Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 20, Issue 2, 2021

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

JARST Journal of Applied Research on Science and Technology
Rajamangala University of Technology Thanyaburi

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ผลิตโดยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู

Antioxidant Activity of Chitooligosaccharides Produced by Chitinase Extracted from two Weeks Seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr.

มานะ ขาวเมฆ

Mana Kaomek

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabaht University under the Royal Patronage, Khlong Luang, Pathum Thani 13180, THAILAND

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 9 August, 2021

Revised: 22 September, 2021

Accepted: 4 October, 2021

Available online: 00 October, 2021

DOI: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Keywords: chitinase, chitooligosaccharides, antioxidant activity, *Samanca saman* (Jacq) Merr.

ABSTRACT

This research was to study the antioxidant activity of chitooligosaccharides from two weeks seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. produced by chitinase with extraction of 0.1 molar acetate buffer at pH 3.5 was investigated in this work. It was found that chitooligosaccharides obtained from hydrolysis of 1 percent of colloidal chitin in 0.1 molar acetate buffer pH 3.5 using chitinase extracted from two weeks seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. at 0.5 hour digestion, chitooligosaccharides were produced from hydrolysis of 1 percent of colloidal chitin in 0.1 molar acetate buffer pH 3.5 utilizing chitinase isolated from two weeks seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. It comprises acetylglucosamine as well as $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$, and $(GlcNAc)_6$ of chitooligosaccharides. The small molecules of $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ and $(GlcNAc)_3$ increased with 1 hour, 2 hours and 4 hours of curing time, the small molecules of $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, and $(GlcNAc)_3$ increased, whereas the large molecules of $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ and $(GlcNAc)_6$ decreased. The large molecules of $(GlcNAc)_4$ changed to $(GlcNAc)_2$ + $(GlcNAc)_2$ and $(GlcNAc)_1$ + $(GlcNAc)_3$,

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

$(GlcNAc)_5$ changed to $(GlcNAc)_2$ + $(GlcNAc)_3$ and $(GlcNAc)_1$ + $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_6$ changed to $(GlcNAc)_3$ + $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_2$ + $(GlcNAc)_4$ and $(GlcNAc)_1$ and $(GlcNAc)_5$. Chitooligosaccharides obtained from the use of every curing time to digest which have antioxidant activity better than butylated hydroxyl toluene (BHT) standard. The EC_{50} of 0.5 hour, 1 hour, 2 hours and 4 hours incubation were 1.01±0.1, 1.07±0.1, 1.12±0.1 and 1.18±0.1 µg/mL, respectively, which less than the EC_{50} of BHT standard of 1.34±0.1 µg/mL. The large molecules of chitooligosaccharides from shorter curing time (0.5 hour) have more antioxidant activity than small molecules from longer curing time (1 hour, 2 hours and 4 hours).

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส และสกัดด้วย 0.1 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 3.5 พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากการย่อย 1 เปอร์เซ็นต์ ไคตินในรูปคอลลอยด์ ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 3.5 โดยการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีเอนอะซิติลกลูโคซามีน $(GlcNAc)_1$ และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-6 โมเลกุล ได้แก่ $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ แต่เมื่อเพิ่มเวลาบ่มเป็น 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ ลดต่ำลง เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$ จะเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ จำนวน 2 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_3$ อย่างละ 1 โมเลกุล ส่วน $(GlcNAc)_5$ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ กับ $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_4$ อย่างละ 1 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_6$ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_3$ กับ $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_2$ กับ $(GlcNAc)_4$ และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_5$ อย่างละ 1 โมเลกุล เป็นต้น เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาย่อยทุกช่วงเวลา ดังกล่าวข้างต้นจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT) โดยมีค่า EC_{50} ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในช่วงการบ่มที่ 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงเท่ากับ 1.01±0.1, 1.07±0.1, 1.12±0.1 และ 1.18±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า EC_{50} จากสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ 1.34 ±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จากการใช้ระยะเวลาบ่มน้อยลง (0.5 ชั่วโมง) จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้กว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจากการใช้ระยะเวลาบ่มมากกว่า (1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง)

คำสำคัญ: ไคติเนส ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้นอ่อนก้ามปู

บทนำ

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคตินด้วยน้ำ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) ได้ผลผลิตเป็นเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโอแซคคาไรด์ที่มีขนาด 2-6 โมเลกุล ได้แก่ ไคโตไบโอส ($(GlcNAc)_2$)

Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 20, Issue 2, 2021
ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ไคโตไตรโอส ($(GlcNAc)_3$) ไคโตเตโตรส ($(GlcNAc)_4$) ไคโตเพนโตส ($(GlcNAc)_5$) และไคโตเฮกโซส ($(GlcNAc)_6$) เป็นต้น เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา และพืช มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะด้านอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ควบคุมโรคพืช ที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และแมลง (1) ขนาดของเอนไซม์ไคติเนสจากพืชมีขนาดอยู่ในช่วง 25-40 กิโลดาลตัน (2)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยมอนอแซคคาไรด์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีนหรือกลูโคซามีนตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก ที่เกิดจากการย่อยสลายไคตินหรือไคโตซานด้วยปฏิกิริยาเคมีของกรดหรือการเร่งปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำของเอนไซม์ในกลุ่มไคติโนไลติก (ไคติเนสและไคโตซาเนส) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์นำมาใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา (3,4) สารต้านโรคไขข้ออักเสบ สารลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด สารควบคุมการปล่อยตัวยาสำคัญ (5) นอกจากนี้ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคซานด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 ข้าวฟ่างเคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มสั้น (0.5 ชั่วโมง) จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcN)_4$, $(GlcN)_5$ และ $(GlcN)_6$ มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcN)_1$, $(GlcN)_2$ และ $(GlcN)_3$ จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลเลเตดไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT) เมื่อเปรียบเทียบด้วยค่า EC_{50} (6) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำได้ดีกว่าไคตินและไคโตซาน จึงทำให้มีประสิทธิภาพการดูดซึมได้ดีกว่า ดังนั้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีมูลค่าสูงกว่าไคตินและไคโตซานมาก ไคตินและไคโตซานถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย เนื่องจากอยู่ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้น การเปลี่ยนไคตินและไคโตซานที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ให้เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสหรือเอนไซม์ไคโตซาเนสจึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งพบว่าพืชหลายชนิดมีเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดและมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจึงเปลี่ยนไคตินหรือไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีกว่า จุลินทรีย์ และจากผลการวิจัยของพุธิตา ภูมิคอนสาร และมานะ ขาวเมฆ (7) เกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ เมื่อบ่มที่ 0.5 ชั่วโมง จะมีขนาดโมเลกุลเป็น $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ และงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (8) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Bipolaris oryzae, Curvularia lunata, Magnaporthe oryzae และ Setosphaeria oryzae* ด้วยความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของมูนและคณะ (9) สกัดเอนไซม์ไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 เมื่อใช้ระยะเวลาในการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์น้อยลง ส่งผลทำให้ได้ปริมาณของไคโตเฮกโซสเพิ่มมากขึ้น รองลงมาเป็นไคโตเพนโตสและไคโตเตโตรส ตามลำดับ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ จะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีและได้ผลิตผลเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ (8) มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูด้วยวิธีของบอลเลอร์และคณะ (10)

ชั่งต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ที่ปลูกในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นร้อยละ 80 หนัก 20 กรัม ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อบดด้วยโกร่งให้ละเอียด เติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น พีเอช 3.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรของพอลิไวนิลพอลิไพโรลิ

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

โดนผสมอยู่ หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 25,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายของสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสด้วยวิธีของบอลเลอร์และคณะ (10)

ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส 200 ไมโครลิตร (3.85 ยูนิต/มิลลิกรัม) ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ ไคตินในรูปคอลลอยด์ (11) ที่เตรียมจากเกล็ดไคติน (บริษัทซิกมา) ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น พีเอช 3.5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของผสมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตสารละลายใส 500 ไมโครลิตร เติม 0.8 โมลาร์ โซเดียมเตตระบอเรต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำของผสมไปต้มให้เดือด 3 นาที เติมสารละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีน

การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของเลาว์รีและคณะ (12)

ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส 10 ไมโครลิตร (0.1926 ยูนิต/มิลลิกรัม) ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโฟลินที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร/ปริมาตร ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

การเตรียมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีของมิลเลอร์ (13)

ปิเปต 1 เปอร์เซ็นต์ ไคตินในรูปคอลลอยด์ ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร เติมสารสกัดเอนไซม์ไคติเนสปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร (5.78 ยูนิต/มิลลิกรัม) บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้น นำไปต้มให้เดือด แล้วนำของผสมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายใสของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

การศึกษารูปแบบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีของเพานิบและไลซ์คีวิกซ (14)

1. สปอร์ตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มในระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง บนแผ่น TLC

2. นำแผ่น TLC ใส่ในแท้งก์ที่มีตัวทำละลายผสมของโพรพานอล : น้ำ : แอมโมเนีย เท่ากับ 70 : 30 : 1 รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ระยะทาง 10 เซนติเมตร ทำให้แห้ง

3. สเปรย์กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่น TLC นำไปวางบนเตาให้ความร้อน 3 นาที วัดระยะทางสารที่ปรากฏและหาค่า R_f เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

การหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีของโคกะและคณะ (15)

1. เตรียมสารมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-6 หน่วย เข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้สารเคลื่อนที่เป็น น้ำ : เมทานอล เท่ากับ 60 : 40 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ผ่านคอลัมน์ชนิด Shodex Asahipak NH2P-50 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำพื้นที่ใต้กราฟและค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

2. นำสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละ

Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 20, Issue 2, 2021
ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2 ไดเฟนิล-1-พิไคลดราซิล (16)

1. เตรียมสารละลายแรดิคัล DPPH ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ ในแอบโซลูทเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของบิวทิเลเตดไฮดรอกซิโทลูอีน (Butylated Hydroxytoluene; BHT) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ในเอทานอล หลังจากนั้น ปิเปตสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานของบิวทิเลเตดไฮดรอกซิโทลูอีน ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งกับค่า log ความเข้มข้นของ BHT และหาค่าการต้านอนุมูลอิสระและ EC_{50}

3. เตรียมสารตัวอย่างเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ปิเปตสารตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติม DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BHT คำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระและค่า EC_{50} การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging Activity) ได้ร้อยละ 50 โดยใช้สูตร

$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = \frac{[(A-B)-(C-D)]}{[(A-B)} \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH
B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม (Control)
C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
D = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่เติม DPPH

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

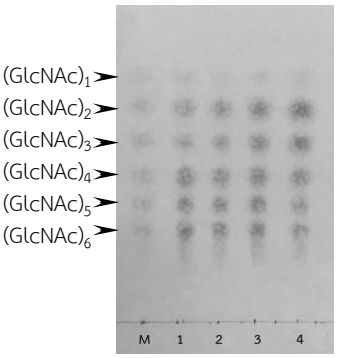
การศึกษาค่ากิจกรรมของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ พบว่าค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 19.2687 ยูนิต/มิลลิลิตร 0.9730 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ

การศึกษารูปแบบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีขนาดตั้งแต่ 16 โมเลกุล เมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มน้อยลง (0.5 ชั่วโมง) จะได้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ มีจุดเข้มกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ แสดงว่า มีปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก แต่เมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ จะน้อยลง ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ จะเพิ่มขึ้น ดังนั้น แสดงว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$ จะเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ จำนวน 2 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_3$ อย่างละ 1 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_5$ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ กับ $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_4$ อย่างละ 1 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_6$ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_3$ จำนวน 2 โมเลกุล และ $(GlcNAc)_2$ กับ $(GlcNAc)_4$ และ $(GlcNAc)_1$ กับ $(GlcNAc)_5$ อย่างละ 1 โมเลกุล (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ พบว่า เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK- 1 และนำไปย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ที่ระยะเวลามากขึ้น

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ส่งผลทำปริมาณของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ ลดลงในขณะที่ปริมาณ$(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ$(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น (9)



รูปที่ 1 รูปแบบของไคโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มไคตินที่อยู่ในรูปคอลลอยด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู M: สารมาตรฐานไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 โมเลกุล 1: ระยะเวลาในการบ่ม 0.5 ชั่วโมง 2: ระยะเวลาในการบ่ม 1 ชั่วโมง 3: ระยะเวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง 4: ระยะเวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง

การหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อย 1 เปอร์เซ็นต์ ไคตินในรูปคอลลอยด์ ด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดตั้งแต่ 2 – 6 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ เท่ากับร้อยละ 3.41-5.54, 18.19-38.87, 8.23-20.46, 17.87-22.64, 9.84-20.17 และ 9.34-25.64 ตามลำดับ โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ จะมีปริมาณร้อยละลดลงเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น คือ $(GlcNAc)_4$ ที่ถูกบ่มด้วยระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีปริมาณร้อยละเท่ากับ 22.64, 21.74, 20.15 และ 17.87 ตามลำดับ $(GlcNAc)_5$ ที่ถูกบ่มด้วยระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีปริมาณร้อยละเท่ากับ 20.17, 17.42, 14.58 และ 9.84.87 ตามลำดับ และ $(GlcNAc)_6$ ที่ถูกบ่มด้วยระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีปริมาณร้อยละเท่ากับ 25.64, 18.63, 13.12 และ 9.34 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อยลง (0.5 ชั่วโมง) ส่งผลทำให้มีปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ เช่น $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ สูงกว่าการใช้ระยะเวลาในการบ่มสูงขึ้น และปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็ก เช่น $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มสูงขึ้น เมื่อใช้เวลาในการบ่มสูงขึ้น (1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ พบว่า เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 และนำไปย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ที่ระยะเวลาน้อยลง ส่งผลทำให้ได้ปริมาณของไคโตเฮกโซสมากที่สุด รองมาเป็นไคโตเพนโตส และไคโตเตโตรส ตามลำดับ (9)

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคตินในรูปคอลลอยด์ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BHT ที่มีค่า EC_{50} = 1.34±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากบ่มด้วยระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 25.29±0.1 – 88.03±0.1, 24.22±0.1 - 84.67±0.1, 21.69±0.1 – 81.97±0.1 และ 15.41±0.1 – 80.03±0.1 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.01±0.1, 1.07±0.1, 1.12±0.1 และ 1.18±0.1 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 เมื่อวิเคราะห์ค่า

Journal of Applied Research on Science and Technology (JARST), Vol 20, Issue 2, 2021
ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

EC_{50} ที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกันด้วย One Way ANOVA พบว่า มีค่าความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0 .05 เนื่องจากค่า EC_{50} ของแต่ละระยะเวลาการบ่มใกล้เคียงกันมาก ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มทุกช่วงเวลามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มด้วยระยะเวลา 0.5 ชั่วโมง จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้ระยะเวลาในการบ่มที่น้อยกว่า (0.5 ชั่วโมง) จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$และ $(GlcNAc)_6$ มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ ในขณะที่ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากใช้ระยะเวลาในการบ่มที่มากกว่า (1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง) จะมีโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ มากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$และ $(GlcNAc)_6$ ดังนั้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้กว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสจากพืชชนิดอื่น ๆ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการย่อยโดยใช้เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากกระถินบ้าน (EC_{50} เท่ากับ 1.21±0.1) และข้าว กข. 6 (EC_{50} เท่ากับ 1.37±0.1) (17,18) เนื่องจาก ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูที่ใช้ระยะเวลาบ่มน้อย (0.5 ชั่วโมง) มีปริมาณร้อยละของโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$ เท่ากับ 22.64, $(GlcNAc)_5$ เท่ากับ 20.17 และ $(GlcNAc)_6$ เท่ากับ 25.64 ซึ่งมากกว่า ปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่มี $(GlcNAc)_4$ เท่ากับ 20.02, $(GlcNAc)_5$ เท่ากับ 15.03 และ $(GlcNAc)_6$ เท่ากับ 9.98 และข้าว กข. 6 ที่มี $(GlcNAc)_4$ เท่ากับ 14.92, $(GlcNAc)_5$เท่ากับ 9.54 และ $(GlcNAc)_6$ เท่ากับ 7.92 ดังนั้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใหญ่ (ใช้ระยะเวลาในการบ่มเป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง) จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเท่ากับ 88.03±0.1 มากกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็ก (ใช้ระยะเวลาในการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง) จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเท่ากับ 84.67±0.1, 81.97±0.1 และ 80.03±0.1 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย BHT

ความเข้มข้น BHT (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**การต้านอนุมูลอิสระ (%)**	**EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)**
2.5	4.37±0.1	1.34±0.1
5	13.84±0.1	
10	29.90±0.1	
20	48.75±0.1	
40	65.83±0.1	
80	77.47±0.1	

ISSN: 2773-9376 (Print), 2773-9473 (Online)

ตารางที่ 2 การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู ด้วยวิธี DPPH

เวลาที่ใช้ในการบ่ม	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	% การต้านอนุมูลอิสระ	EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0.5 ชั่วโมง	2.5	25.29±0.1	1.01±0.1
	5.0	35.55±0.1	
	10	50.01±0.1	
	20	61.62±0.1	
	40	74.78±0.1	
	80	88.03±0.1	
1 ชั่วโมง	2.5	24.22±0.1	1.07±0.1
	5.0	34.03±0.1	
	10	46.78±0.1	
	20	59.78±0.1	
	40	71.03±0.1	
	80	84.67±0.1	
2 ชั่วโมง	2.5	21.69±0.1	1.12±0.1
	5.0	31.48±0.1	
	10	43.39±0.1	
	20	58.97±0.1	
	40	70.47±0.1	
	80	81.97±0.1	
4 ชั่วโมง	2.5	15.41±0.1	1.18±0.1
	5.0	28.63±0.1	
	10	42.32±0.1	
	20	56.16±0.1	
	40	69.48±0.1	
	80	80.03±0.1	

สรุปผล

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด $(GlcNAc)_1$ -$(GlcNAc)_6$ เมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มน้อยคือ 0.5 ชั่วโมง จะมีปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของไคโตเฮกโซส ไคโตเพนโตส และไคโตเตโตรส มากกว่าการใช้เวลาในการบ่มมากขึ้นเป็น 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง และปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ระยะเวลาบ่มเพิ่มเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ขณะที่ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ

$(GlcNAc)_6$ ลดลง โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของ $(GlcNAc)_4$ เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ + $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_5$ เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ +$(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_6$) เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_3$ + $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_4$ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาย่อยทุกช่วงเวลา จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT) โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งใช้เวลาบ่มน้อยจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้กว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้เวลาบ่มมาก

เอกสารอ้างอิง

1. Chernin LS, Fuente LD, Sobolev LV, Haran S, Vorgias CE, Oppenheim AB, et al. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter Agglomerans*. Appl Environ Microb. 1997;63(3):834–9.
2. Malik A. Purification and properties of plant chitinases: A review. J Food Biochem. 2019;43(3):1-11.
3. Baureithel K., Felix G, Boller T. 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. J Biol Chem. 1994;269(27):17931-8.
4. Shibuya N, Kaku H, Kuchitsu K, Maliarik MJ. Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane fraction from suspension-cultured rice cells. FEBS. 1993;329:75–8.
5. Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Gois JR, et al. Drug delivery system: advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. EPMA Journal. 2010;1(1):164-209.
6. Kaomek M. Antioxidant activity by chitooligosaccharides of chitosanase from *Samanca saman* (Jacq) Merr, *Leucaena leucocephla* de Wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630. VRU Research and Development Journal Science and Technology. 2019;14(3):62-71.
7. Phumkhonsan P, Kaomek M. Assessment of charats and activities of chitinase from Samanca saman (JACQ). Sri-ayutthaya cluster 9th Rajabhat university national conference; 18 Oct 8; Valaya Alongkorn Rajabhat University; 2018.
8. Kaomek M. Antifungal acitivity of chitoloigosaccharides from *Samanca saman* (JACQ) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 produced by chitinase. VRU Research and Development Journal Science and Technology. 2020;15(2):119-30.
9. Moon C, Seo D, Song Y, Hong S, Choi S, Jung W. Antifugal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. Microb Pathogenesis. 2017;113:218-24.
10. Boller T, Gehri A, Mauch F, Vogeli U. Chitinase in bean leaves: induction by

ethylene, purification, properties and possible function. Planta. 1983;157:22-31.

11. Berger LR, Reynold DM. The chitinase system of a strain of griseus. Biochimi Biophys Acta. 1958;29(3):522–34.
12. Lowry OH, Rosebrougly NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:256-7.
13. Miller GC. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Etermination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. 1959;31:426-8.
14. Pownibg RF, Lrzykiewicy H. Separation of Chitin Oligosaccharide by Thin Layer Chromatography. J Chromatogr. 1967;27:115-9.
15. Koga D, Yoshioka T, Arakane Y. HPLC analysis of anomeric formation and cleavage pattern by chitinolytic enzyme. Biosci Biotech Bioch. 1998;62(8):1643-6.
16. Brand WW, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technol. 1995;28(1):25-30.
17. Testhong W, Kaomek M. Antioxidant activity of chitooligosaccharides produced by chitinase from *Leucaena leucocephala* de wit. Journal of Research and Innovation in Science and Technology. 2021;2(2):16-27.
18. Phomniles B, Kaomek M. Patterns and antioxidant activity of chitooligosaccharides produced by chitinase from *Oryza sativa* RD.6. The 8th Acdemic Science and Technology Conference 2021; 21 Mar 26; Valaya Alongkorn Rajabhat University; 2021.