

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคตินเอส
จากต้นอ่อนก้ามปู

Antibacterial Activity of Chitooligosaccharides Produced by Chitinase
from *Samanca saman* (Jacq) Merr. Seedling

มานะ ขาวเมฆ*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

*ผู้เขียนหลัก (Corresponding Author) E-mail: Mana@vru.ac.th

Received: February 20,2022

Revised: February 22,2022

Accepted: March 21,2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยเอนไซม์ไคตินเอสที่สกัดด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 3.5 จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยเอนไซม์ไคตินเอสจากต้นอ่อนก้ามปู ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละรวมโมเลกุลขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ เท่ากับ 92.58 จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดทั้ง 6 สายพันธุ์คือ แบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.56/1.56, 3.12/3.12, 1.56/1.56, 1.56/3.12, 3.12/6.25 และ 3.12/3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย, ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์, เอนไซม์ไคตินเอส, ต้นอ่อนก้ามปู

Abstract

This research was to study the antibacterial activity of chitooligosaccharides obtained from hydrolysis of 1 percent of colloidal chitin produced by chitinase with extracted of 0.1 molar acetate buffer at pH 3.5 from two weeks seedlings of *Samanca saman* (Jacq). was investigate in this work. It found that chitooligosaccharides obtained by hydrolysis of 1 percent of colloidal chitin at 0.5 hour, containing a percentage of total large molecules of (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇, and (GlcNAc)₈ was 92.58. It inhibited of the 6 bacterial strains, gram positive including *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and gram negative including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were 1.56/1.56, 3.12/3.12, 1.56/1.56, 1.56/3.12, 3.12/6.25 and 3.12/3.12 µg/ml, respectively.

Keywords: Antibacterial Activity, Chitooligosaccharides, Chitinase, *Samanca saman* (Jacq) Merr.

บทนำ

เอนไซม์ไคตินเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคติน ได้ผลผลิตเป็นเอนอะซิดิลกลูโคซามีน (GlcNAc) และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวขนาด 2-10 โมเลกุล เอนไซม์ไคตินเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและด้านอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจาก แบคทีเรีย เชื้อรา และแมลง (Chernin et al, 1997) เอนไซม์ไคตินเนสจากพืชมีขนาดอยู่ในช่วงน้ำหนัก 25-40 กิโลดาลตัน (Malik, 2019)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ของมอนอแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล ที่ต่อกันด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของเอนอะซิดิลกลูโคซามีนกับเอนอะซิดิลกลูโคซามีน หรือกลูโคซามีนกับกลูโคซามีน หรือเอนอะซิดิลกลูโคซามีนกับกลูโคซามีน ซึ่งเป็นสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายไคตินหรือไคโตซาน ด้วยปฏิกิริยาเคมีของกรดหรือเอนไซม์กลุ่มไคโนไลติก เช่น ไคตินเนสและไคโตซานซึ่งพบในพืชหลายชนิด เช่น ก้ามปู กระถินบ้าน ถั่ว ยาสูบ และองุ่น (Yin et al, 2010) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ด้านเนื้องอก ด้านเชื้อราและแบคทีเรีย เสริมภูมิคุ้มกัน ป้องกันการติดเชื้อ ด้านโรคไขข้ออักเสบ ลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด ควบคุมการปล่อยตัวยาสำคัญ และด้านอนุมูลอิสระ

(Zhang et al, 1999; Coelho et al, 2010; Baureithel et al, 1994) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีมูลค่ามากกว่าไคตินและไคโตซาน เพราะละลายน้ำและดูดซึมน้ำได้ดีกว่า ดังนั้น จึงต้องมีการเปลี่ยนไคตินและไคซานพอลิเมอร์ให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสหรือเอนไซม์ไคโตซานเนส ซึ่งพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง (พูนศุข ศรีโยธา และ John Perberdy, 2539) เช่น ก้ามปูและกระถินบ้านจะเปลี่ยนไคตินหรือไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซานจากพืชสามารถยับยั้งเชื้อราและต้านอนุมูลอิสระได้ดี เช่น งานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2563) ศึกษาการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ของไคโตเตโตรส ((GlcNAc)₄) ไคโตเพนโตส ((GlcNAc)₅) และไคโตเฮกซอส ((GlcNAc)₆) มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของเอนอะซิติลกลูโคซามีน ((GlcNAc)₁) ไคโตไบโอส ((GlcNAc)₂) และไคโตไตรโอส ((GlcNAc)₃) โดยมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกซอส ร้อยละ 3.41, 18.11, 10.03, 22.64, 20.17 และ 25.64 ตามลำดับ สามารถยับยั้งเชื้อราจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Magnaporthe oryzae* และ *Setosphaeria oryzae* ที่ความเข้มข้นของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5-10 ไมโครกรัม และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอิน (BHT) โดยมีค่า EC₅₀ ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เท่ากับ 1.01±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า EC₅₀ ของสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ 1.34 ±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Kaomek, 2021) และจากงานวิจัยของยามาดะ (Yamada et al, 1993) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด 6-8 หน่วยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและต้านอนุมูลอิสระได้ดี คือต้นอ่อนของก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ มาใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์

วิธีการวิจัย

1. สกัดไคตินจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ตามวิธีของขาวเมฆ (Kaomek, 2021)
2. หาค่ากิจกรรมของไคตินตามวิธีของขาวเมฆ (Kaomek, 2021)
3. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีตามวิธีของขาวเมฆ (Kaomek, 2021)

4. หาปริมาณร้อยละของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตามวิธีของชาวเมฆ (Kaomek, 2021)

5. ทดสอบฤทธิ์ของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์กับแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ แกรมบวกประกอบด้วย *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และแกรมลบประกอบด้วย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 ด้วยวิธีดิสก์ดีฟิฟชันของคอคเกอร์ิลล์และคณะ (Cockerill et al, 2012)^a

5.1 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารนิวเทรียนอาการ์ (Nutrient Agar) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้อาหารนิวเทรียนอาการ์ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตันบร็อท (Mueller Hinton broth; MHB) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้ ทริปติกซอยบร็อท (Tryptic soy broth; TSB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาเจือจางให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตันอาการ์ (Mueller Hinton Agar; MHA) (ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ใช้ทริปติกซอยอาการ์ (Tryptic Soy Agar)) ทั้งไว้ประมาณ 5 นาที นำโคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 100 ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหยดโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่บนแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร รอให้แห้งประมาณ 15 นาที ใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative Control) และตัวควบคุมผลบวก (Positive Control) กับแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ใช้ยาปฏิชีวนะแวนโคไมซิน (Vancomycin) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *S. enteria*, *V. parahaemolyticus* ใช้ยาปฏิชีวนะเซฟตาซิดิม (Ceftazidime) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Inhibition Zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5.2 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution Technique (Cockerill et al, 2012)^b นำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งได้จากข้อ 5.1 มาใช้ทดสอบ โดยนำโคโลนีของเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมงมาเลี้ยงในอาหารเหลวมูลเลอร์ฮินตันบร็อท (สำหรับ *V. parahaemolyticus* ใช้ทริปติกซอยบร็อท) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อให้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland นำโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อย 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมผลบวกจะประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับแบคทีเรียปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชุดควบคุมผลลบจะประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 100 ให้มีความ

เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) โดยสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น อ่านความเข้มข้นของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

5.3. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) นำหลอดที่ไม่มีความขุ่นจากข้อ 5.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เกลี่ย (Spread Plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจหาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของโคโดโอลิโกแซคคาไรด์ (MBC)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การหาค่าค่ากิจกรรมจำเพาะ

เอนไซม์โคตินเนสที่สกัดจากต้นก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 3.5 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 19.2687 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.9729 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าเท่ากับ 19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โคตินเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่าเอนไซม์โคตินเนสจากพืชชนิดอื่นและแหล่งอื่น เช่น เอนไซม์โคตินเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2.5720 ยูนิต/มิลลิกรัม (มานะ ขาวเมฆและ วรางคณา เทศทอง, 2564) เอนไซม์โคตินเนสจากที่สกัดเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Strain KCTC0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.9582 ยูนิต/มิลลิกรัม (Senol et al, 2014) และเอนไซม์โคตินเนสที่สกัดจากเชื้อรา *Paenibacillus fukunensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.0122 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yong et al, 2017)

2. การหาปริมาณร้อยละของโคโดโอลิโกแซคคาไรด์

โคโดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคตินในรูปคอลลอยด์เข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยเอนไซม์โคตินเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนอะซิติกกลูโคซามีนและโคโดโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2 – 8 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของโคโดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มในช่วงเวลา 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 1.23-25.32, 2.21-24.12, 3.98-23.02, 3.01-9.12, 4.23-11.76, 5.23-22.56, 6.51-23.23 และ 8.56-26.11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณของโคโดโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อย (0.5 ชั่วโมง) จะมีปริมาณมาก คือร้อยละ 9.12, 11.56, 22.56, 23.23 และ 26.11

ตามลำดับ แต่จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂ และ (GlcNAc)₃ เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ (Moon et al, 2017) ที่สกัดเอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 ที่ย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์แล้วหาปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มสั้นจะมีปริมาณของ (GlcNAc)₆ มากที่สุด รองมาเป็น (GlcNAc)₅ และ (GlcNAc)₄ ตามลำดับ เมื่อนำปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง รวมกันจะได้เท่ากับ 92.58

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดที่ได้จากการบ่มไคตินในรูปของคอลลอยด์กับเอนไซม์ไคตินเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มต่างกัน

เวลาที่ใช้บ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์							
	(GlcNAc) ₁	(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₄	(GlcNAc) ₅	(GlcNAc) ₆	(GlcNAc) ₇	(GlcNAc) ₈
0.5	1.23	2.21	3.98	9.12	11.56	22.56	23.23	26.11
1	10.85	10.23	8.13	8.65	10.32	15.64	17.06	19.12
2	20.63	18.75	14.44	7.34	8.12	9.48	10.23	11.01
4	25.32	24.12	23.02	3.01	4.23	5.23	6.51	8.56

3. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปของคอลลอยด์ด้วยไคตินเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มาเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้นด้วยวิธีเทคนิคดิสก์ดีฟิฟิเคชัน (Disc Diffusion Technique) โดยใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อดิสก์ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการบ่ม 0.5 ชั่วโมง ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* มีความกว้างของ Inhibition Zone เท่ากับ 26.89 ± 0.12 , 22.46 ± 0.12 , 25.88 ± 0.19 มิลลิเมตร และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus* มีความกว้างเท่ากับ 20.67 ± 0.18 , 19.56 ± 0.28 และ 21.33 ± 0.20 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้
เวลาบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง

ชนิดแบคทีเรีย	ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ จากการบ่ม (ชั่วโมง)	Inhibition Zone (mm)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
แกรมบวก				
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0.5	26.89 ± 0.12	1.56	1.56
	1	16.21 ± 0.18	6.25	6.25
	2	8.11 ± 0.15	25	25
	4	5.92 ± 0.21	50	50
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	0.5	22.46 ± 0.12	3.12	3.12
	1	12.23 ± 0.12	12.5	12.5
	2	6.74 ± 0.12	50	50
	4	4.17 ± 0.12	100	100
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	25.88 ± 0.19	1.56	1.56
	1	15.19 ± 0.15	6.25	6.25
	2	8.04 ± 0.23	25	25
	4	5.24 ± 0.29	50	50
แกรมลบ				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5	20.67 ± 0.18	1.56	3.12
	1	12.41 ± 0.14	6.25	12.5
	2	6.91 ± 0.12	25	50
	4	4.06 ± 0.19	50	100
<i>S. enterica</i> ATCC 14028	0.5	19.56 ± 0.28	3.12	6.25
	1	11.21 ± 0.25	12.5	12.5
	2	5.99 ± 0.20	50	50
	4	3.98 ± 0.19	100	100
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.5	21.33 ± 0.20	3.12	3.12
	1	13.66 ± 0.18	12.5	12.5
	2	7.51 ± 0.18	50	50
	4	5.01 ± 0.18	100	100

4. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus* พบว่า โคโคไลโกแซคคาไรด์จากการย่อยโคตินในรูปของคอลลอยด์ที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* และ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 1.56, 3.12, 1.56, 1.56, 3.12 และ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

5. ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus* พบว่า โคโคไลโกแซคคาไรด์จากการย่อยโคตินในรูปของคอลลอยด์ที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* และ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 1.56, 3.12, 1.56, 3.12, 6.25 และ 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ดังตารางที่ 2)

จากงานวิจัยของโรออสและรีซีโอ (Rios and Recio, 2005) และแวนวูเรน (Van Vuuren, 2008) ได้แบ่งกลุ่มการออกฤทธิ์ของสารโดยใช้ค่า MIC แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งมีค่า MIC < 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 2. กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลางมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1-2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 3. กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งอ่อนมีค่า MIC > 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นโคโคไลโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคตินในรูปคอลลอยด์ด้วยเอนไซม์โคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูที่ใช้เวลาในการบ่มทุกช่วงเวลาจัดอยู่ในกลุ่มที่มียับยั้งที่ดี

จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของโคโคไลโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการบ่มน้อยคือ 0.5 ชั่วโมงจะยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดคือ มีค่า MIC และ MBC น้อยที่สุด เนื่องจากโคโคไลโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการบ่มน้อยจะมีโคโคไลโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ มาก คือรวมกันเท่ากับร้อยละ 92.58 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของไทเซ (Tsai et al, 2000) ศึกษาโคโคไลโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโคซานของเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า โคโคไลโกแซคคาไรด์ขนาด (GlcN)₆, (GlcN)₇ และ (GlcN)₈ จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้ดีที่ความเข้มข้น 5-29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของยามาดา (Yamada et al, 1993) พบว่า โคโคไลโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด 6-8 หน่วยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของอิกิกะและคณะ (Ikigai et al, 1993) ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากพืชเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการต้านทานต่อสารประกอบพอลิฟอสฟอริกได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีสารลิโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides)

ซึ่งมีสมบัติในการปกป้องเซลล์แบคทีเรีย จึงสามารถช่วยป้องกันความเสียหายจากสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ อีกทั้งแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนกว่า เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกโดยแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้นและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างที่ไม่สมมาตร เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นสารฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) ในขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารลิโปพอลิแซคคาไรด์ โครงสร้างดังกล่าวทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีประโยชน์ในการช่วยปกป้องเซลล์ จึงต้องใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูงในการยับยั้งแบคทีเรีย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจและปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการการย่อยของเอนไซม์โคติเนสที่ได้จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 6 สายพันธุ์ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.56-6.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ เช่น โทษและคณะ (Tsai et al, 2000) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 10 สายพันธุ์ของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยโคโตซานเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 5-29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลากุลติลกและคณะ (Laoluldilok et al, 2017) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 4 สายพันธุ์ของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยโคโตซานด้วยเอนไซม์ปาเปนพบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 16-32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เบนฮาบิลส์และคณะ (Benhabiles et al, 2012) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจำนวน 12 สายพันธุ์ของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยโคโตซานด้วยเอนไซม์ปาเปนพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 6-8 หน่วย สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี เพราะโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 6-8 หน่วย สามารถผ่านชั้นผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปภายในเซลล์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการแสดงออกของยีน (Gene Expression) (Tsai and Su, 1999)

สรุปผลการวิจัย

โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคตินในรูปคอลอยด์เข้มข้นร้อยละ 1 ด้วยเอนไซม์โคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂ และ (GlcNAc)₃ ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *S. enterica*, *V. parahaemolyticus* โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.56/1.56, 3.12/3.12, 1.56/1.56, 1.56/3.12/, 3.12/6.25 และ 3.12/3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี

โมเลกุลขนาดเล็ก โดยโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₇ และ (GlcNAc)₈ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2541). *การแยกเชื้อบริสุทธิ์และลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์*. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พูนศุข ศรีโยธา และ John Perberdy (2539). *เอนไซม์สลายไคตินและคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา*. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.
- มานะ ขวเมธ. (2563). *ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคว 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส*. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 15(2), 119-130.
- มานะ ขวเมธ และวรางคณา เทศทอง. (2564). *ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้าน*. *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.
- 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. (2012).^a Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-eleventh Edition. *CLSI document M02-A11*. 32(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. (2012).^b Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-ninth

- Edition. *CLSI document M07-A9. 322*). 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.
- Ikigai, H., Nakae T., Hara, Y. & Shimamura, T. (1993). Bactericidal Catechins Damage the Lipid Bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1147(1), 132-136.
- Kaomek, M. (2021). Antioxidant Activity of Chitooligosaccharides Produced by Chitinase Extracted from two Weeks Seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. *Journal of Applied Research on Science and Technology*, 20(2), 114-123.
- 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.
- Malik, A. (2019). Purification and Properties of Plant Chitinases: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 43(3), 1-11.
- Moon, C., Seo, D., Song, Y., Hong, S., Choi, S. & Jung, W. (2017). Antifungal Activity and Patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide Degradation via Chitinase Produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. *Microbial Pathogenesis*, 113, 218-224.
- Rios, J. L. & Recio, M. C. (2005). Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. *Journal of Ethno-pharmacology*, 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.
- 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 Phytoalexin Formation in Suspension- cultured Rice by N- Acetyl- chitooligodaccharides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 57(3), 405-409.
- Yin, C., Kikuchi, K., Hochgreb, T., Poss, K. D. & Stainier, D. Y. (2010). Hand 2 Regulates Extracellular Matrix Remodeling Essential for Gut- Looping Morphogenesis in Zebrafish. *Journal of Signal Transduction*, 18(6), 973-984.
- Yong, H, K., Seur, K. P., Jin, Y. H., & Young, C. K. (2017). Purification and Characterization of a Major Extracellular Chitinase from a Biocontrol Bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. *The Plant Pathology Journal*, 33(3), 318-328.
- Zhang, H., Liguang, D. & Xingju, Y. (1999). Preparation of Chitooligosaccharides from Chitosan by a Complex Enzyme. *Carbohydrate Research Journal*, 320, 257-260.