บทความวิชาการ

ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานตลอดจนอนุพันธ์และคอมพอสิตของไคโตซาน

บุญภพ ไชยศรีขวัญ[1] ณัฐธิดา รักกะเปา[1,2*] อติพล พัฒิยะ[1]
จรัสลักษณ์ เพชรวัง[1] และ อุไรวรรณ วีระพันธ์[1]

บทคัดย่อ

ไคโตซาน เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต และไม่เป็นพิษ ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินซึ่งพบเป็นองค์ประกอบในเปลือกแข็งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวก แมลง กุ้ง ปู หมึก และเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ ยีสต์ รา และสาหร่าย ด้วยคุณสมบัติพิเศษของไคโตซานที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และราหลายชนิด ดังนั้นจึงมีการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้ในหลายด้านที่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ การแพทย์ รวมถึงการเกษตร ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์และพัฒนากระบวนการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นบทความวิชาการนี้จึงได้รวบรวมข้อมูลทางวิชาการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ ตลอดจนการประยุกต์ใช้ไคโตซาน อนุพันธ์และคอมพอสิตของไคโตซาน รวมถึงการใช้ไคโตซานร่วมกับสารตัวเติมอื่นเพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ไว้อย่างครบถ้วน

คำสำคัญ: ไคโตซาน อนุพันธ์ คอมพอสิต ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ กลไก

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี
[2]สถานวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเมมเบรน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: dearnattida@hotmail.com

Anti-Microbial Activity and Mechanisms of Chitosan along with Chitosan Based Derivatives and Composites

Boonphop Chaisrikhwun[1], Natthida Rakkapao[1,2*], Atiphon Phatthiya[1], Jaraslak Pechwang[1], and Uraiwan Werapun[1]

ABSTRACT

Chitosan is a natural, biocompatible, and nontoxic polymer. It is a derivative of chitin, obtained from the hard outer shell or exoskeleton of invertebrates, including insects, shrimp, crab, squid, as well as from the cell walls of yeasts, molds and algae. Because of its anti-microbial properties against gram-positive and gram-negative bacteria as well as fungi, chitosan could have many anti-microorganism applications in fields such as food and textile industries, agriculture and medicine. Thus, understanding the antimicrobial mechanisms of chitosan is very important to the development of products and processes for such chitosan applications. In that context, this review summarizes the technical information available on anti-microbial activities and their mechanisms; and the current applications of chitosan or its derivatives, singly or in composites; and the synergistically antimicrobial combinations of chitosan and other fillers.

Keywords: chitosan, derivative, composite, anti-microbial activity, mechanism

[1]Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Suratthani Campus

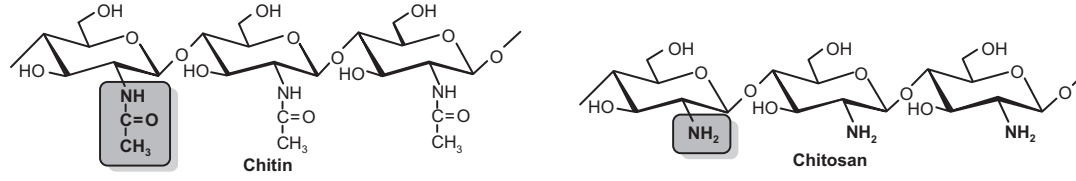
[2]Membrane Science and Technology Research Center, Prince of Songkla University, Hatyai Campus

[*]Corresponding author, e-mail: dearnattida@hotmail.com

บทนำ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติซึ่งได้จากกระบวนการ deacetylation โดยการกำจัดหมู่อะซีติล (acetyl) ของ *N*-acetyl-*D*-glucosamine ในโครงสร้างของไคตินให้เปลี่ยนเป็น glucosamine โดยไคโตซานเป็นพอลิเมอร์เส้นตรงของ (1-4)-linked-2-amino-2-deoxy-*D*-gucopyranose [1] โครงสร้างเคมีของไคตินและไคโตซานแสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งปฏิกิริยา deacetylation มักเกิดได้ไม่สมบูรณ์ จึงมักเรียกพอลิเมอร์ผสมที่ได้ว่า “ไคติน-ไคโตซาน” และเรียกค่าร้อยละของการเปลี่ยนแปลงจากหมู่อะซีติลในโครงสร้างของไคตินเป็นหมู่อะมิโนของไคโตซานว่า Degree of Deacetylation หรือ %DD ซึ่งหากไคติน-ไคโตซานมี %DD สูงจะเป็นการเพิ่มหมู่อะมิโนซึ่งมีสภาพประจุบวกในโครงสร้างของพอลิเมอร์ [2]

ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานและอนุพันธ์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ ราไวรัส และ สาหร่าย อีกทั้งไคโตซานยังมีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชได้ดี ดังนั้นไคโตซานและอนุพันธ์จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายทั้งด้านเกษตรกรรม การแพทย์และเภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง การบำบัดน้ำเสีย รวมถึงอุตสาหกรรมเส้นใยและสิ่งทอ ดังนั้นการเข้าใจถึงกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ดังนั้นบทความวิชาการนี้จึงได้รวบรวมข้อมูลทางวิชาการซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์และการประยุกต์ใช้ไคโตซานอนุพันธ์และคอมพอสิตของไคโตซาน ตลอดจนการใช้ไคโตซานร่วมกับสารตัวเติมอื่นเพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ไว้อย่างครบถ้วน



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของไคตินและไคโตซาน [3]

1. ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน

เมื่อค่า pH ต่ำกว่า pKa ของไคโตซาน (pH < 6.3) หมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองของวงแหวน Pyranose ของไคโตซานจะเกิดโปรโตเนชัน (protonation; $-NH_2 \rightarrow -NH_3^+$) ไคโตซานจึงละลายน้ำได้มากขึ้น ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่มากกว่าไคติน [4] จากรายงานผลการทดลองระบุว่าเมื่อไคโตซานเกิดโปรโตเนชันกลายเป็น polycationic chitosan จึงจะมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องจากประจุบวกในสายโซ่ไคโตซานจะเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีสภาพขั้วลบ และหากความหนาแน่นของประจุบวกมากขึ้นจะทำให้อันตรกิริยาระหว่างไคโตซานกับผนังเซลล์จุลินทรีย์รุนแรงขึ้นตามไปด้วย จึงส่งผลให้ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ความหนาแน่นประจุของไคโตซานนั้นแปรผันตรงกับ %DD หรือปริมาณหมู่อะมิโนในสายโซ่ไคโตซานซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดโปรโตเนชัน จากรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ pH 5.5 ด้วยไคโตซานที่มี %DD

แตกต่างกัน พบว่าไคโตซานที่มี %DD เท่ากับ 97.5 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคโตซานที่มี %DD เท่ากับ 83.7 [5] ซึ่งกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานสามารถสรุปได้ดังนี้

1.1 การเกิดแรงไฟฟ้าระหว่าง polycationic chitosan กับผนังเซลล์จุลินทรีย์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานเกิดจากแรงไฟฟ้าระหว่างหมู่อะมิโนของไคโตซานที่เกิดโปรโตเนชันกลายเป็น $-NH_3^+$ ทำให้เกิดสภาพประจุบวกบนสายโซ่ จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย lipopolysaccharide และโปรตีนซึ่งมีขั้วลบ [6] โดยแรงไฟฟ้าดังกล่าวทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ ส่งผลให้สมบัติการเลือกผ่านเข้าออกของสารเปลี่ยนแปลงไป จึงทำให้แรงดันออสโมติกภายในเซลล์ไม่สมดุล [4] และแรงไฟฟ้าดังกล่าวยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อชั้น peptidoglycan ในผนังเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ เช่น potassium ion (K^+) รวมถึงองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน, nucleic acid, glucose และ lactate dehydrogenase เป็นต้น [7] ด้วยกลไกดังกล่าวจึงทำให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญได้

1.2 ไคโตซานกลายเป็นฟิล์มบางปกคลุมบนผนังเซลล์จุลินทรีย์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานเกิดจากสายโซ่ร่างแหของไคโตซานกลายเป็นฟิล์มบางปกคลุมบนผนังเซลล์จุลินทรีย์เนื่องจากแรงไฟฟ้า ซึ่งชั้นฟิล์มดังกล่าวจะขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และทำให้สมบัติการเลือกผ่านสารเข้าออกจากเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้จุลินทรีย์ตาย [8] โดยพบว่าหากความเข้มข้นของไคโตซานต่ำเกินไป ($\leq$ 0.2 mg/ml) จะไม่สามารถเกิดเป็นโครงข่ายร่างแหที่มีสภาพประจุบวกและเข้าจับกับผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่มีขั้วลบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานให้สูงขึ้น พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น โดยไคโตซานจะเกิดเป็นโครงข่ายร่างแหปกคลุมบนผนังเซลล์จุลินทรีย์ ห่อหุ้มเซลล์ และก่อให้เกิดการรวมตัวอยู่ในรูปของสารแขวนลอย [9]

1.3 การแทรกซึมของไคโตซานโอลิโกเมอร์เข้าไปยังภายในเซลล์จุลินทรีย์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากไคโตซานที่มีลักษณะเป็นสายโซ่สั้นๆ หรือโอลิโกเมอร์เคลื่อนที่ผ่านช่องว่างของผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วยชั้น peptidoglycan และเข้าไปยังภายในเซลล์จุลินทรีย์ คอยขัดขวางและทำให้เกิดความผิดปกติของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยไคโตซานโอลิโกเมอร์เกิดจากเอนไซม์ chitosanase จากจุลินทรีย์บางชนิดตัดสายโซ่ไคโตซานทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงจนสามารถเล็ดลอดผ่านเข้าไปยังภายในเซลล์จุลินทรีย์และแทรกซึมในนิวเคลียสได้ จากนั้นจะไปรวมตัวกับ DNA แล้วยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA และการแปลรหัส RNA จึงรบกวนกระบวนการสร้างโปรตีนและเอนไซม์ของจุลินทรีย์ [10] นอกจากนี้ไคโตซานโอลิโกเมอร์ยังสามารถกระจายตัวแทรกซึมไปทั่วทั้งเซลล์จุลินทรีย์ คอยดูดซับสารอาหารของเซลล์ที่มีสภาพขั้วลบแล้วทำให้เกิดการตกตะกอน ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ [11] สำหรับไคโตซานที่มีสายโซ่ยาวหรือโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างจากไคโตซานโอลิโกเมอร์ โดยจะเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำหน้าที่ควบคุมการเข้าออกของสารผ่านผนังเซลล์ ดังนั้นโมเลกุลไคโตซานทั้งกรณีที่มีสายโซ่สั้นและยาวต่างก็มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ แม้จะเกิดผ่านกลไกที่แตกต่างกันก็ตาม [12]

1.4 การเกิดคีเลตระหว่างโมเลกุลไคโตซานกับไอออนของโลหะ

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากโมเลกุลไคโตซานสามารถเกิดคีเลตกับไอออนของโลหะ

เช่น Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Cu^{2+} ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง ซึ่งไอออนของโลหะบางชนิดเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์รวมไปถึงสปอร์ของจุลินทรีย์ด้วย อีกทั้งสารคีเลตของไคโตซานกับไอออนของโลหะยังสามารถจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และทำลายกลไกควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร จึงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [13]

1.5 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของไคโตซาน

ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบโดยเกิดผ่านกลไกที่แตกต่างกัน จากรายงานผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และแกรมลบ คือ *Escherichia coli* นั้นตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงมวลโมเลกุลของไคโตซานแตกต่างกัน โดยเมื่อมวลโมเลกุลของไคโตซานเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกจะเพิ่มขึ้น ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบกลับลดลง จากรายงานผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1%w/v ไคโตซานมวลโมเลกุล 305 kDa สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้เท่านั้น แต่เมื่อลดมวลโมเลกุลลงกระทั่งน้อยกว่า 305 kDa กลับพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของทั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ได้ แต่หากลดมวลโมเลกุลลงกระทั่งน้อยกว่า 5 kDa พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้อย่างสมบูรณ์ แม้จะใช้ความเข้มข้นเพียง 0.25%w/v ทั้งนี้ในกรณีของแบคทีเรียแกรมลบพบว่าหากไคโตซานมีมวลโมเลกุลน้อยๆ จะสามารถแทรกซึมและกระจายตัวไปทั่วทั้งเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถดูดซับสารอาหารของเซลล์ที่มีสภาพประจุบวก จึงทำให้จุลินทรีย์ตายลงในที่สุด [11]

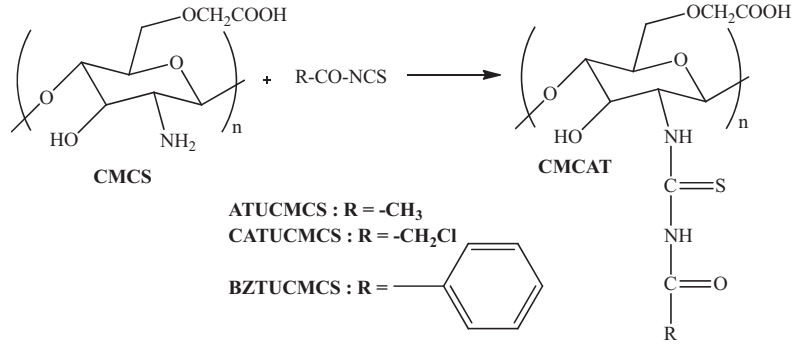
2. ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ไคโตซาน

เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อย โดยไคโตซานจะละลายน้ำได้เมื่ออยู่ในรูปโปรโตเนชัน ดังนั้นในการเตรียมสารละลายไคโตซานจึงจำเป็นต้องใช้กรดอ่อน เช่น กรดอะซิติก หรือกรดฟอร์มิก เป็นตัวทำละลาย อีกทั้งค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการนำสารละลายไคโตซานไปใช้ประโยชน์ยังถูกจำกัดเพียงช่วงที่ต่ำกว่าค่า pK_a ของไคโตซาน ($pH < 6.3$) โดยหากค่า $pH > pK_a$ ไคโตซานจะตกตะกอนทันที เนื่องจากโมเลกุลเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปที่เป็นกลาง ($-NH_3^+ \rightarrow -NH_2$) ดังนั้นประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานจึงแปรผันตามการเกิดโปรโตเนชันของหมู่อะมิโน ซึ่งสัมพันธ์กับสมบัติการละลายน้ำของไคโตซาน โดยหากไคโตซานละลายน้ำได้มากขึ้นก็จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และยังเป็นการขยายขอบเขตของการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ไม่ให้ถูกจำกัดเพียงช่วง $pH < pK_a$ เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าวจึงได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซาน โดยเปลี่ยนจากหมู่ $-NH_2$ หรือ -OH ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวในโครงสร้างของไคโตซาน ไปเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วและชอบน้ำมากขึ้นเพื่อเพิ่มสมบัติการละลายน้ำ หรืออาจเปลี่ยนเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีขึ้น ดังตัวอย่างอนุพันธ์ต่อไปนี้

2.1 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ Carboxymethyl Chitosan และ Carboxymethyl Chitosan Acyl Thiourea

Carboxymethyl Chitosan (CMCS) มีหมู่ carboxylic ซึ่งชอบน้ำจึงช่วยเพิ่มสมบัติการละลายน้ำ และยังสามารถแตกตัวให้ H^+ แก่หมู่ $-NH_2$ แล้วเปลี่ยนเป็น $-NH_3^+$ ได้ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล ทำให้ได้ polycationic chitosan ที่มีความหนาแน่นของประจุบวกสูง จึงเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ให้ดียิ่งขึ้นด้วย โดยจากรายงานพบว่า CMCS มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี โดย CMCS สามารถ

กระจายตัวอยู่ภายในส่วนต่างๆ ของเซลล์เชื้อรา และรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา [14] และยังพบว่าการใช้ CMCS ร่วมกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ จะยิ่งเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียให้ดีขึ้นประมาณ 3-4 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้ CMCS เพียงอย่างเดียว [15] นอกจากหมู่ carboxylic แล้ว การเพิ่มหมู่ acyl thiourea ของ Carboxymethyl Chitosan Acyl Thiourea (CMCAT) จะยิ่งเพิ่มค่าการละลายทั้งในตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำ อีกทั้งหมู่ C=O และ NH ซึ่งสามารถเกิดโปรโตเนชันได้ จึงช่วยเพิ่มความหนาแน่นของประจุบวก และทำให้เกิดโครงสร้างตาข่ายของ polycationic ซึ่งส่งผลให้ CMCAT มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และหมู่ acyl thiourea ซึ่งมีขนาดใหญ่และเกะกะยังช่วยลดการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ทำให้ CMCAT ละลายได้ดียิ่งขึ้น จึงสามารถแทรกซึมเข้าไปยังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นด้วย คอยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์โดยขัดขวางการถอดรหัสพันธุกรรมจาก DNA ไปยัง RNA ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ CMCAT ดังกล่าวสูงกว่าไคโตซาน อีกทั้งหมู่ acyl thiourea และ carboxylic ยังสามารถเกิดคีเลตได้ดีกว่าไคโตซานอีกด้วย [14] โดยโครงสร้างเคมี CMCS และ CMCAT แสดงดังรูปที่ 2

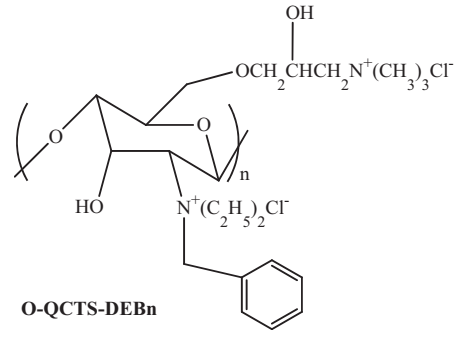


รูปที่ 2 โครงสร้างเคมีของ Carboxymethyl Chitosan และ Carboxymethyl Chitosan Acyl Thiourea [14]

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า CMCAT มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกนั้นแตกต่างจากของแกรมลบ แม้ว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะหนากว่าของแกรมลบ แต่กลับมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น peptidoglycan ซึ่งเป็นโครงร่างตาข่ายและมีรูพรุนจำนวนมาก ซึ่งยอมให้สารจากภายนอกผ่านเข้ามาภายในเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้อย่างง่ายดาย และจะเกิดการดูดซับอย่างรวดเร็วขององค์ประกอบภายในเซลล์ ในทางกลับกันแม้ว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะบางกว่าแต่กลับมีความซับซ้อนมากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก โดยผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย lipopolysaccharide, lipoprotein และ phospholipid ห่อหุ้มชั้น peptidoglycan ไว้ซึ่งทำให้เป็นอุปสรรคต่อการแพร่ของสารผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้จากรายงานผลการทดลองพบว่าไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยเกิดผ่านกลไกที่แตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันนั่นเอง แต่โดยส่วนใหญ่แล้วไคโตซานและอนุพันธ์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ [16]

2.2 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *O*-quaternized-*N*,*N*-biethyl-*N*-benzyl ammonium chitosans chloride

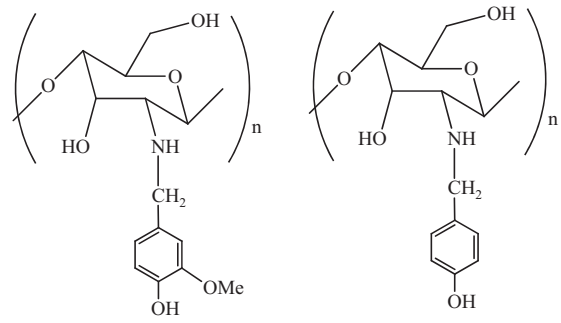
O-quaternized-*N*,*N*-biethyl-*N*-benzyl ammonium chitosans chloride (O-QCTS-DEBn) คืออนุพันธ์ของไคโตซานที่ละลายน้ำได้ดี โดยมีหมู่ฟังก์ชัน ammonium salt จำนวน 2 หมู่ ซึ่งขาดอิเล็กตรอนและชอบเกิดอันตรกิริยากับองค์ประกอบที่มีสภาพขั้วลบในผนังเซลล์จุลินทรีย์ โดยหมู่ฟังก์ชัน Quaternary ammonium salt จะเข้าจับกับผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้สูญเสียความสามารถในการคัดเลือกสารผ่านเข้าและออกจากเซลล์ ทั้งนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* ซึ่งผนังเซลล์ประกอบด้วยโปรตีน, teicholic acid, lipopolysaccharide ที่มีขั้วลบ จึงเกิดอันตรกิริยากับหมู่ ammonium salt ซึ่งมีประจุบวกของ O-QCTS-DEBn ได้ดี ทำให้เกิดการเชื่อมโยงกันเป็นโครงข่ายขนาดใหญ่ของพอลิเมอร์และเซลล์แบคทีเรีย กระทั่งมีขนาดใหญ่และน้ำหนักมากพอจึงตกตะกอนในที่สุด และยังพบว่า O-QCTS-DEBn คอยยับยั้งการทำหน้าที่ของผนังเซลล์ในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร ทำให้เซลล์แบคทีเรียขาดสารอาหารที่จำเป็นจึงตายในที่สุด [17] โครงสร้างของ O-QCTS-DEBn แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างเคมีของ *O*-quaternized-*N*,*N*-biethyl-*N*-benzyl ammonium chitosans chloride [17]

2.3 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *N*-Vanillyl Chitosan และ 4-Hydroxybenzyl Chitosan

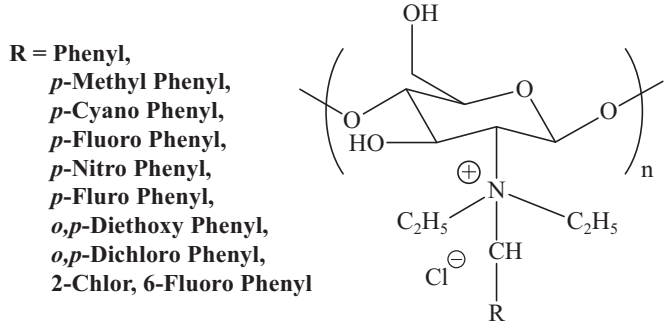
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งผลิตสารพิษ aflatoxin B_1 และ B_2 ของ *N*-vanillyl chitosan (VC) และ 4-hydroxybenzyl chitosan (HC) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซาน และมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าแผ่นฟิล์ม VC มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตสารพิษ aflatoxin B_1 ได้ถึง 98.9% และยับยั้งการผลิตสารพิษ aflatoxin B_2 ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่แผ่นฟิล์ม HC มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตสารพิษทั้ง aflatoxin B_1 และ B_2 ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากอนุพันธ์ทั้งสองชนิดอยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ จึงสามารถแพร่ไปยังเส้นใยของราและรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นทั้งแผ่นฟิล์ม VC และ HC จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหารแบบแอคทีฟ ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงของผู้บริโภคต่อปัญหาที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น [18]



รูปที่ 4 โครงสร้างเคมีของ *N*-vanillyl chitosan and 4-hydroxybenzyl chitosan [18]

2.4 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุพันธ์กลุ่ม Quaternary *N*-(benzyl) Chitosan

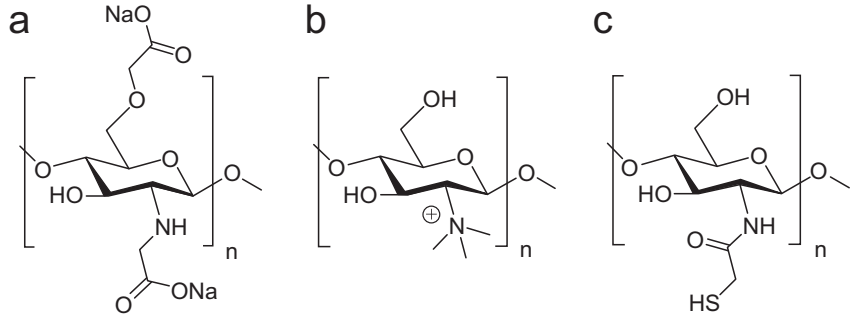
Quaternary *N*-(benzyl) Chitosan (QC) คือกลุ่มอนุพันธ์ของไคโตซานที่มีการเปลี่ยนจากหมู่ $-NH_2$ เป็นหมู่ quaternary *N*-(benzyl) ต่างๆ ซึ่งโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 5 โดย QC มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราก่อโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงสามารถใช้ QC เพื่อป้องกันการเกิดโรคพืชทดแทนการใช้ยาฆ่าแมลงซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จากรายงานผลการทดลองพบว่า QC มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อพืช คือ *Agrobacterium tumefaciens* และ *Erwinia carotovora* รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้แก่ *Botrytis cinerea, Botryodiplodia theobromae, Fusarium oxysporum* และ *Phytophthora infestans* อีกทั้งยังพบว่า QC ที่ความเข้มข้น 1 g/L ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์และมีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ polygalacturonase (PGase), pectin-lyase (PLase), polyphenol oxidase (PPOase) และ cellulase [19] นอกจาก QC แล้วยังมีการทดลองนำอนุพันธ์อื่น คือ acetyl phenyl-thiosemicarbarzone-chitosan ซึ่งไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและย่อยสลายได้เองทางชีวภาพมาใช้เพื่อจุดประสงค์เดียวกันนี้ด้วย



รูปที่ 5 โครงสร้างเคมีของ quaternary *N*-(benzyl) chitosan derivatives [19]

2.5 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ Chitosan Thioglycolic Acid

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ Chitosan thioglycolic acid (TGA) ที่มวลโมเลกุลต่ำ (LM_w-TGA) และมวลโมเลกุลปานกลาง (MM_w-TGA) เพื่อประยุกต์ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ พบว่า MM_w-TGA มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีกว่า LM_w-TGA และอนุพันธ์ของไคโตซานอื่นๆ คือ trimethyl chitosan (TMC), carboxymethyl chitosan (CMC) ซึ่งมีโครงสร้างเคมีแสดงดังรูปที่ 6 โดย MM_w-TGA มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Streptococcus sobrinus* ได้อย่างสมบูรณ์ และลดจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Neisseria subflava* ลงได้ 99.99% รวมถึงลดจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Candida albicans* ลงได้ 99.97% โดย TGA ซึ่งเป็น polycationic จะเข้าจับกับองค์ประกอบที่มีสภาพขั้วลบในผนังเซลล์จุลินทรีย์และคอยขัดขวางการเข้าออกของสารผ่านผนังเซลล์ อีกทั้ง TGA ยังมีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารเคมีออกสู่ภายนอกเซลล์ TGA ยังสามารถเกิดคีเลตกับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ และ TGA ยังไปรบกวนการทำงานของ mRNA และขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์อีกด้วย ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. sobrinus* ของ LM_w-TGA และ MM_w-TGA เทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่า ทั้ง LM_w-TGA และ MM_w-TGA ต่างมีฤทธิ์ทำลายและสร้างความเสียหายต่อเซลล์แบคทีเรีย โดย MM_w-TGA มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า LM_w-TGA [20]

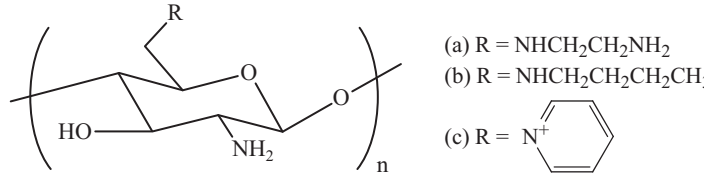


รูปที่ 6 โครงสร้างเคมีของ carboxymethyl chitosan (a), trimethyl chitosan (b), chitosan thioglycolic acid (c) [20]

2.6 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุพันธ์กลุ่ม Deoxychitosan

เนื่องจากปกติแล้วไคโตซานนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่ไม่โดดเด่นนัก ดังนั้นจึงมีการสังเคราะห์อนุพันธ์กลุ่ม deoxychitosan ได้แก่ 6-aminoethylamino-6-deoxychitosan (ADC), 6-butylamino-6-deoxychitosan (BDC) และ 6-pyridyl-6-deoxychitosan (PDC) ขึ้นเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยโครงสร้างเคมีของอนุพันธ์แสดงดังรูปที่ 7 จากรายงานผลการทดลองพบว่าอนุพันธ์ทั้งสามชนิดต่างมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดีกว่าไคโตซาน โดย BDC มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดี ขณะที่ ADC มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus, E. coli, Bacillus anthracis* และ *Salmonella typhi* ได้โดดเด่นที่สุดเมื่อเทียบกับอนุพันธ์อื่น และยังให้ผลดีกว่าการใช้ Streptomycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจาก ADC ประกอบด้วยหมู่ $-NH_2$ จำนวนมากจึงเกิดโปรโตเนชันได้ดี

ส่งผลให้มีความเข้มของประจุบวกมากที่สุดเมื่อเทียบกับอนุพันธ์อื่นในกลุ่มเดียวกัน [21] จากรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของอนุพันธ์กลุ่ม deoxychitosan แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิดต่างมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia cerealis, Fusarium oxysporum* และ *Botrytis cinerea* ที่ดีกว่าไคโตซาน โดยพบว่า ADC ซึ่งมีหมู่ -NH_2 ในโครงสร้าง มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. cinerea* ได้ดีที่สุด ขณะที่ BDC ซึ่งมีหมู่ alkyl group ในโครงสร้าง มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *R. cerealis* และ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด และเป็นอนุพันธ์เพียงชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Fusarium graminearum* จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าความแตกต่างของหมู่ฟังก์ชันนั้นมีผลอย่างมากต่อฤทธิ์และกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ไคโตซาน [21]



รูปที่ 7 โครงสร้างเคมีของ 6-aminoethylamino-6-deoxychitosan (a), 6-butylamino-6-deoxychitosan (b) และ 6-pyridyl-6-deoxychitosan (c) [21]

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของไคโตซานและอนุพันธ์กลุ่ม deoxychitosan [21]

Compound	Inhibition rate (%)			
	F. graminearum	*R. cerealis*	*F. oxysporum*	*B. cinerea*
chitosan	-	7.34^{c}	11.68^{c}	21.19^{c}
6-aminoethylamino-6-deoxychitosan (ADC)	-	22.48^{b}	21.83^{b}	63.56^{a}
6-butylamino-6-deoxychitosan (BDC)	8.56	28.44^{a}	28.43^{a}	31.92^{b}
6-pyridyl-6-deoxychitosan (PDC)	-	22.48^{b}	23.35^{b}	28.25^{b}

หมายเหตุ* Duncan's SSR ค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 3 ครั้ง ข้อมูลในคอลัมน์เดียวกันและมีตัวอักษรกำกับเดียวกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

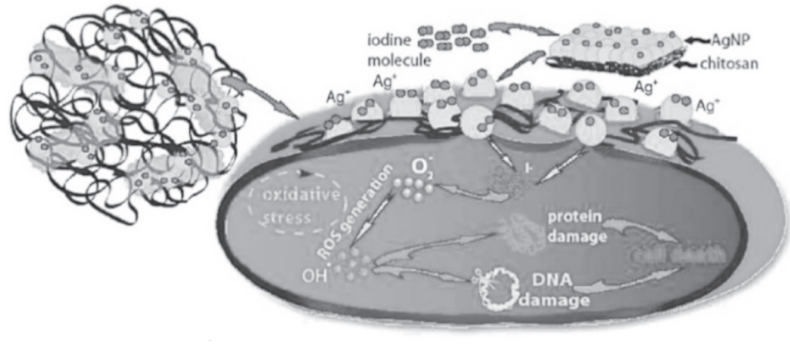
3. ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคอมพอสิตของไคโตซาน

เมื่อนักวิทยาศาสตร์พบว่าอนุภาคนาโนอินทรีย์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ทำให้การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุภาคนาโนอินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมาก แต่จากปัญหาการเกาะตัวกันของอนุภาคทำให้กระจายในตัวกลางได้ไม่ดีนัก จึงเป็นข้อจำกัดสำคัญของการนำอนุภาคนาโนอินทรีย์ไปประยุกต์ใช้สำหรับยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้วัสดุคอมพอสิตของไคโตซานและอนุภาคนาโนอินทรีย์จึงถูกเตรียมขึ้นโดยไคโตซานมีบทบาทเป็นตัวทำกระจายของอนุภาคนาโนดังกล่าว ซึ่งทั้งไคโตซานและอนุภาคนาโนต่างก็ช่วยเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของกันและกันได้อย่างดียิ่ง ทั้งนี้มีการเตรียมคอมพอสิตของ

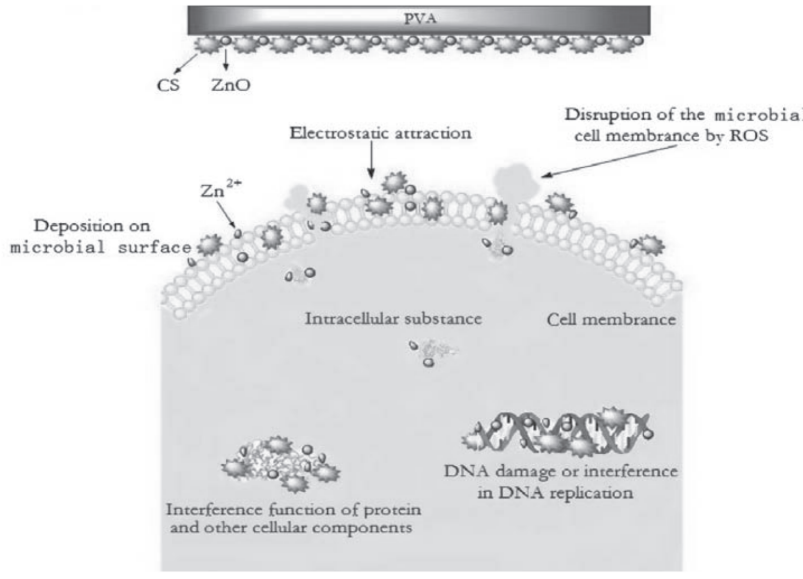
ไคโตซานกับอนุภาคนาโนอินทรีย์หลากหลายชนิด โดยมีฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ดังตัวอย่างต่อไปนี้

3.1 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ silver/chitosan Janus nanoparticles เริ่มจากประจุบวกของ polycationic chitosan ไปเกิดการดูดซับและปกคลุมบนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งมีขั้วลบ จากนั้นอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (silver nanoparticles; AgNPs) จะปลดปล่อย Ag^+ เข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ จากนั้น Ag^+ จะเข้าสู่นิวเคลียสและรบกวนการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายลงในที่สุด โดยพบว่า silver/chitosan Janus nanoparticles สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ [22] โดยกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ AgNPs เกิดจาก Ag^+ ซึ่งปลดปล่อยจากอนุภาคและเข้าไปจับกับ sulfhydryl groups ของเมแทบอลิคเอนไซม์ (metabolic enzymes) ของเซลล์แบคทีเรีย ขัดขวางกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน และ Ag^+ ที่เข้าจับกับ DNA จะรบกวนการแบ่งเซลล์ อีกทั้งอนุมูลอิสระที่ปลดปล่อยออกมาจากผิวอนุภาค AgNPs ยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย รวมถึง AgNPs ยังสามารถแทรกซึมเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรง ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและองค์ประกอบภายในเซลล์ ทำลายกลไกควบคุมการแพร่ผ่านของสารเข้าและออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด [23] นอกจากการใช้ไคโตซานร่วมกับอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (chitosan-silver nanoparticles; CS-AgNPs) เพียงอย่างเดียวแล้ว ยังมีการสังเคราะห์ Iodinated chitosan AgNPs composite โดยเพิ่มไอโอดีนลงไปเพื่อเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ให้ดียิ่งขึ้น โดยกลไกการยับยั้งแบคทีเรียของคอมพอสิตดังกล่าวเริ่มจาก polycationic chitosan เข้าปกคลุมบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีขั้วลบ สายโซ่ไคโตซานจะนำพา AgNPs ซึ่งมีโมเลกุลไอโอดีนเกาะอยู่ที่ผิวติดไปด้วย จากนั้นจึงปลดปล่อยไอโอดีนไอออนเข้าสู่เซลล์และก่อให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งจะไปทำลาย DNA และโปรตีน ส่งผลให้เซลล์ผิดปกติและตายในที่สุด ขณะเดียวกัน AgNPs และไคโตซานยังทำให้ผนังเซลล์เสียหาย ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์ ซึ่งกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ Iodinated chitosan AgNP composite แสดงดังรูปที่ 8 [24]



รูปที่ 8 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ Iodinated chitosan AgNP composite [24]



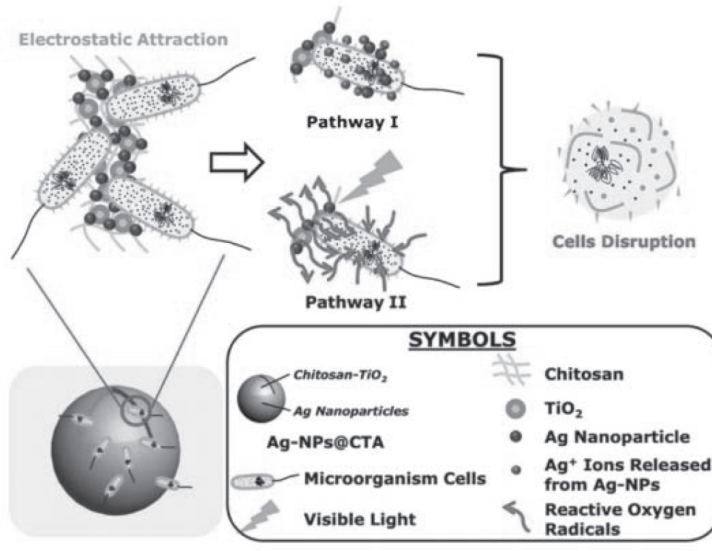
รูปที่ 9 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ chitosan/nano-ZnO composite [25]

3.2 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์

การใช้ไคโตซานร่วมกับอนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ (nano-ZnO) แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เมื่ออยู่ภายใต้แสงในย่าน UV-VIS โดยเมื่ออนุภาค nano-ZnO ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะทำให้เกิด electron hole pairs ซึ่งทำให้โมเลกุลน้ำเกิดการแตกตัวกลายเป็น OH^- และ H^+ จากนั้น H^+ จะเข้าทำปฏิกิริยากับ OH^- ที่พื้นผิวของอนุภาค nano-ZnO กลายเป็น Hydroperoxyl radical ($HO_2^{\bullet}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวสูงจึงมีฤทธิ์ทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ ขณะเดียวกัน Zn^{2+} ซึ่งถูกปลดปล่อยจากอนุภาค จะเข้าจับกับโปรตีนและเกิดอันตรกิริยากับกรดนิวคลีอิก และไปยับยั้งกระบวนการคัดลอกรหัสทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ได้ และ Zn^{2+} ยังสามารถเกิดอันตกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการแลกเปลี่ยนสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ด้วย [25] อีกทั้งอนุภาค nano-ZnO ยังสามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยตรง โดยไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) และการทำงานของโปรตีน และ DNA ภายในเซลล์ [26] กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับอนุภาค nano-ZnO โดยมี Polyvinyl alcohol (PVA) เป็นตัวรองรับแสดงดังรูปที่ 9 โดยทั้งไคโตซาน อนุภาค nano-ZnO รวมถึงไอออนต่างๆ ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะเกิดการสะสมและถูกตรึงอยู่บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้ผนังเซลล์เสียสภาพจึงสูญเสียสมบัติการเลือกผ่านสารเข้าและออกจากเซลล์ ยิ่งกว่านั้นอนุภาค nano-ZnO ยังทำให้เกิดออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; $O_2^{\bullet -}$) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์และทำให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์จุลินทรีย์ ขณะเดียวกันโมเลกุลไคโตซานที่สามารถแทรกซึมผ่านเข้ามายังภายในเซลล์จะเข้ารวมตัวกับ DNA และ RNA เข้าขัดขวางกระบวนการจำลองแบบของจีโนม จะเห็นได้ว่าการทำงานร่วมกันของไคโตซานและ nano-ZnO จึงสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [25]

3.3 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับอนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์และอนุภาคนาโนซิลเวอร์

Silver nanoparticles@chitosan-TiO_2 (AgNPs@CTA) คือคอมพอสิตของ 3 องค์ประกอบ ได้แก่ AgNPs, TiO_2 และ ไคโตซาน ซึ่งต่างก็มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทั้งนี้กลไกการทำงานร่วมกันเพื่อยับยั้งแบคทีเรียของแต่ละองค์ประกอบใน AgNPs@CTA แสดงดังรูปที่ 10 [27] โดยเริ่มจากเซลล์แบคทีเรียถูกตรึงบนพื้นผิว AgNPs@CTA โดยอันตรกิริยาเกิดผ่านแรงทางไฟฟ้าระหว่างผนังเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีขั้วลบกับ polycationic chitosan และ Ag^+ บนพื้นผิว AgNPs ดังนั้นจึงทำให้แต่ละองค์ประกอบใน AgNPs@CTA สามารถเข้าทำลายเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์จุลินทรีย์นั้นเกิดจาก 2 องค์ประกอบหลัก คือ AgNPs และ TiO_2 เป็นสำคัญ



รูปที่ 10 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของ AgNPs@CTA [27]

ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของ AgNPs นั้นเกิดจาก Ag^+ อิสระซึ่งถูกปลดปล่อยจากพื้นผิวของ AgNPs โดยเกิดผ่าน 3 กลไก ดังนี้ (1) Ag^+ เกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์แล้วทำลายกลไกควบคุมการแพร่ผ่านของสารเข้าและออกจากเซลล์ (2) Ag^+ ทำปฏิกิริยากับ thiols ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเซลล์ จึงทำให้เกิดความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น รวมตัวกับเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อระบบลูกโซ่การหายใจของแบคทีเรีย (bacteria respiratory chain) และทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชั่นภายในเซลล์ (intracellular oxidative stress) (3) Ag^+ เข้าทำปฏิกิริยากับฟอสฟอรัสซึ่งเป็นองค์ประกอบใน DNA จึงยับยั้งการจำลองตัวโดยขัดขวางการคลี่ออกของสายโซ่ DNA สำหรับฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของ TiO_2 นั้นมีความรุนแรงและโดดเด่นกว่า AgNPs โดยหากคอมพอสิตถูกกระตุ้นด้วยแสง UV-VIS จะทำให้ TiO_2 เกิดปฏิกิริยาและปลดปล่อยออกซิเจนที่ว่องไว เช่น $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2 และ $HO_2^{\bullet}$ ซึ่งต่างมีฤทธิ์ทำลายเซลล์จุลินทรีย์ โดยออกซิเจนที่ว่องไวเหล่านี้จะเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์จึงทำให้เซลล์แตก เซลล์จุลินทรีย์จึงถูกทำลายลง

3.4 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของอนุพันธ์ไคโตซานร่วมกับอนุภาคอะลูมิโนเกต

คอมพอสิตของอนุพันธ์ไคโตซาน quaternized carboxymethyl chitosan oligosaccharide และ rectorite ซึ่งเป็นอนุภาคอะลูมิโนเกต หรือ QCOR nanocomposite ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดย rectorite ทำหน้าที่ดูดซับเซลล์จุลินทรีย์และตรึงไว้เพื่อให้โมเลกุล quaternized carboxymethyl chitosan oligosaccharide ซึ่งมีประจุบวก เข้าไปเกิดอันตรกิริยาและออกฤทธิ์ทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นเมื่อรวมทั้งสององค์ประกอบเข้าด้วยกันจึงยิ่งเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น และพบว่าฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จะแปรผันตามความเข้มข้นของอนุพันธ์ไคโตซาน [28]

4. ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานเมื่อใช้ร่วมกับสารตัวเติมอื่น

นอกจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพและเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แก่ไคโตซาน โดยการใช้ร่วมกับสารตัวเติมอื่น ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเพื่อนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้สำหรับยับยั้งจุลินทรีย์ โดยตัวอย่างการใช้ไคโตซานร่วมกับสารตัวเติมต่างๆ มีดังต่อไปนี้

4.1 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับน้ำมันหอมระเหย

แม้จะมีการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้สำหรับยับยั้งจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง แต่กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยกลับยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจนนัก ทั้งนี้เป็นเพราะน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดก็มีองค์ประกอบที่หลากหลายและแตกต่างกัน จึงส่งผลให้มีฤทธิ์และกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกันตามไปด้วย โดยมีรายงานว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยเกิดจากโมเลกุลน้ำมันสามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียเข้าไปภายในและออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้ [29] โดยสารประกอบฟีนอลิกซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจะเข้าจับกับ phospholipid บนเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เซลล์แตกจึงเกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึมและสารองค์ประกอบภายในเซลล์ อีกทั้งสารประกอบฟีนอลิกยังสามารถเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์โครงสร้างเซลล์ และรบกวนระบบการผลิตพลังงานภายในเซลล์ (ATP) ทำลายระบบขับเคลื่อนโปรตอน จึงทำให้ความเข้มข้นของโปรตอนภายในและภายนอกเซลล์ไม่สมดุลกัน และเกิดการรวมตัวกันขององค์ประกอบภายในเซลล์ [29]

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยเป็นโมเลกุลที่มีสภาพขั้วต่ำจึงเกิดอันตรกิริยากับไขมัน (lipid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และไมโตคอนเดรียได้ดี น้ำมันหอมระเหยจึงสามารถเข้าทำลายโครงสร้างเซลล์ ทำให้เซลล์แตกและเกิดการรั่วไหลของไอออนและสารองค์ประกอบภายในเซลล์ [29] อีกทั้งสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไม่มีขั้วในน้ำมันหอมระเหย ยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ ATPases ซึ่งอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์และถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลไขมัน โดยโมเลกุลไฮโดรคาร์บอนเหล่านั้นจะเกิดการสะสมในชั้นไขมัน (lipid bilayer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี จึงขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไขมันกับโปรตีนในเซลล์ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยยังเร่งการเจริญของ Pseudomycelia ในยีสต์ ทำให้เซลล์แยกออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ และน้ำมันหอมระเหยยังสามารถเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่สร้างพลังงานหรือสังเคราะห์โครงสร้างเซลล์อีกด้วย [30]

ทั้งนี้ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus enteritidis, B. subtilis,* และ *S. aureus* นั้นดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *Shigella dysenteriae* เนื่องจากผนังเซลล์ของ

แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย lipopolysaccharide ซึ่งมีขั้วและมีความซับซ้อนมากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก จึงขัดขวางการแทรกซึมของโมเลกุลน้ำมันหอมระเหยซึ่งไม่มีขั้วผ่านเข้าไปทำลายเซลล์นั่นเอง [30] ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มซึ่งมักประกอบด้วยสารกลุ่มแอลกอฮอล์ พบว่า carvacrol ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดย carvacrol ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า eugenol หรือ menthol ทั้งนี้เนื่องจาก carvacrol มีสภาพขั้วต่ำกว่า จึงเกิดการสะสมในชั้นไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ ขณะเดียวกันกลับพบว่า carvacrol และ thimol ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วย โดยเกิดผ่านกลไกที่แตกต่างจากของแบคทีเรียแกรมบวก คือ carvacrol และ thimol ต่างทำให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ [31] Cinnamaldehyde (CA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* โดย CA เข้ายับยั้งหรือรบกวนระบบ autoinducer-2 (AI-2) ของเซลล์จุลินทรีย์ และเมื่อใช้ CA ร่วมกับไคโตซานพบว่าต่างช่วยเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น [32]

4.2 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานร่วมกับโมเลกุลสบู่

เนื่องจากฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานเพียงอย่างเดียวยังไม่ดีนัก ดังนั้นโมเลกุลสบู่ (surfactant) ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัวที่มีขั้วและส่วนหางเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่มีขั้ว เช่น nonionic surfactant-alkyl β-D-glucopyranoside (AG) จึงถูกนำมาใช้ร่วมกับไคโตซาน และพบว่าทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานและ AG มีความเข้ากันได้โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง $-NH_3^+$ ของไคโตซาน กับส่วนหัว (-OH) ของโมเลกุล AG จึงช่วยลดการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ไคโตซานเอง ดังนั้น AG จึงช่วยให้สายโซ่ polycationic chitosan เกิดการคลายตัวและมีหมู่ $-NH_3^+$ อิสระซึ่งใช้ในการเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์จุลินทรีย์มากขึ้น ขณะเดียวกันส่วนหาง (alkyl aglycone) ของโมเลกุล AG ซึ่งมีขั้วต่ำ จึงสามารถแทรกซึมและพาโมเลกุลไคโตซานผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้น โดยไคโตซานจะเข้าจับกับ phosphoryl groups ของ phospholipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะไอออนิกที่แข็งแรง คอยรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ [33]

นอกจากนี้ยังมีการใช้ C_{12}-C_{18} alkyl amino prophyldimethylamine betaine (AAPDB) ร่วมกับไคโตซาน โดยกลไกการทำงานของ AAPDB มีความคล้ายคลึงกับ AG คือส่วนหัวซึ่งมีขั้วคอยทำหน้าที่ยึดเกาะกับผนังเซลล์จุลินทรีย์ โดยอันตรกิริยาเกิดผ่านหมู่ -OH ของทั้งไคโตซานและ AAPDB สำหรับส่วนหางซึ่งไม่มีขั้วของโมเลกุล AAPDB จะทำหน้าที่แทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์เพื่อนำพาโมเลกุลไคโตซานเข้าไปทำลายเซลล์จึงส่งผลให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดีขึ้น ทั้งนี้พบว่าการใช้ไคโตซานร่วมกับ AAPDB มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแกรมบวก [34]

4.3 ฤทธิ์และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไอออนเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานกับโลหะ

สารเชิงซ้อนระหว่าง polycationic chitosan กับ Zn^{2+} (CS-Zn^{2+}) นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียว เนื่องจากสารเชิงซ้อนมีความเข้มของประจุบวกมากกว่า จึงเกิดอันตรกิริยากับองค์ประกอบในผนังเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีสภาพขั้วลบได้ดีกว่า ทั้งนี้กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเชิงซ้อน CS-Zn^{2+} นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด โดยพบว่าสารเชิงซ้อนของไคโตซานกับ Zn^{2+} และ Ag^+ ต่างมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับ *E. coli* และ *Corynebacterium* ซึ่ง

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ CS-Ag^+ เกิดจาก Ag^+ ซึ่งมีขนาดเล็กจึงสามารถแทรกซึมเข้าไปยังเซลล์จุลินทรีย์และเข้าทำปฏิกิริยาโดยจับกับหมู่ -SH ของโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพและขัดขวางการจำลอง DNA ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานกับไอออนโลหะ 3 ชนิด ได้แก่ Zn^{2+}, Zr^{2+} และ Ag^+ มีความแตกต่างกันโดยมีลำดับดังนี้ CS-Zn^{2+} > CS-Zr^{2+} > CS-Ag^+ [35]

สรุป

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยกระบวนย่อยสลายทางธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ รา โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานนั้นสามารถเกิดผ่านหลายกลไก ทั้งนี้กลไกสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากสภาพประจุบวกของไคโตซานหลังผ่านกระบวนการโปรโตเนชัน จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับผนังเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีสภาพขั้วลบและทำให้ผนังเซลล์เสียสภาพ อีกทั้งหมู่อะมิโนของไคโตซานยังสามารถดูดซับสารอาหารและไอออนของโลหะที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ลดลงหรืออาจตายได้ ขณะเดียวกันหากความเข้มข้นของไคโตซานสูงพอ สายโซ่ร่างแหของไคโตซานยังสามารถกลายเป็นฟิล์มบางปกคลุมบนผนังเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เซลล์สูญเสียสมบัติการเลือกผ่านและไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร และขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ภายในเซลล์ จึงทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด และในกรณีของไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะสามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปยังภายในเซลล์ จากนั้นจึงไปรวมตัวกับ DNA แล้วยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA และการแปลรหัส RNA จึงรบกวนกระบวนการสร้างโปรตีนและเอนไซม์ของเซลล์จุลินทรีย์ได้ ด้วยสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ไคโตซานเป็นที่สนใจสำหรับนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งในปัจจุบันและอนาคต

การเพิ่มศักยภาพเพื่อให้สามารถนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย พร้อมทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วยนั้นสามารถทำได้โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ โดยสมบัติของอนุพันธ์ไคโตซานจะขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อาจละลายน้ำได้มากขึ้นหากเพิ่มหมู่ฟังก์ชั่นที่มีความชอบน้ำ หรืออาจมีสภาพประจุบวกเพิ่มขึ้นหากเพิ่มหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดโปรโตเนชันเข้าไปในโมเลกุล หรืออาจเพิ่มหมู่ฟังก์ชั่นที่สามารถเข้าจับกับผนังเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีขึ้น ซึ่งหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกันต่างส่งผลทำให้อนุพันธ์แต่ละชนิดมีสมบัติ ฤทธิ์ และกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันด้วย

นอกจากนี้ การเตรียมคอมพอสิตของไคโตซานและอนุภาคนาโนอนินทรีย์ ได้แก่ อนุภาคนาโนซิลเวอร์ อนุภาคนาโนซิงค์ออกไซด์ อนุภาคไทเทเนียมไดออกไซด์ และอนุภาคอะลูมิโนซิลิเกต เป็นต้น โดยไคโตซานมีบทบาทเป็นตัวทำกระจายของอนุภาคนาโนอนินทรีย์ดังกล่าว ซึ่งทั้งไคโตซานและอนุภาคนาโนอนินทรีย์ต่างก็ช่วยเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน และแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่โดดเด่นและมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ไคโตซานและอนุภาคนาโนเพียงอย่างเดียว

การใช้ไคโตซานร่วมกับสารตัวเติมอื่นซึ่งสามารถเสริมฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการเพิ่มศักยภาพเพื่อนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์ โดยพบการใช้ไคโตซานร่วมกับน้ำมันหอมระเหย โมเลกุลสบู่ รวมถึงการเตรียมสารเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานกับไอออนโลหะ ซึ่งต่างแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่โดดเด่นและมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียว

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ในการสนับสนุนงบประมาณการวิจัย (ตามสัญญารับทุนเลขที่ 1/2556 เพื่อทำโครงการวิจัยเรื่อง “การเตรียมและวิเคราะห์แผ่นฟิล์มบริโภคได้จากไคโตซานผสมน้ำมันหอมระเหยของไทย”)

เอกสารอ้างอิง

1. Agrawal, P., Strijkers, G.J., and Nicolay, K. 2010. Chitosan-based Systems for Molecular Imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 62(1): 42-58.
2. Berth, G., and Dautzenberg, H. 2002. The Degree of Acetylation of Chitosans and Its Effect on the Chain Conformation in Aqueous Solution. *Carbohydrate Polymers.* 47(1): 39-51.
3. Nosal, W. H., Thompson, D. W., Yan, L., Sarkar, S., Subramanian, A., and Woollam, J. A. 2005. UV-VIS-Infrared Optical and AFM Study of Spin-cast Chitosan Films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 43(3-4): 131-137.
4. Rabea, E.I., Badawy, M.E.I., Steurbaut, W., and Stevens, C.V. 2009. In Vitro Assessment of *N*-(benzyl) Chitosan Derivatives against Some Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. *European Polymer Journal.* 45(1): 237-245.
5. Kong, M., Chen, X., Xue, Y., Liu, C., Yu, L., Ji, Q., and Park, H. 2008. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Microshperes in a Solid Dispersing System. *Frontiers of Materials Science in China.* 2(2): 214-220.
6. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., and Park, H.J. 2010. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *International Journal of Food Microbiology.* 144(1): 51-63.
7. Feng, Q. L., Wu J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. 2000. A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Journal of Biomedical Materials Research.* 52(4): 662-668.
8. Zhong, Z., Aotegen, B., and Xu, H. 2011. The Influence of the Different Inductivity of Acetyl Phenyl-thiosemicarbazone-chitosan on Antimicrobial Activities. *International Journal of Biological Macromolecules.* 48(5): 713-719.
9. Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.J. 1999. Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science & Technology.* 10(2): 37-51.
10. Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., and Dutta, J. 2009. Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Applications. *Food Chemistry.* 114(4): 1173-1182.
11. Zheng, L.Y., and Zhu, J.F. 2003. Study on Antimicrobial Activity of Chitosan with Different Molecular Weights. *Carbohydrate Polymers.* 54(4): 527-530.

12. Gooday, G. W., Jeuniaux, C., and Muzzarelli, R. 1986. Chitin in Nature and Technology. New York: Plenum Press.
13. Liu, H., Du, Y., Wang, X. and Sun, L. 2004. Chitosan Kills Bacteria through Cell Membrane Damage. *International Journal of Food Microbiology.* 95(2): 147-155.
14. Mohamed, N. A., and. Abd El-Ghany, N. A. 2012. Preparation and Antimicrobial Activity of Some Carboxymethyl Chitosan Acyl Thiourea Derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2012. 50(5): 1280-1285.
15. Mohamed, R. R. and Sabaa, M. W. 2014. Synthesis and Characterization of Antimicrobial Crosslinked Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles Loaded with Silver. *International Journal of Biological Macromolecules.* 69(0): 95-99.
16. Aranaz, I., Harris, R., and Heras, A. 2010. Chitosan Amphiphilic Derivatives. *Chemistry and applications. Current Organic Chemistry.* 14(3): 308-330.
17. Fu, X., Shen, Y., Jiang, X., Huang, D., and Yan, Y. 2011. Chitosan Derivatives with Dual-antibacterial Functional Groups for Antimicrobial Finishing of Cotton Fabrics. *Carbohydrate Polymers.* 85(1): 221-227.
18. Jagadish, R. S., Divyashree, K. N., Viswanath, P., Srinivas, P., and Raj, B. 2012. Preparation of *N*-vanillyl Chitosan and 4-hydroxybenzyl Chitosan and their Physico-mechanical, Optical, Barrier, and Antimicrobial Properties. *Carbohydrate Polymers.* 87(1): 110-116.
19. Badawy, M. E. I., Rabea, E. I. and Taktak, N. E. M. 2014. Antimicrobial and Inhibitory Enzyme Activity of *N*-(benzyl) and Quaternary *N*-(benzyl) Chitosan Derivatives on Plant Pathogens. *Carbohydrate Polymers.* 111(0): 670-682.
20. Geisberger, G., Hinger, D., Käch, A., Maake, C., and Greta R. 2013. Chitosan-thioglycolic Acid as a Versatile Antimicrobial Agent. *Biomacromolecules.* 14(4): 1010-1017.
21. Hu, L., Meng, X., Xing, R., Liu, S., Chen, X., Qin, Y., Yu, H., and Li, P. 2015. Design, Synthesis and Antimicrobial Activity of 6-*N*-substituted Chitosan Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 26(18): 4549-4551.
22. Jia, R., Jiang, H., Jin, M., Wang, X. and Huang, J. 2015. Silver/Chitosan-based Janus Particles: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antimicrobial Activity In Vivo and Vitro. *Food Research International.* 78: 433-441.
23. Lin, S., Chen, L.; Huang, L., Cao, S., Luo, K., and Liu, K. 2015. Novel Antimicrobial Chitosan-Cellulose Composite Films Bioconjugated with Silver Nanoparticles. *Industrial Crops and Products.* 70: 395-403.
24. Banerjee, M., Mallick, S., Paul, A., Chattopadhyay, A., and Ghosh, S.S. 2010. Heightened Reactive Oxygen Species Generation in the Antimicrobial Activity of a Three Component Iodinated Chitosan-Silver Nanoparticle Composite. *Langmuir.* 26(8): 5901-5908.

25. Wang, Y., Zhang, Q., Zhang, C.l. and Li, P. 2012. Characterisation and Cooperative Antimicrobial Properties of Chitosan/Nano-ZnO Composite Nanofibrous Membranes. *Food Chemistry.* 132(1): 419-427.
26. Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M.F., and Fiévet, F. 2006. Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Letters.* 6(4): 866-870.
27. Xiao, G., Zhang, X., Zhang, W., Zhang, S., Su, H., and Tan, T. 2015. Visible-light-mediated Synergistic Photocatalytic Antimicrobial Effects and Mechanism of Ag-nanoparticles@Chitosan-TiO_2 Organic-inorganic Composites for Water Disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental.* 170-171: 255-262.
28. Liu, B., Wang, X., Pang, C., Luo, J., Luo, Y., and Sun, R. 2013. Preparation and Antimicrobial Property of Chitosan Oligosaccharide Derivative/Rectorite Nanocomposite. *Carbohydrate Polymers.* 92(2): 1078-1085.
29. Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A. and Ricke, S. C. 2015. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems-A Review. *Food Control.* 54: 111-119.
30. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., and Zhang, Q. 2014. Properties and Antimicrobial Activity of Silver Carp (Hypophthalmichthys molitrix) Skin Gelatin-chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil for Fish Preservation. *Food Packaging and Shelf Life.* 2(1): 7-16.
31. Burt, S., 2004. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods-A review. *International Journal of Food Microbiology.* 94(3): 223-253.
32. Rieger, K. A., and Schiffman, J. D. 2014. Electrospinning an Essential Oil: Cinnamaldehyde Enhances the Antimicrobial Efficacy of Chitosan/Poly(ethylene oxide) Nanofibers. *Carbohydrate Polymers.* 113: 561-568.
33. Liu, H., Du, Y., Wang, X., Hu, Y., and Kennedy, J. F. 2004a. Interaction between Chitosan and Alkyl-*d*-Glucopyranoside and Its Effect on Their Antimicrobial Activity. *Carbohydrate Polymers.* 56(2): 243-250.
34. Liu, H., Du, Y., Yang, J., and Zhu, H. 2004c. Structural Characterization and Antimicrobial Activity of Chitosan/Betaine Derivative Complex. *Carbohydrate Polymers.* 55(3): 291-297.
35. Higazy, A., Hashem, M., ElShafei, A., Shaker, N., and Hady, M. A. 2010. Development of Antimicrobial Jute Packaging Using Chitosan and Chitosan-Metal Complex. *Carbohydrate Polymers.* 79(4): 867-874.

ได้รับบทความวันที่ 21 กันยายน 2559
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 11 มกราคม 2560