

การปรับปรุงเกลบกุ้งด้วยวิธีทางเคมีเพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกส์ ในอาหารสัตว์

Improvement of shrimp meal with chemical as prebiotics in animal feed

พรพรรณ แสนภูมิ^{1*}, สุภาวดี จิมทอง¹ และ ยูพา สีสาวแห¹

Pornpan Saenphoom^{1*}, Suphavadee Chimtong¹ and Yupha Seesawhea¹

บทคัดย่อ: จากการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงเกลบกุ้งด้วยวิธีทางเคมีเพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกส์ในอาหารสัตว์โดยวางแผนการทดลองแบบ t-test แบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% (กลุ่มการทดลองที่ 1) และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 80% (กลุ่มการทดลองที่ 2) โดยการตกตะกอนลำดับส่วน (Fractionation) จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจสอบโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) จากการศึกษาพบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่แตกต่างกันโดยที่กลุ่มการทดลองที่ 1 สามารถเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ช้ากว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นว่า กลุ่มการทดลองที่ 1 ได้ COS ที่มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในความเป็นพรีไบโอติกส์ พบว่า กลุ่มการทดลองที่ 1 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.10% ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์

คำสำคัญ: เกลบกุ้ง, ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์, พรีไบโอติกส์

ABSTRACT: The objective of this study was to improve shrimp meal with chemical method as prebiotics in animal feed. This study was assigned into t-test. The study was consisted of 2 treatments such as chito-oligosaccharides were precipitated with 70% ethanol (Treatment 1) and 80% ethanol (Treatment 2) by precipitation fractionation. After that, treatments were tested oligosaccharides with Thin layer chromatography (TLC) method. Result found that sample band of treatment 1 moved slower than treatment 2 on TLC because of higher molecular weight. For prebiotics test, 0.1% of COS in treatment 1 increased growth of *Lactobacillus acidophilus* and inhibited growth of *Escherichia coli*. Therefore, it concluded that chito-oligosaccharides were precipitated with 70% ethanol, which can be used as prebiotics in animal feed.

Keywords: Shrimp meal, Chitooligosaccharides, Prebiotics

¹ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

Faculty of Animal Science and Agricultural Technology, Silpakorn University Phetchaburi IT Campus

* Corresponding author: SAENPHOOM_P@silpakorn.edu, saenphoompp@hotmail.com

บทนำ

แกลบกุ้ง หรือ เปลือกกุ้ง เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการส่งออกกุ้งแช่แข็งหรือจากการแปรรูปต่างๆ โดยพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจะอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลภาคใต้เป็นหลัก และกระจายอยู่ในจังหวัดที่มีพื้นที่ติดทะเล เช่น จันทบุรี ตราด ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี เป็นต้น (กรมประมง, 2553) แกลบกุ้งจะประกอบไปด้วยเปลือกกุ้งส่วนหัว และบางส่วนที่ติดเปลือก ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารสัตว์โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ โดยนำไปบดทำเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ และในแกลบกุ้งยังสามารถใช้ในการเพิ่มสารสีในเนื้อได้เนื่องจากในแกลบกุ้งมีสารสี Astaxanthin อยู่สูง (จรณ์, 2552) นอกจากนี้แกลบกุ้งยังมีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เรียกว่า ไคติน เป็นส่วนประกอบค่อนข้างสูง พบว่าในส่วนของเปลือกส่วนหัวกุ้งมีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่สูงที่สุดประมาณ 34.9% เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ องค์ประกอบทางโภชนาของแกลบกุ้งมีความผันแปรค่อนข้างมาก แกลบกุ้งมีโปรตีน ประมาณ 22.80-56.95%, ไขมันประมาณ 0.95-9.80%, เถ้าประมาณ 15.64-56.00 %, เยื่อใยประมาณ 1.18-29.75% และแคลเซียมประมาณ 0.75-16.69% โดยพบว่าแกลบกุ้งมีไคตินประมาณ 9.82-30.44% จะพบว่าองค์ประกอบทางโภชนาของแกลบกุ้งจะแตกต่างกันโดยพบว่าขึ้นอยู่กับปัจจัย ได้แก่ แหล่งที่มา สายพันธุ์กุ้ง และวิธีการแปรรูป (จรณ์, 2552)

ไคติน (Chitin) เป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(1-4) เป็นโพลิเมอร์สายยาวที่ประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อยคือ N-acetyl-D-glucosamine มาเรียงต่อกัน (ปิยะบุตร, 2545) ไคตินมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่ง N-acetylglucosamine ในไคตินสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณลำไส้ใหญ่ได้ แหล่งสำคัญที่สามารถพบไคตินได้ คือ ในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปู กุ้ง และแกนปลาหมึก (จรณ์, 2552) หากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ

ไคตินที่สกัดได้โดยวิธีทางเคมี เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และทางชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ จะได้สารใหม่ที่เรียกว่า ไคโตซาน (วัตมณี, 2540) ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีกว่า สำหรับไคโตซาน (Chitosan) เป็นอนุพันธ์ของไคตินเป็นโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ที่ประกอบด้วย β -1, 4-n-acetyl-D-glucosamine ซึ่งไคโตซานมีคุณสมบัติที่ไม่สามารถละลายน้ำได้แต่ละลายได้ในกรดอินทรีย์อ่อนๆ เช่น กรดอะซิติก, ฟอริก และกรดซิตริก ไคโตซานซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์, ต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อรา (de Assis et al., 2010) ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* และ *Salmonella weltevreden* (สิริรัตน์ และคณะ, 2546) และจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสัตว์สามารถย่อยไคโตซานได้เป็นสาร Glucosamine และ Oligomer ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (จรณ์, 2552) การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ เช่น เพิ่มจำนวนจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* spp.) ในลำไส้ (Li et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทาน และสามารถใช้เป็นพรีไบโอติกส์ในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณภาพในการผลิตทั้งในสุกรและไก่ได้ (Park et al., 2004)

ดังนั้นจุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อปรับปรุงแกลบกุ้งด้วยวิธีทางเคมีเพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกส์ในอาหารสัตว์ตลอดจนเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษเหลือทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วิธีการศึกษา

1. วิธีการทดลอง

1.1 การเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ

สุ่มเก็บตัวอย่างแกลบกุ้งจากตลาดชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยนำตัวอย่างเปลือกกุ้งจำนวน 4 ตัวอย่างไปอบที่ 60 °C นาน 8-12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดละเอียดแล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 420 ไมครอนเพื่อเตรียมตัวอย่างให้มีความสม่ำเสมอก่อนเข้ากระบวนการ

เตรียมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ แล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. กลุ่มการทดลองและการวางแผนการทดลอง

นำตัวอย่างแกลบกุ้งมาตกตะกอนด้วยเอทานอลด้วยการตกตะกอนลำดับส่วน (Fractionation) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 คือ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของแกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70%

กลุ่มการทดลองที่ 2 คือ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของแกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 80%

3. การเตรียมไคตินและไคโตซาน

นำตัวอย่างแกลบกุ้งมาทำจัดแร่ธาตุโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 2M ในอัตราส่วน 1:10 g/ml คนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด กำจัดโปรตีนโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2M ในอัตราส่วน 1:20 g/ml คนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 °C จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด จากนั้นกำจัดสีโดยการใช้อีทานอล 95% กรองผ่านกระดาษกรองจนกว่าจะเห็นเป็นสีออกขาว ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบจนแห้งแล้วจะได้ไคติน จากนั้นนำไคตินที่ได้มาทำจัดหมู่อะซิติล ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50% (w/v) โดยใช้อัตราส่วน 1:20 g/ml คนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 140 °C กรองด้วยกระดาษกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด นำไปอบจนแห้งแล้วจะได้ไคโตซาน (ดัดแปลงมาจาก ณัฐพล และ จินต์จุฑา, 2557)

4. การเตรียมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Chitooligosaccharides, COS)

นำไคโตซานที่ได้มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 37 % เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 75 °C คนตลอดเวลา จากนั้นทำการตกตะกอนด้วยเอทานอล โดยทำการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยเอทานอลที่ 70% และ 80% ทำการแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000

รอบ 10 นาที เพื่อแยกตะกอน (ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์) ออกมา จากนั้นนำไปทำให้แห้งและนำมาวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) (Cabrera and Cutsem, 2005)

5. การศึกษาความเป็นพรีไบโอติกส์

ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* และ *Escherichia coli* โดยทำการเลี้ยง *L. acidophilus* ในอาหาร TSB (Tryptic Soy Broth) และเลี้ยง *E. coli* ในอาหาร NB (Nutrient Broth) โดยทำการเติม COS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.01, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1 % w/v จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วทำการวัดการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* ที่เวลา 18 ชั่วโมง และ *E. coli* ที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจากทั้งสองการทดลองมาวิเคราะห์ โดยใช้การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่ม (T-test for independent samples) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (มนต์ชัย, 2544)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides)

การวิเคราะห์ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธี TLC ของแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า มีรูปแบบการเคลื่อนที่แตกต่างกัน โดยที่กลุ่มการทดลองที่ 1 สามารถเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ช้ากว่า กลุ่มการทดลองที่ 2 (Figure 1) อย่างไรก็ตาม เพอร์เซ็นต์เอทานอลต่ำจะช่วยตกตะกอน COS ที่มีขนาดใหญ่ลงมาก่อน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% จึงมี COS ที่มีขนาดใหญ่ ในขณะที่ COS ที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 80% จะมี COS ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจทำให้ได้ COS ที่มีความแตกต่างในการทดลองครั้งนี้ ในการสกัด COS จากไคตินและ

ไคโตซานในเปลือกหรือแกลบกุ้งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางชีวภาพ (เชื้อจุลินทรีย์หรือเอนไซม์) และทางเคมี (ไฮเดรียมไฮดรอกไซด์) เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สมาพร และทานตะวัน (ม.ป.ป.) พบว่า COS จากเปลือกกุ้งที่สกัดโดยใช้เอนไซม์เพคตินเนส (Pectinase) จะมีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า COS จากเปลือกกุ้งที่สกัดโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase)

2. ศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกส์ (Prebiotics)

สำหรับการทดสอบความเป็นพรีไบโอติกส์โดยนำไปเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* และ *E. coli* ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ COS ระดับความเข้มข้น 0, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1% เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ (กลุ่มควบคุม) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ของกลุ่มการทดลองที่ 1 สูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.75 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 2) ในขณะที่การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ของกลุ่มการทดลองที่ 1 สูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.50 และ 0.75 % แต่ในทางตรงกันข้าม การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ของกลุ่มการทดลองที่ 2 สูงกว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.10 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 3) เนื่องจากผลผลิตที่ได้จากการ

ย่อยในกลุ่มการทดลองที่ 1 และ 2 สามารถที่จะส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ การเพิ่มความเข้มข้นของ COS อาจเป็นการเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.10 % ซึ่งขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของ COS จะมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ โดย COS ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000 Daltons ขึ้นไปจะสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น (Jeon et al., 2001; Park et al., 2004; Kim and Rajapakse, 2005) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ COS ของแกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70 % จะมีขนาดใหญ่หรือน้ำหนักโมเลกุลใหญ่และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้มากกว่า COS ของแกลบกุ้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 80 % นอกจากนี้ COS จากเปลือกกุ้งสามารถเพิ่มปริมาณ IgG และลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) ในซีรัม ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Kumar et al., 2017) จากการศึกษาของ Harti et al. (2015) รายงานว่า COS สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นโปรไบโอติกส์ (Probiotics) ซึ่งสอดคล้องกับ Liu et al. (2008) พบว่า การเสริม COS ที่ระดับ 100 และ 200 mg/kg สามารถเพิ่มปริมาณ *Lactobacillus* spp. และลดปริมาณ *E. coli* ในสุกรที่อายุ 14 และ 21 วัน

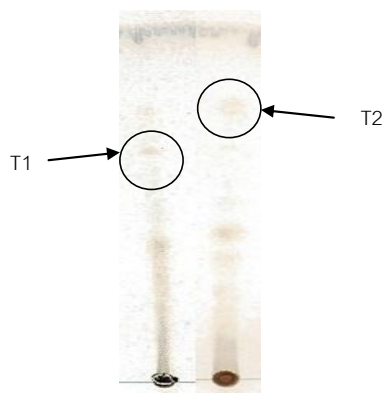


Figure 1 Oligosaccharide using Thin layer chromatography method

T1 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 70% ethanol, T2 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 80% ethanol

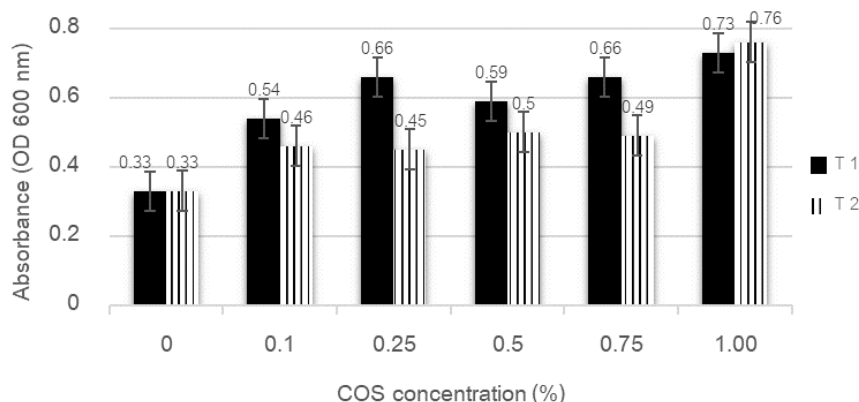


Figure 2 Growth of *L. acidophilus*

T1 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 70% ethanol, T2 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 80% ethanol

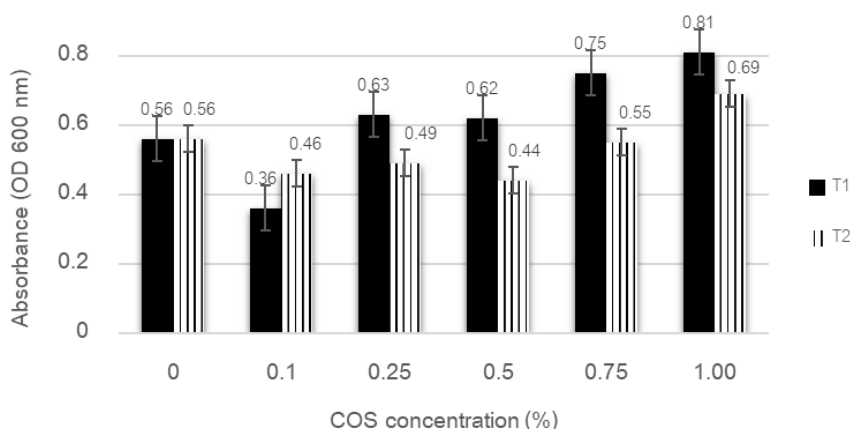


Figure 3 Growth of *E. coli*

T1 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 70% ethanol, T2 = Chito-oligosaccharides were precipitated with 80% ethanol

สรุป

จากการศึกษาการปรับปรุงเกลบกั้งไคโตซานด้วยวิธีทางเคมี พบว่า COS ของเกลบกั้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70 % สามารถเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ช้ากว่า เนื่องจากมี COS มีขนาดใหญ่ และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพรีไบโอติกส์ พบว่า COS ของเกลบกั้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% สามารถส่งเสริม

การเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* ได้สูงกว่า COS ของเกลบกั้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 80% ที่ COS ระดับความเข้มข้น 0.10 % ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของเกลบกั้งที่ตกตะกอนด้วยเอทานอล 70% มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากรที่สนับสนุนในการทำการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2553. กลุ่มวิเคราะห์สถิติการประมง. แหล่งที่มา: <https://goo.gl/dhhd8M>. ค้นเมื่อ 16 กันยายน 2557.
- จรณี จิตสังข์พงศ์. 2552. ผลของเปลือกกุ้งปนต่อสมรรถนะการผลิต การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์และการตอบสนองภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ณัฐพล พุ่มทอง และ จินต์จุฑา รัตนรังสรรค์. 2557. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการยืดอายุผลไม้ไม่มีเปลือก. โครงการงานวิทยาศาสตร์ จัดโดย สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. การขึ้นรูปเม็ดบีดโคโตซานและทดสอบการดูดซับสารละลายเหล็ก. เทคโนโลยีอินทรีย์. 1(1): 51-56.
- มนต์ชัย ดวงจินดา. 2544. การใช้โปรแกรม SAS เพื่อวิเคราะห์งานวิจัยทางสถิติ. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์คลังนันทวิทยา. 324 หน้า.
- รัตณี หาญวนิชศักดิ์. 2540. การออกแบบเบื้องต้นสำหรับกระบวนการผลิตโคตินและสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากเศษกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมพร บุญวิเศษ และ ทานตะวัน พิทักษ์. ม.ป.ป. การผลิตโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า (เซลลูเลสและเพคติเนส) และผลการต้านเชื้อจุลินทรีย์. รายงานการประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์. 8 หน้า.
- สิริรัตน์ จงฤทธิ์พร, อธิยา กังสุวรรณ และสุติป कुमार รักชิต. 2546. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยโคโตซาน. การสัมมนาวิชาการประมง. กรมประมง. 122 หน้า.
- Cabrera, J. C., and P. V. Cutsem. 2005. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. Chem. Eng. J. 25: 165-172.
- de Assis, C. F., N. K. Araujo, M. G. B. Pagnoncelli, M. R. da Silva Pedrini, G. R. de Macedo, and E. S. dos Santos. 2010. Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*. Bioprocess Biosyst. 33(7): 893-899.
- Harti, A. S., D. S. Haryati, S. Sunarto, W. Setyaningsih, and S. Yatmihatun. 2015. The potential chito-oligosaccharide (COS) as natural prebiotic and preservatives on symbiotic tofu in Indonesia. International Journal of Pharma Medicine and Biological Science. 4(3): 204-208.
- Jeon, Y.J., P.J. Park, and S.K. Kim. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers. 44: 71-76.
- Kim, S.K., and N. Rajapakse. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. 62: 357-368.
- Kumar, M. Y., J. V. Ramana, A. Ravi, J. Suresh, and A. V. N. Sivakumar. 2017. Effect of supplementation of shrimp waste on the immune response, haematological characters and lipid profile in crossbred weans piglets. International Journal of Science Environment and Technology. 6(4): 2329-2334.
- Li X. J., X. S. Piao, S. W. Kim, P. Liu, L. Wang, Y. B. Shen, S. C. Jung, and H. S. Lee. 2007. Effects of chitooligosaccharide supplementation on performance, nutrient digestibility, and serum composition in broiler chickens. Poult. Sci. 86: 1107-1114.
- Liu P., X. S. Piao, S. W. Kim, L. Wang, Y. B. Shen, H. S. Lee, and S. Y. Li. 2008. Effect of Chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology and fecal shedding *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. J. Anim. Sci. 86: 2609-2618.
- Park M., E. C. Penick, J. G. Edwards, J. A. Kauer, and M. D. Ehlers. 2004. Recycling Endosomes Supply AMPA Receptors for LTP. Sci. 305: 1972-1975.