, 5.0, 5.5 และ 5.9 ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด (*E. coli, S. typhimurium, L. monocytogenes, S. aureus, Lactobacillus plantarum* และ *L.brevis*) ของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ระดับ (1,671, 746 และ 470 kDa สำหรับเชื้อ 4 สายพันธุ์แรก และ 1,106, 224 และ 28 kDa สำหรับเชื้อ *Lactobacillus*) พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียโดยไคโตซานเกิดขึ้นดีที่สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ โดยที่ค่าความเป็นกรด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ด่าง 4.5 ให้ผลยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด นอกจากนี้ Tsai, Wu and Su (2004) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการยับยั้ง *E. coli* ของไคโตซาน พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 และ 6.0 ให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด

2.6 ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ความเข้มข้นของไคโตซานและสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์อาจแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ผลของชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-6

No et al. (2002) พบว่า ไคโตซานจากเปลือกปูโดยทั่วไปมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้นไคโตซานร้อยละ 0.1 และความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตซานที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอยู่ในช่วงร้อยละ 0.05 - 0.10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

Li et al. (2009) พบว่า ไคโตซานจากแกนหมึก โดยทั่วไปมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แสดงได้ดังตารางที่ 2-7 โดยความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตซานที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอยู่ในช่วง 45 – 1,440 ppm ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-6 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับขั้นพอลิเมอร์ต่อสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

MW (kDa)	DP	จุลินทรีย์	การยับยั้งจุลินทรีย์ แกรม	ยับยั้ง	MIC	MLC	การลดลง	หมายเหตุ	เอกสารอ้างอิง
1	-	*Escherichia coli* ATCC 11775	-	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	No et al. (2002)
		Pseudomonas fluorescens ATCC 21541	-	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Salmonella typhimurium ATCC 14028	-	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802	-	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
2 และ 4		*Listeria monocytogenes* Scott A	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Bacillus megaterium KCTC 3007	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Bacillus cereus ATCC 21366	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Staphylococcus aureus ATCC 29737	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Lactobacillus plantarum ATCC 8014	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Lactobacillus brevis IFO 13109	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
		Lactobacillus bulgaricus IFO 3533	+	√	-	-	1-5 Log Cycles	-	
≥ 10	5-7	*Escherichia coli* KCTC1682	-	√	600 ppm	-	51%		Jeon et al. (2001)
		Escherichia coli O-157 ATCC 11775	-	√	600 ppm	-	60%		
		Salmonella typhimurium KCTC 2424	-	√	600 ppm	-	89%		
2-30	-	*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384					2-4.5 Log Cycles		Choi et al. (2001)
		Streptococcus mutans ATCC 2735	+				0.5 Log Cycles		
	3-6	*Escherichia coli*					-	-	Jeon et al. (2001)
	7	*Sclerotinia sclerotiorum*					50%	ใช้เคลือบแครอท	Molloy et al. (2004)
	1-8	*Aeromonas hydrophila* YM1	-	√	5 ppm	-	-	-	Tsai et al. (2004)

ตารางที่ 2-6 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับขั้นพอลิเมอร์ต่อสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ต่อ)

MW (kDa)	DP	การยับยั้งจุลินทรีย์							เอกสารอ้างอิง
		จุลินทรีย์	แกรม	ยับยั้ง	MIC	MLC	การลดลง	หมายเหตุ	
	1-8	*Pseudomonas aeruginosa* CCRC 10944	-	√	5 ppm	-	-	-	Tsai et al. (2004)
		Salmonella typhimurium CCRC 10746	-	√	5 ppm	-	-	-	
		Shigella dysentereiae CCRC 13983	-	√	5 ppm	-	-	-	
		Vibrio cholerae CCRC 13860	-	√	8 ppm	-	-	-	
		Vibrio parahaemolyticus CCRC 10806	+	√	8 ppm	-	-	-	
		Escherichia coli CCRC10674	+	√	16 ppm	-	-	-	
		Listeria monocytogenes LM-LM	-	√	16 ppm	-	-	-	
		Aeromonas hydrophila CCRC 13881	+	√	24 ppm	-	-	-	
		Staphylococcus aureus CCRC 12652	-	√	29 ppm	-	-	-	
		Escherichia coli	-	√	-	-	2-3 Log Cycles	ในน้ำนมดิบ	
		Listeria monocytogenes	-	√	-	-	2-3 Log Cycles	ในน้ำนมดิบ	
		Salmonella typhimurium	-	√	-	-	2-3 Log Cycles	ในน้ำนมดิบ	
		Mesophilic bacteria	-	√	-	-	3 Log Cycles	ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์	
		Psychrotrophic bacteria	-	√	-	-	3 Log Cycles	ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์	
-	4-9	*Escherichia coli*ATCC 1150		√	800 ppm		40 –100%	ในแบคทีเรีย	Wong et al. (1999)
		Staphylococcus aureus ATCC 6538P		√	1,200 ppm				
		Streptococcus lactis KCTC 1950		√	1,200 ppm				
		Bacillus subtilis KCTC 1028		√	1,200 ppm				
		Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126		√	1,300 ppm		10-58%	ในเชื้อรา	
		Rhodotorula bacarum ATCC 7025		√	1,300 ppm				

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-6 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับขั้นพอลิเมอร์ต่อสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ต่อ)

MW (kDa)	DP	การยับยั้งจุลินทรีย์						เอกสารอ้างอิง
		จุลินทรีย์	แกรม	ยับยั้ง	MIC	MLC	การลดลง	หมายเหตุ	
-	4-9	*Mucor circinelloides* ATCC 1216,		√	1,500 ppm	-			
		Rhizopus apiculatus ATCC 11996		√	1,500 ppm	-			
		Penicillium charlesii ATCC 20841		√	1,400 ppm	-			
		Aspergillus niger ATCC		√	1,500 ppm	-			
≥ 10	5-7	*Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750	-	√	600 ppm	-	22%		Jeon et al. (2001)
		Streptococcus mutans KCTC 3065	+	√	300 ppm	-	99%		
		Micrococcus luteus KCTC 10240	+	√	300 ppm	-	63%		
		Staphylococcus aureus ATCC 6538P	+	√	300 ppm	-	93%		
		Staphylococcus epidermidis KCTC 1917	+	√	300 ppm	-	23%		
		Bacillus subtilis KCTC 1028	+	√	300 ppm	-	63%		
		Lactobacillus bulgaricus KCTC 3188	+	√	300 ppm	-	57%		
		Lactobacillus casei KCTC 3189	+	√	300 ppm	-	70%		
		Lactobacillus fermentum KCTC 3112	+	√	300 ppm	-	99%		
		Staphylococcus faecalis ATCC 10541	+	√	300 ppm	-	99%		
120.4		*Streptococcus bovis* (BCRC 14 729)	+	√	45 ppm	-		*β*-chitooligosaccharide	Li et al. (2009)
		Streptococcus agalactiae (BCRC 10 787)	+	√	960 ppm	-			
		Staphylococcus xylosus (BCRC 12 930)	+	√	1440 ppm	-			
		Staphylococcus aureus (BCRC 10 780)	+	√	800 ppm	-			
		Listeria monocytogenes (BCRC 14 845)	+	√	880 ppm	-			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-6 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและระดับขั้นพอลิเมอร์ต่อสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ต่อ)

MW (kDa)	DP	การยับยั้งจุลินทรีย์						เอกสารอ้างอิง
		จุลินทรีย์	แกรม	ยับยั้ง	MIC	MLC	การลดลง	หมายเหตุ	
		Alcaligenes faecalis (BCRC 10 828)	-	√	120 ppm				Li et al. (2009)
		Enterobacter aerogenes (BCRC 10 370)	-	√	110 ppm				
		Enterobacter cloacae (BCRC 10 401)	-	√	140 ppm				
		Escherichia coli (BCRC 10 675)	-	√	55 ppm				
		Klebsiella oxytoca (BCRC 13 985)	-	√	180 ppm				
		Pseudomonas aeruginosa (BCRC 10 944)	-	√	200 ppm				
		Vibrio harveyi (BCRC12 907)	-	√	60 ppm				
		Vibrio parahaemolyticus(BCRC 10 806)	-	√	55 ppm				
		Yersinia enterocolitica (BCRC 13 999)	-	√	880 ppm				

หมายเหตุ MLC = Minimal Lethal Concentration

MIC = Minimal Inhibition Concentration

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.7 ลักษณะของอาหาร

ชนิดของอาหารที่แตกต่างกันต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตซานที่แตกต่างกัน โดยถ้าลักษณะของอาหารมีองค์ประกอบของอนุภาคมากก็จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ของไคโตซาน ซึ่งเป็นการลดโอกาสของไคโตซานในการสัมผัสกับเซลล์ของจุลินทรีย์ผลของลักษณะของอาหารที่มีผลต่อสมบัติของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงได้ดังตารางที่ 2-7

ตารางที่ 2-7 ผลของลักษณะของอาหารต่อสมบัติของสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

อาหาร	ยับยั้ง	ผลการทดสอบ		เอกสารอ้างอิง
		ยับยั้ง	ลดลง	
น้ำนมดิบ	*Escherichia coli*	√	2-3 log cycles	Tsai et al. (2004)
น้ำนมดิบ	*Listeria monocytogenes*	√	2-3 log cycles	
น้ำนมดิบ	*Salmonella typhimurium*	√	2-3 log cycles	
น้ำนมพาสเจอร์ไรส์	*Mesophilic bacteria*	√	3 log cycles	
น้ำนมพาสเจอร์ไรส์	*Psychrotrophic bacteria*	√	3 log cycles	
ไส้กรอกหมู	กลิ่นหืน	√	ลดลง 50%	
เนื้อกวางขึ้นรูป	กลิ่นหืน	√	-	ขวัญสุดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา (2547)

Tsai, Wu and Su (2000) พบว่า องค์ประกอบในน้ำนม สามารถลดประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซาน ไคโตซานจะจับกับไขมันทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง Roller and Covill (1999) พบว่า การเติมกรดอะซิติกในมายองเนสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการเติมน้ำมะนาว ส่วน No et al. (2002) พบว่า *E. coli* ถูกยับยั้งได้ดีเมื่อใช้ไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 0.08 - 0.10

2.8 อุณหภูมิ

มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของไคโตซาน ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ว่าจะเกิดได้ดีขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดย Chen et al. (1998) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาหอยนางรม คือ การใช้ไคโตซาน ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Roller and Covill (1999) พบว่า ประสิทธิภาพของไคโตซานในการเป็นวัตถุกันเสียในมายองเนสควรใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Tsai, Wu and Su (2000) พบว่า สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในน้ำนมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียลดลง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนม คือ การใช้สารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แบคทีเรียก่อโรคและการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

จำนวนและชนิดจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในกุ้งหลังจากการจับจะแตกต่างกันตามแหล่งที่มา โดยแบคทีเรียประจำถิ่นของกุ้งจะเป็นสกุล *Achromobacter, Micrococcus, Pseudomonas, Flavobacterium* และ *Bacillus* ซึ่งปริมาณแบคทีเรียเหล่านี้จะมีจำนวนไม่มากในกุ้งที่มีชีวิต แต่หลังจากกุ้งตายและเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการขนส่งจากตลาดสู่โรงงาน ปริมาณแบคทีเรียจะเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ประกอบกับการทำงานของเอนไซม์ในกุ้งเอง ทำให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ซึ่งเป็นการเตรียมสภาพให้แบคทีเรียที่อยู่ตามเปลือกและในลำไส้เจริญเข้าไปในกุ้งง่ายขึ้น จากการสำรวจแบคทีเรียในกุ้งที่นำเข้าโรงงานในไทย พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 106 - 108 เซลล์ต่อกรัม จากการจำแนกชนิดแบคทีเรียในกุ้ง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะพบ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* เป็นส่วนใหญ่ ส่วนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะพบแบคทีเรียสกุล *Acinetobacter Flavobacterium Moraxella* และ *Coryneform* นอกจากนี้ยังพบ แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Streptococcus, Salmonella, Proteus, Clostridium* และ *Vibrio paraheamolyticus* และเมื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มีรายงานพบ *V. cholera, E. coli, S. aureus* และ *Salmonella* (หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, 2544) โดยแบคทีเรียที่มีความสำคัญ และใช้กำหนดคุณภาพอาหารคือ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียโคลิฟอร์ม และต้องไม่พบ *Salmonella* และ *Vibrio* spp. โดยประเทศสหรัฐอเมริกา จะเข้มงวดต่อเชื้อ *Salmonella* มาก และประเทศญี่ปุ่นจะเข้มงวดต่อเชื้อ *Vibrio* spp. ส่วนกลุ่มสหภาพยุโรปไม่ยอมรับพบ *Salmonella* และ *Vibrio* spp. แสดงดังตารางที่ 2-8 (จิราภา เสธจินตนิน, 2547) จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลอาจติดมากับวัตถุดิบ อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต สิ่งแวดล้อมการผลิตและผู้ปฏิบัติต่ออาหาร โดยกลุ่มแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคที่พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลได้แก่ *Vibrio* spp., *Listeria Monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* และ *Streptococcus aureus* แสดงได้ดังตารางที่ 2-8

2.1 *Vibrio* spp.

แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำทะเล เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาแบบเดี่ยวหรือแบบรอบตัว เจริญได้ดีในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีที่ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *V. Paraheamolyticus, V.alginolyticus, V. vulnificus* และ *V.cholerae* เป็นต้น

2.1.1 *V. cholera*

V. cholerae เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค ซึ่งเป็นโรคระบาดที่มีความสำคัญด้านสาธารณสุขเป็นอย่างมาก โดยอาการของโรค คือ ถ่ายท้อง อาเจียน สูญเสียน้ำมาก อาจถึงตายได้ภายใน 2 - 3 ชั่วโมง (พงเทพ วิไลพันธ์, 2540)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.2 *V. Paraheamolyticus*

V. paraheamolyticus จะเจริญได้ดีในสภาพที่มีเกลืออยู่ร้อยละ 2 - 4 และสามารถทนในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 11 ถ้าในอาหารไม่มีเกลือจะไม่สามารถเจริญอยู่ได้ (หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, 2544) *V. paraheamolyticus* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยมีอาการของโรค คือ คือ อุจจาระเหลวเป็นน้ำ บางรายมีเลือดปนอุจจาระ ปวดท้องอย่างรุนแรง คลื่นไส้ ถ่ายท้อง อาเจียน มีไข้ ปวดศรีษะ และหนาวสั่น มีระยะฟักตัวของเชื้อ 4 - 96 ชั่วโมง และระยะเวลาแสดงอาการตั้งแต่หลายชั่วโมงถึง 10 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับและภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล (พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์, 2536)

ผลการสำรวจผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษจำแนกตามชนิดของเชื้อก่อโรค จากการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2539 - 2549 พบผู้ป่วยจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* 1,471 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 135,563 ราย (สำนักระบาดวิทยา, 2549) และจากการรวบรวมข้อมูลระดับการปนเปื้อน *V. paraheamolyticus* ในกุ้งแช่แข็งในประเทศไทย ในระหว่างปี พ.ศ. 2538 - 2542 จากจำนวนตัวอย่าง 200 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อน *V. paraheamolyticus* จำนวน 53 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 26 โดยมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^6 CFU/g และพบมากในกุ้งร้อยละ 36.9 (สุดารัตน์ พยัฆวิเชียร, ลดาวัลย์ จึงสมานกุล, กรองแก้ว ศุภวัฒน์ และสุนันทา รามศิริ, 2533) เช่นเดียวกับ Wong, Chen, Liu, and Lui (1999) ได้ศึกษาการปนเปื้อน *V. paraheamolyticus* ในอาหารทะเล 686 ตัวอย่างที่มาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทย และเวียดนาม พบว่ามีการปนเปื้อน *V. paraheamolyticus* จำนวน 315 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 45.90 โดยพบในกุ้งและปูที่มาจากประเทศไทยร้อยละ 75.8 และ 81.3 ตามลำดับ

2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียในสกุล *Listeria* sp. มีรูปท่อน หรือค่อนข้างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นสายสั้น ๆ ย้อมติดสีแกรมบวก เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาแบบเดี่ยวหรือแบบรอบตัว เจริญได้ดีในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ดีที่ 20 - 25 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารเหลว จะมีรูปร่างกลมคล้าย Streptococci เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นจะมีการเรียงตัวเป็นสายยาว เจริญได้ดีในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar จะมีลักษณะกลม มีสีเทาอมฟ้า ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.5 - 1.5 มิลลิเมตร *L. monocytogenes* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) ซึ่งเมื่อได้รับเชื้อแล้วจะทำให้มีอาการภาวะโลหิตเป็นพิษ สมองอักเสบ การติดเชื้อจากภาวะแทรกซ้อนและเสียชีวิตได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 ***E.coli***

E.coli เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Coliform เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย เจริญได้ดีในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาแบบเดี่ยวหรือแบบรอบตัว บางชนิดไม่เคลื่อนที่ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar มีลักษณะเรียบ นูนเล็กน้อย โคโลนีมีสีเทา ผิวหน้าเป็นเงา ขอบเรียบ โดย *E.coli* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียพบในคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งพบมากในลำไส้ของคน *E.coli* ที่ก่อให้เกิดโรคสามารถแบ่งได้ 5 ชนิด คือ

2.3.1 เอนเทอโรพาโทเจนิก (Enteropathogenic; EPEC) ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในทารก และมีการสร้างสารพิษคล้ายกับสารพิษของ *Shigella*

2.3.2 เอนเทอโรทอกซิจินิก (Enterotoxigenic; ETEC) สร้างสารพิษที่สามารถทนความร้อน มีการสร้างสารพิษคล้ายกับสารพิษของ *V. cholerae* ทำให้เกิดอาการคล้ายอหิวาตกโรค

2.3.3 เอนเทอโรอินวาสีพ (Enteroinvasive; EIEC) ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด

2.3.4 เอนเทอโรฮีโมราจิก (Enterohemorrhagic; EHEC) ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องร่วง อุจจาระมีน้ำและเลือดปนออกมามาก รวมถึงการตกเลือดในลำไส้ *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุสำคัญคือ *E. coli* O157:H7 (หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, 2544)

2.3.5 แฟกคัลเททีฟ เอนเทอโรพาโทเจนิก (Facultatively Enteropathogenic; FEEC) สายพันธุ์นี้พบไม่บ่อยซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการท้องร่วง

2.4 ***Staphylococcus aureus***

แบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม หรือรูปไข่ แกรมบวก อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเหมือนพวงองุ่นหรือเป็นคู่ต่อสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองทอง เจริญได้ในที่ที่มีหรือไม่มีออกซิเจน เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10 ทนความร้อนได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เป็นเชื้อที่พบตามเยื่อเมือกบุผิวของช่องปาก ทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ช่องทางเดินระบบขับถ่าย ระบบสืบพันธุ์ และผิวหนังของคนและสัตว์ รวมทั้งน้ำที่มีการปนเปื้อนอุจจาระ ชนิดที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคในคน เช่น *S. aureus* พบได้ทั่วไปในอาหารและอาหารทะเลที่มีสุขลักษณะไม่ดี (พงษ์เทพ วิไลพันธ์, 2540) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-8 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็นแช่แข็งด้านจุลชีววิทยาประเภท กุ้ง ปู (Crustacean)

ผลิตภัณฑ์	Australia	Canada	EU	Japan	USA
1. สด (ผลิตภัณฑ์ปรุงสุกก่อนบริโภค)	TVC/g n=5 c=1 m=$5.0x10^5$ M=$5.0x10^6$ S.*aureus*(MPN/g) n=5 c=2 m=100 M= 10^3 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	E.*coli* (MPN/g) n=5 c=1 m=4 M=40 S.*aureus* (MPN/g) n=5 C=1 m=10^3M=10^4 *Samolnella* ND/25 g	E.*coli* (MPN/g) = 10 S. *aureus* (MPN/g) =100 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g	TVC/g =<$3.0x10^6$ Coliform (MPN/g)Nil<3 E.*coli* (MPN/g) Nil<3 S. *aureus* (MPN/g) =<100 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g	V. *para*(MPN/g) =<10^4 L. *mono* ND/25 g
2. สด (ผลิตภัณฑ์สดต้องนำไปปรุงสุกก่อนบริโภค)	TVC/g =$5.0x10^4$ E.*coli* (MPN/g) <10 S. *aureus* (MPN/g) < 100 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	E.*coli* (MPN/g) n=5 c=1 m=4 M=40 S.*aureus* (MPN/g) n=5 C=1 m=10^3M=10^4 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	TVC/g =$5.0x10^4$ E.*coli* (MPN/g) < 10 S. *aureus* (MPN/g) <100 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	TVC/g =<$1.0x10^5$ Coliform (MPN/g)Nil<3 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g V. para (MPN/g) =<100 L. *mono* ND/25 g	V. *para*(MPN/g) =<10^4 L. *mono* ND/25 g
3. ปรุงสุก (ผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค) กรณีปูพลาสเจอไรส์ให้เพิ่มการตรวจ C. *perfringers* ND/0.1g	TVC/g n=5 c=2 m=$5.0x10^5$ M=$5.0x10^6$ E.*coli* (MPN/g) n=5 c=4 m=10 M=10^2	E.*coli* (MPN/g) n=5 c=1 m=4 M=40 S. *aureus* (MPN/g) n=5 c=1 m=10^3 M=10^4 M=10^2	Fecail Coliform(MPN/g)n=5 c=2 m=10 E.*coli*(MPN/g)n=5 c=1 m=<3 M=10	TVC/g =<$1.0x10^5$ Coliform (MPN/g)Nil<3 *Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g	E.*coli* (MPN/g) <3.6 V. *para*(MPN/g) =<10^4 S. *aureus* (MPN/g) =<10^4

Department of Fishery (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-8 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็นแช่แข็งด้านจุลชีววิทยาประเภท กุ้ง ปู (Crustacean) (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	Australia	Canada	EU	Japan	USA
3. ปรุงสุก (ผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค) กรณีปูพลาสเจอไรส์ให้เพิ่มการตรวจ C. *perfringers* ND/0.1g	S.*aureus* (MPN/g) n=5 c=2 m=10^2 M=10^3 *Salmolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	*Samolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	S.*aureus* (MPN/g) n=5 c=2 m=10^2 M=10^3 *Samolnella* ND/25 g TVC/g n=5 c=2 m=$5.0x10^4$ M=$5.0x10^5$ V. para (MPN/g) n=5 c=2 m=10 M=10^2 V. *cholere* ND/25 g L. *mono* ND/25 g	V. para (MPN/g) =<100 L. *mono* ND/25 g	L. *mono* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g *Salmolnella* ND/25 g
4.พร้อมปรุง (ผลิตภัณฑ์พร้อมปรุงสุกใช้เวลาต่ำสุดในการปรุงก่อนบริโภค)	TVC/g n=5 c=2 m=$5.0x10^5$ M=$5.0x10^6$ Fecail Coliform(MPN/g)n=5 c=2 m=10^2 M=10^3 S.*aureus* (MPN/g) n=5 c=2 m=10^2 M=10^3 *Salmolnella* ND/25 g	E.*coli* (MPN/g) n=5 c=1 m=4 M=40 S. *aureus* (MPN/g) n=5 c=1 m=10^3 M=10^4 *Salmolnella* ND/25 g	TVC/g $5.0x10^6$ E.*coli*(MPN/g) Nil<3 S.*aureus* (MPN/g) =100 *Salmolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g	TVC/g <$3.0x10^6$ Coliform (MPN/g)Nil<3 E.*coli*(MPN/g) Nil<3 *Salmolnella* ND/25 g V. *cholere* ND/25 g	S. *aureus* (MPN/g) =<10^4 *Salmolnella* ND/25 g

Department of Fishery (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University