

ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานด้วยความร้อนและผลในการต้านเชื้อ *Vibrio Cholerae*



นางสาวกรกต ศุภนคร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF HEAT TREATMENT ON MOLECULAR WEIGHT OF CHITOSAN AND ITS
INHIBITION OF *VIBRIO CHOLERAE*

Miss Goragot Supanakorn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานด้วยความร้อน และผลในการต้านเชื้อ <i>Vibrio Cholerae</i>
โดย	นางสาวกรกต ศุภนคร
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โศรดา กนกพานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศราวุธ ริมดูลี)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.จิรัญ กิ่งแก้ว)

5570108521 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: CHITOSAN, AUTOCLAVE, VIBRIO CHOLERAEE

GORAGOT SUPANAKORN: EFFECT OF HEAT TREATMENT ON MOLECULAR WEIGHT OF CHITOSAN AND ITS INHIBITION OF *VIBRIO CHOLERAEE*. ADVISOR: ASST. PROF. SORADA KANOKPANONT, Ph.D., pp.

This research studied the effect of heat treatment on molecular weight of chitosan, and their inhibitory effects on bacteria *Vibrio cholerae in vitro* and in peeled frozen shrimps. The chitosan solutions at M_w of 1.18×10^6 (A0) and 3.25×10^5 (B0) dalton, concentration at with 1.0 % (w/w) were prepared in 0.2 M acetic acid at pH 2.0 and were heated at 121, °C 0.1 MPa, for 15 minutes at 1, 2, 4, and 6 heating cycles. The pHs of obtained solutions were adjusted to 6.5 and 7.0 using with sodium hydroxide. Precipitated chitosan flakes were filtrated and dried. The soluble chitosan was recovered by adding ethanol and drying. Viscosity-molecular weights (M_v) of the heat-treated chitosan, A0 and B0, were sharply decreased after 1 - 2 heating cycles from 26.9 - 36.5% and 35.9 - 53.5% respectively. However their M_v were gradually decreased after 4 - 6 heating cycles from 43.4 - 46.3% and 62.0 - 65.6% respectively. The chitosan B0 was hydrolyzed to the lowest M_v at $4.6 - 4.8 \times 10^4$ dalton after 6 heating cycles. Color of the resulted chitosan became darker brown with the increasing cycles of heat treatment. FTIR analysis showed that percent deacetylation (%DD) of heat-treated chitosan significantly increased compared to the untreated chitosan. Solubility of the heat treated chitosan in acetate buffers at pH 5.0, 5.5, and 6.0 were at 93 - 99%, 29 - 47% and 11 -22%, respectively. Zeta potential of heat-treated chitosan in acetate buffer at pH 5.5 was in range of +24 to +26 mV. The inhibitory effect of heat-treated chitosan on *Vibrio cholerae* in peeled frozen shrimps was inconclusive due to uncontrollable infection of the microbes on fresh shrimp. However the results showed that the shrimp samples soaked in 1250 - 5000 ppm of chitosan solution (B0 - 1 cycle of heat treatment) tended to inhibit the growth of *Vibrio cholerae*. Physical appearances of the treated shrimps was not significantly changed. *In vitro* inhibitory test of *Vibrio cholerae* according to ASTM E2149-10 standard showed that the chitosan (at 2,500 ppm) inhibited 83% of bacterial growth. The chitosan M_w 4.8×10^5 dalton (B0 - 4 cycle of heat treatment), at 5,000 ppm, exhibited 93% of growth. These results show benefits of heat-treated chitosan in food industry. It could be used to inhibit growth *Vibrio cholerae* to avoid undesirable effects of chemical treatments in fresh shrimps.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ไศรดา กนกพานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ วิธีการทำงานวิจัยตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รศ. ดร. ศราวุธ ริมตุสิต ดร.จิรัณ กิ่งแก้ว กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร.ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล ประธานสอบ วิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการวิจัยคณะวิศวกรรมศาสตร์และทุนโครงการ พัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท หมายเลขทุน MSD5610009 พ.ศ. 2556 ระยะเวลาทุน 1 ปี ภายใต้หัวข้อโครงการ " ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่มีผลต่อการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในกุ้งสด"

บริษัทมารินไบโอ รีซอสเซส จำกัด และ บริษัทมาริน โกลด์ จำกัด จังหวัด สมุทรสาคร ที่กรุณาเอื้อสารไคโตซาน และ อนุเคราะห์นักวิจัยและสถานที่ในการทดสอบในงานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือสำหรับวัดสีของไคโตซานและทดสอบการยับยั้งเชื้อของไคโตซานในห้องปฏิบัติการ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือสำหรับวัดค่า ศักย์เซต้าของสารละลายไคโตซาน

งานวิจัยนี้จะสำเร็จไม่ได้ถ้าขาดบุคคลเหล่านี้ คุณชื่นชนก แก้วนรินทร์ และนักวิจัยทุกท่าน ที่ห้องปฏิบัติควบคุมคุณภาพของกุ้งสด ที่โรงงานมาริน โกลด์ จำกัด ที่ช่วยเหลือในการทดสอบการยับยั้งเชื้อของไคโตซานในกุ้ง ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีและพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีวเคมีทุกคนสำหรับคำแนะนำ กำลังใจ และช่วงเวลาต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและแรงผลักดัน จนทำให้ถึงวันนี้ได้ รวมไปถึงการให้การสนับสนุนเงินทุนสำรองในงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
บทที่ 2	5
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ไคโตซาน (Chitosan)	5
2.1.1 กระบวนการเตรียมไคโตซาน	7
1. การแยกไคติน (Isolation of chitin).....	7
2. การเตรียมไคโตซาน (Preparation of chitosan).....	9
2.2. การวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติล (Determination of the degree of deacetylation) ของไคตินและไคโตซาน	9
2.2.1 การวิเคราะห์การกำจัดอะซิติล (Degree of Deacetylation) ของไคโตซานด้วยเทคนิคอินฟราเรด (infrared spectroscopy, IR).....	10
2.3 การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (Determination molecular weight of chitosan)	12
2.3.1 การวัดความหนืด (Viscosimetry).....	12
2.3.2 เจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography, GPC)	14

2.4 การลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน	17
2.4.1 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทางเคมี (Chemical hydrolysis) และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทางเคมีรวมกับความร้อน	18
2.4.2 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการใช้เอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)	21
2.5 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของโคโตซาน (Antimicrobial properties)	25
2.6 สติบัตร์ของโคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหาร.....	29
2.7 การจำแนกชนิดแบคทีเรียและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ และยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในอาหารทะเล	32
2.7.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย.....	32
2.7.2 ปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	32
2.7.3 แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล	34
2.7.4 สารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง	36
2.7.5 กระบวนการผลิตกุ้งสดแช่แข็ง	37
2.7.6 มาตรฐานการตรวจสอบเชื้อไวรัส คอลิฟอร์ม ของผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ.....	38
บทที่ 3	40
วิธีการดำเนินการวิจัย	40
3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย	40
3.2 แผนผังการศึกษาสมบัติของโคโตซาน	41
3.3 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	42
3.4 ขั้นตอนในการทำวิจัย.....	43
3.4.1 การลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานด้วยความร้อน.....	43
3.5 วิเคราะห์การทดลอง	44
3.5.1 ทดสอบการละลายของโคโตซาน.....	44
3.5.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของโคโตซาน.....	45

3.5.3 วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล.....	45
3.5.4 ทดสอบค่าศักย์เซต้า (zeta potential) ของสารละลายโคโตซาน.....	47
3.5.5 วัดสี.....	47
3.6 ศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลรา (<i>Vibrio cholera</i>).....	48
3.6.1 เตรียมสารละลายโคโตซาน.....	48
3.6.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลราในห้องปฏิบัติการ.....	48
3.6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลราในกุ้งสด.....	49
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	53
3.8 สถานที่ทำงานวิจัย.....	53
บทที่ 4.....	54
ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	54
4.1 การศึกษาลักษณะของตัวอย่างโคโตซานเริ่มต้น.....	55
4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของโคโตซานหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน.....	56
4.2.1 ร้อยละการได้กลับของโคโตซาน.....	56
4.2.2 การเปลี่ยนแปลงสี.....	59
4.2.3 โครงสร้างทางเคมีของโคโตซานด้วยการวิเคราะห์ FTIR.....	62
4.2.4 น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน.....	67
4.2.5 ความสามารถในการละลายของโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน.....	71
4.2.6 ค่าศักย์เซต้าของสารละลายโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน.....	74
4.3 ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลรา (<i>Vibrio cholerae</i>) ของสารละลายโคโตซาน.....	76
4.3.1 ผลของสารละลายโคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลราในกุ้งสด.....	76
4.3.2 ผลของสารละลายโคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโคเลราในห้องปฏิบัติการ.....	82
บทที่ 5.....	87

สรุปผลการทดลอง.....	87
5.1 ผลของความร้อนที่มีผลต่อโคโตซาน.....	87
5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	88
5.3 ข้อเสนอแนะของการใช้งาน.....	88
5.4 งานวิจัยในอนาคต.....	90
.....	91
รายการอ้างอิง.....	91
ภาคผนวก ก.....	97
ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction).....	97
ภาคผนวก ข.....	98
หลักการวัดสี.....	98
ภาคผนวก ค.....	104
การหาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน.....	104
ค.1 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานโดยการวัดความหนืด.....	104
ค.2 ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography; GPC).....	105
ภาคผนวก ง.....	109
การทดสอบสมบัติการละลาย (Solubility Test) ของโคโตซาน.....	109
ภาคผนวก จ.....	111
การคำนวณหาร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation , DD).....	111
ภาคผนวก ฉ.....	113
การวัดค่าศักย์เซต้า (Zeta Potentia).....	113
ภาคผนวก ช.....	115

การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโคลเลรา (<i>vibrio cholera</i>).....	115
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	119



สารบัญตาราง

หน้าที่

ตารางที่ 2. 1	ช่วงการดูดกลืนที่หมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน	11
ตารางที่ 2. 2	งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน.....	22
ตารางที่ 2. 3	งานวิจัยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานด้วยน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน	26
ตารางที่ 2. 4	งานวิจัยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานด้วยน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่ ความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่างกัน.....	28
ตารางที่ 2. 5	ตัวอย่างสัทธิบัติและงานวิจัย การของโคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียในอาหาร.....	31
ตารางที่ 2. 6	แสดงชนิดของแบคทีเรียและปริมาณที่พบในอาหารทะเล	34
ตารางที่ 3.1	กลุ่มตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ	44
ตารางที่ 4.1	ลักษณะของโคโตซานจากโรงงานมารีนไบโอ รีซอสเซส จำกัด ที่ถูกวิเคราะห์ซ้ำโดย ผู้วิจัย.....	55
ตารางที่ 4. 2	ร้อยละการได้กลับของโคโตซานหลังสะเทินกลับที่พีเอช 6.5 และ 7.0	58
ตารางที่ 4. 3	การเปลี่ยนแปลงสีของโคโตซานพิจารณาจากค่า L^* a^* และ b^*	61
ตารางที่ 4. 4	ค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่นต่างๆ ของหมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน [25].....	62
ตารางที่ 4. 5	ผลร้อยละการจำกัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation, % DD) ของโคโต ซานด้วยเทคนิค FTIR.....	66
ตารางที่ 4. 6	ร้อยละการลดลงของ M_v ของโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน	69
ตารางที่ 4. 7	ผลการส่งวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคเจลเพอร์เมียมลเอชันโครมาโตกราฟี (GPC) เปรียบเทียบกับการวัดน้ำหนักโมเลกุล (M_v) โดยเทคนิควัดความหนืด ในห้องปฏิบัติการ	69
ตารางที่ 4. 8	ค่าศักย์เซต้าของสารละลายโคโตซานในน้ำที่พีเอช 5.5	75

ตารางที่ 4. 9 ผลตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา ในกึ่งสัดหลังจากผ่านการเพาะเชื้อในสารละลาย เชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10^1 และ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร.....	77
ตารางที่ 4. 10 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนาในกึ่งสัด.....	77
ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ ของกึ่งสัดเมื่อผ่านการเติมเชื้อไวรัสโคโรนาที่ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และในแซสสารละลายโคโคซานที่สูตรต่างๆ ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน .	79
ตารางที่ 4. 12 ลักษณะทางกายภาพของกึ่งสัด แช่ในสารละลายโคโคซานความเข้มข้น 1,250 – 5,000 พีพีเอ็มและบัฟเฟอร์ อะซิเตท ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศา เซลเซียส.....	80
ตารางที่ 4. 13 น้ำหนักโมเลกุล (M_w) และร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลของโคโคซานในการ ทดสอบการยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการ	82
ตารางที่ 4.14 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสโคโรนา ของโคโคซานน้ำหนัก โมเลกุลและความเข้มข้นแตกต่างกัน ในเวลา 24 ชั่วโมง ตามมาตรฐาน ASTM E2149-10.....	85
ตารางที่ ข. 1 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโคซานที่ผ่านการให้ความร้อนและ ค่าเริ่มต้นที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 3.25×10^5 ดาลตัน.....	101
ตารางที่ ข. 2 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโคซานที่ผ่านการให้ความร้อนและ ค่าเริ่มต้นที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 1.18×10^6 ดาลตัน.....	102
ตารางที่ ข. 3 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโคซานที่น้ำหนักโมเลกุล 2.8 – 4.8×10^4 ดาลตัน.....	103
ตารางที่ ง. 1 ความสามารถในการละลายของโคโคซานที่ค่าพีเอช 6.5 และ 7.0 ที่มีค่าความเป็น กรดต่างเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0.....	109
ตารางที่ ง. 2 ความสามารถในการละลายของโคโคซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ที่ค่าพีเอช เท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0.....	110
ตารางที่ ช. 1 ปริมาณของเชื้อหลังจากการทำยับยั้งเชื้อด้วยสารละลายโคโคซานใน ห้องปฏิบัติการ.....	118

สารบัญรูป

หน้าที่

รูปที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน.....	5
รูปที่ 2.2	แสดงการจัดเรียงของโครงสร้างเส้นใยของไคโตซาน (a) แบบอัลฟา (alpha form) และ (b) แบบเบต้า (beta form)	6
รูปที่ 2.3	กระบวนการเตรียมไคโตซาน	8
รูปที่ 2.4	ค่าการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันหลักของไคโตซานที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR	11
รูปที่ 2.5	หลอดแก้วรูปตัวยูสำหรับวัดความหนืด (Ubbelohde viscometer).....	14
รูปที่ 2.6	ตัวอย่างของ GPC โครมาโตแกรมที่เกิดจากการไหลผ่านคอลัมน์ของพอลิเมอร์ที่มีขนาดต่างๆ ภายใต้อัตราการไหล (F) โดยมีแกนนอน (x-axis) เป็น retention time (T_{Rt}).....	15
รูปที่ 2.7	ขั้นตอนการผลิตไคโตซานสายสั้น.....	17
รูปที่ 2.8	การเกิดไฮโดรไลซิสโดยการใช้กรดไนตริก	18
รูปที่ 2.9	การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยการใช้กรดอินทรีย์.....	18
รูปที่ 2.10	โครงสร้างของไคโตซานหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรซัลฟอนิก	19
รูปที่ 2.11	ปฏิกิริยาของการลดโมเลกุลของไคโตซานด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	20
รูปที่ 2.12	การย่อยสลายโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกับกรด	21
รูปที่ 2.13	จำนวนสิทธิบัตรของไคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้กับอาหารในช่วงปี 1999 – 2009	30
รูปที่ 2.14	แบคทีเรีย <i>Vibrio cholerae</i>	35
รูปที่ 3.1	แผนผังการทำวิจัย	40
รูปที่ 3.2	แผนผังการศึกษาสมบัติของไคโตซาน	41
รูปที่ 3.3	กราฟในการหาค่าความหนืดในตัว (intrinsic viscosity)	46
รูปที่ 3.4	สารละลายไคโตซานสูตรต่างๆสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์	48
รูปที่ 3.5	กึ่งแข็งในสารละลายเชื้อ <i>vibrio cholera</i> ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร.....	49
รูปที่ 3.6	แผนผังการทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนที่ทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยไคโตซาน.....	50

รูปที่ 3. 7	กึ่งติดเชื้อแซในสารละลายโคโตซาน และ สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์.....	51
รูปที่ 3. 8	กึ่งบรรจุในถุงพลาสติก แซ่เย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส	52
รูปที่ 3. 9	แผนผังการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอเลราในกึ่งสด	52
รูปที่ 4. 1	การเกิดจุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point; pI) ของโคโตซานในสารละลาย.....	57
รูปที่ 4. 2	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารละลายและตะกอนโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน	59
รูปที่ 4. 3	ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) [54].....	60
รูปที่ 4. 4	การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ตำแหน่งหมู่ฟังก์ชันหลักต่างๆ ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล (M_w) 3.25×10^5 ดาลตัน (ก) และ 11.8×10^5 ดาลตัน (ข).....	63
รูปที่ 4. 5	การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ตำแหน่ง 1650, 1560, 1420 และ 1320 ต่อเซนติเมตร ของโคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อน 0 รอบและ1 รอบ	64
รูปที่ 4. 6	ปฏิกิริยาอะซีติเลชันที่พันธะของเอ็น-อะซีทิล (N-acetyl linkage) [54] มีผลทำให้หมู่ อะซีทิล ของโคโตซานหลุดออกจากสายโซ่และแทนที่ด้วยหมู่เอมีน.....	65
รูปที่ 4. 7	ผลของการให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่างๆ ต่อค่าความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity)	68
รูปที่ 4. 8	ผลของการให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่างๆ ต่อการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล (M_v).....	68
รูปที่ 4. 9	ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร A1 – A4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะเทินกลับที่พีเอช 6.5).....	72
รูปที่ 4. 10	ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร C1 – C4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะเทินกลับที่พีเอช 7.0).....	72
รูปที่ 4. 11	ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร B1 – B4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะเทินกลับที่พีเอช 6.5).....	73

รูปที่ 4. 12 ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร D1 – D4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะท้อนกลับที่พีเอช 7.0).....	73
รูปที่ 4. 13 ร้อยละการละลายที่พีเอช 5.0 ถึง 6.0 ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน	74
รูปที่ 4. 14 ปริมาณเชื้อไวรัส คอลอเลรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วย สารละลายโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซาน 2,500 พีพีเอ็ม	84
รูปที่ 4. 15 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานที่มีต่อปริมาณเชื้อไวรัส โอลอเลรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	85
รูปที่ 4.16 ตัวอย่างภาพแสดง ปริมาณโคลนินของเชื้อไวรัส คอลอเลรา หลังจากผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารละลายโคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	86
รูปที่ 5.1 แผนผังการกระบวนทำความสะอาดของกึ่งสตูในอุตสาหกรรม ก. คือกระบวนการผลิตกึ่งแช่แข็งทั่วไปของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล และ ข. คือกระบวนการที่มีการนำโคโตซานมาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย.....	89
รูปที่ ก. 1 ปฏิกริยามเมลลาร์ด (maillard reaction) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์	97
รูปที่ ค. 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานกับ $\ln(\eta_r)/C$ และ η_{sp}/C . 104	
รูปที่ ค. 2 กราฟฟิซีซีน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร A0.....	105
รูปที่ ค. 3 กราฟฟิซีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B0.....	106
รูปที่ ค. 4 กราฟฟิซีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B1 (ส่วนตะกอนที่ตกลงมาหลังจากสะท้อนกลับทันที).....	106
รูปที่ ค. 5 กราฟฟิซีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B1 (ส่วนตะกอนที่อยู่ในสารละลายหลังจากสะท้อน และแยกโดยการเติมเอทานอล).....	107
รูปที่ ค. 6 กราฟฟิซีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B4 (ส่วนตะกอนที่ตกลงมาหลังจากสะท้อนกลับทันที).....	107

รูปที่ ค. 7 กราฟฟิฟิซีของน้ำหนักรวมของโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B4 (ส่วนตะกอนที่ อยู่ในสารละลายหลังจากสะเทิน และแยกโดยการเติมเอทานอล).....	108
รูปที่ ค. 8 กราฟฟิฟิซีของน้ำหนักรวมของโคโตซานของโคโตซานน้ำหนักรวมของโคโตซาน.....	108
รูปที่ จ. 1 ค่าการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน.....	111
รูปที่ ฉ. 1 เครื่องวัดค่าศักย์เซต้า	114
รูปที่ ฉ. 2 ภาพขณะบรรจุตัวอย่างสำหรับวัดค่าศักย์เซต้า.....	114
รูปที่ ข. 1 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (<i>vibrio cholerae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ความ เข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 และ 10 ² ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ที่ 0 สัปดาห์ และที่ความเข้มข้น เชื้อเริ่มต้น 10 ² ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาแช่แข็ง 1 สัปดาห์.....	115
รูปที่ ข. 2 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (<i>vibrio cholerae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่าน การยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B0-1 ถึง B0-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 1 สัปดาห์.....	116
รูปที่ ข. 3 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (<i>vibrio cholerae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่าน การยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B1-1 ถึง B1-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน	116
รูปที่ ข. 4 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (<i>vibrio cholerae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่าน การยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B1*-1 ถึง B1*-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน.....	117
รูปที่ ข. 5 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (<i>vibrio cholerae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่าน การยับยั้งในสารละลายอะซิเตรท	117

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติโดยสังเคราะห์มาจากไคติน ซึ่งผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติลออก โดยไคโตซานเป็นสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) โดยพบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบได้ใน เปลือกกุ้ง กระดองปู แกนปลาหมึก หรือมาจากผนังเซลล์ของเห็ด รา และยีสต์ เป็นต้น ทั่วไปไคโตซานละลายในกรดอินทรีย์ที่พีเอชประมาณ 2-3 [1] เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น ไคโตซานมีการนำไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น การนำไคโตซานมาผสมกับซอร์เบท ใส่ในเครื่องดื่ม (Beverage) ช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องดื่ม [2] หรือใช้ไคโตซานเป็นสารเพิ่มความคงตัว (Stabilizer) ของการทำเนยถั่ว (peanut butter) เพราะไคโตซานช่วยเพิ่มความเข้ากันได้และความคงตัวระหว่างไขมันจากเนยและโปรตีนจากถั่ว [3] ยิ่งไปกว่านั้นไคโตซานสามารถนำมาผสมกับพอลิเมอร์สำหรับขึ้นรูปเป็นบรรจุภัณฑ์ห่ออาหาร ทำให้บรรจุภัณฑ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารและสามารถยืดอายุอาหารได้ยาวนานขึ้น [4] ไคโตซานยังสามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มในการเคลือบอาหารเพื่อยืดอายุ เช่น เนื้อทุเรียน โดยที่สามารถคงคุณภาพของเนื้อทุเรียนให้เหมือนเดิมได้นานถึง 26 วัน [5] ส่วนด้านการแพทย์ ไคโตซานสามารถทำเป็นวัสดุปลดปล่อยยา (Drug-delivery systems) [1] หรือด้านเครื่องสำอาง ทำครีมบำรุงผิว เนื่องจากไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็นต้น

ไคโตซานสามารถละลายในกรดอินทรีย์ที่ค่าพีเอชต่ำประมาณ 2-3 จึงส่งผลให้เป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลให้ไคโตซานละลายนั้น ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติล (% Degree of Deacetylation, % DD) จากงานวิจัยก่อนหน้ามีผู้ศึกษาการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานด้วยกันหลายวิธี อาทิเช่น การใช้กรดอะซิติก (ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก) ลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน เพราะกรดสามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) [6] เพื่อตัดสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานให้สั้นลง นอกจากการใช้กรดอินทรีย์แล้ว สามารถใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) ในการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความว่องไวต่อการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และเข้าไปจับสายโซ่ของไคโตซานและเกิดการตัดสายโซ่ของไคโตซานให้สั้นลงโดยปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) [7] แต่อย่างไรก็ตาม การลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมีนั้นอาจมีสารเคมีตกค้าง และต้องผ่านหลายกระบวนการเพื่อกำจัดสารเคมีตกค้าง มีรายงานการใช้เทคนิคพลาสมา (plasma) ที่ทำให้ออกซิเจนแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ เข้าจับสายโซ่ของโคโตซาน และเกิดการตัดสายโซ่ของโคโตซานให้สั้นลงเช่นกัน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สารเคมีน้อย แต่ไม่เหมาะสมที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากต้นทุนที่สูงเกินไป [8] โคโตซานเมื่อถูกทำลายกลายเป็นสารละลาย สายโซ่โมเลกุลของโคโตซานแสดงความเป็นประจุบวกที่หมู่เอมีน (amine, $-NH_2$) บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของโครงสร้างโคโตซาน โดยมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่าสารละลายโคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (positive gram) เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น และแกรมลบ (negative gram) เช่น *Escherichia coli*, ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Prevotella melaninogenica* และ *Bacteroides fragilis* [9-12] โดยถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สารละลายโคโตซานสามารถสร้างฟิล์มล้อมเซลล์แบคทีเรียไว้ ป้องกันสารอาหารเข้าไปสู่เซลล์แบคทีเรีย ในที่สุดแบคทีเรียขาดอาหารตาย ถ้าหากเป็นแบคทีเรียแกรมลบสารละลายโคโตซานซึ่งมีขั้วที่ตรงข้ามกับผนังเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อสารละลายโคโตซานเข้าไปล้อมรอบเซลล์แบคทีเรียด้วยความมีขั้วที่ตรงข้ามกัน ส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและสารละลายโคโตซานบางส่วนเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย รบกวนระบบเผาผลาญอาหาร (metabolism) ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตายในที่สุด [9]

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมส่งออกกุ้งสดของไทย ประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโอคอเลรา (*vibrio cholera*) ที่ฝังตัวอยู่ในเปลือกของตัวกุ้ง ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาโรคทางเดินอาหาร [13] ซึ่งในปัจจุบันมีการแก้ปัญหาโดยใช้คลอรีนหรือกรดที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโอคอเลรา แต่ผลเสียที่ตามมาคือทำให้เนื้อกุ้งสดเปื่อยยุ่ย ไม่คงตัว ทำให้ไม่เป็นที่พอใจของผู้บริโภค จากรายงานการวิจัยของ Benhadiles และคณะ ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัสโอคอเลรา ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลโคโตซานแตกต่างกัน พบว่าที่น้ำหนักโมเลกุลสูง (M_w 4.6×10^4 ดาลตัน) และที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ (M_w 5.0×10^3 ดาลตัน) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสโอคอเลราได้ แต่ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโอคอเลรา ได้ถึงร้อยละ 90 หลังจากเวลาผ่านไป 1.5

ชั่วโมง ในขณะที่โคโตซานที่น้ำโมเลกุลสูงจะสามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คอเลรา ได้เพียงร้อยละ 63 ในระยะเวลาเท่ากัน [14]

ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานให้เป็นโคโตซานสายสั้น (chitooligosaccharides) เพิ่มประสิทธิภาพในการละลายในสารละลายที่ค่าความเป็นกรดต่างค่อนข้างที่เป็นกลางหรือน้ำได้ (ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 – 6.5) เพื่อลดการใช้สารเคมีและลดค่าใช้จ่าย จากนั้นนำโคโตซานที่ได้มายับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโอ คอเลรา โดยนำไปใช้ในกระบวนการทำความสะอาดกึ่งสด ของสายการผลิตกึ่งสดแช่แข็งเพื่อการส่งออก โดยเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมกึ่งสดแช่แข็งต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาผลความร้อนต่อน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานและศึกษาลักษณะสมบัติของโคโตซานที่ผ่านกระบวนการดังกล่าว
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลของโคโตซานที่มีผ่านการให้ความร้อนในการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คอเลรา (*vibrio cholerae*)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการลดขนาดโมเลกุลของโคโตซานจากเปลือกกุ้งที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 10^6 และ 10^5 ดาลตัน ในช่วงร้อยละของการจำกัดหมู่อะซิติล มากกว่าร้อยละ 90 ที่จำหน่ายเชิงพาณิชย์ โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่ความดัน 0.1 เมกะปาสคาล ในกรดอะซิติค และเพิ่มจำนวนรอบในการให้ความร้อนเป็นจำนวนรอบเป็น 1, 2, 4 และ 6 รอบ ที่ความเข้มข้นของโคโตซานร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

- 1.3.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโคโตซานที่ผ่านกระบวนการทางความร้อน
 - ร้อยละการได้กลับ
 - การเปลี่ยนแปลงสี โดยใช้เทคนิค L^* , a^* , b^*
 - การเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันของโคโตซานด้วย เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy ได้แก่หมู่ฟังก์ชัน ไฮดรอกซิล, เอไมด์และพันธะไกลโคซิด (C-O-C bridge) เป็นต้น

- ร้อยละการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติดิล (% Degree of Deacetylation, % DD)
- น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานโดยเทคนิคการวัดความหนืด และเทคนิคเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography ; GPC)
- การละลายของโคโตซานในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 - 6.0
- ค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential) ของสารละลายโคโตซานในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

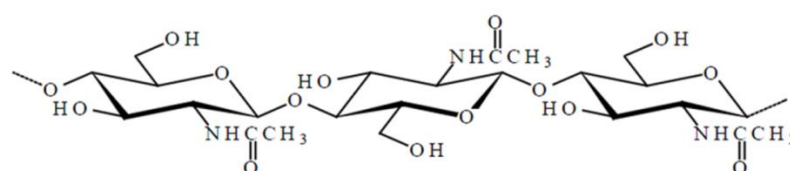
- 1.3.3 ทดสอบผลของน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นที่ใช้ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *vibrio cholera* ในห้องปฏิบัติการและในกุ้งสดที่ติดเชื้อโดยศึกษาลักษณะกายภาพของเนื้อกุ้งเมื่อผ่านการแช่สารละลายโคโตซาน
- 1.3.4 สรุปลักษณะและวิเคราะห์ผลการทดลอง และแนวทางการใช้โคโตซานในกระบวนการผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง

บทที่ 2

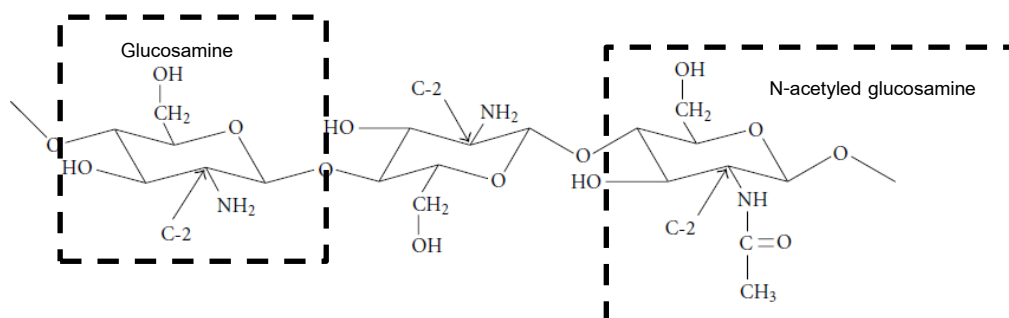
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซานเป็นสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Poly (1, 4-2-amino-2-deoxy- β -D-glucosamine) ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ถูกกำจัดหมู่อะซิติกออกจาก ตำแหน่งเอ็น-แอซิติล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) และกลายเป็น กลูโคซามีน (Glucosamine) แสดงดังรูปที่ 2.1 วัตถุประสงค์ในการสกัดไคโตซานมาจากผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา รวมทั้งเปลือกของแมลงและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีข้อและปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนปลาหมึก (squid pen) เนื่องจากแหล่งวัตถุดิบที่หลากหลาย จึงส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน โครงสร้างที่ทำมาจากกระดองปลาหมึก (squid pen) เป็นโครงสร้างแบบเบต้า (β -form) มีลักษณะการจัดเรียงตัวแบบขนาน (parallel) ซึ่งมีแรงยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลที่อ่อน จึงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายได้ง่ายกว่าโครงสร้างที่เป็น แบบอัลฟา (α -form) เนื่องจากเป็นโครงสร้างแบบไม่ขนาน (anti-parallel) จึงมีแรงยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลสูง ดังรูปที่ 2.2 เป็นโครงสร้างที่พบมากในไคโตซานที่สกัดมาจากเปลือกกุ้ง ปู [15]



ไคติน



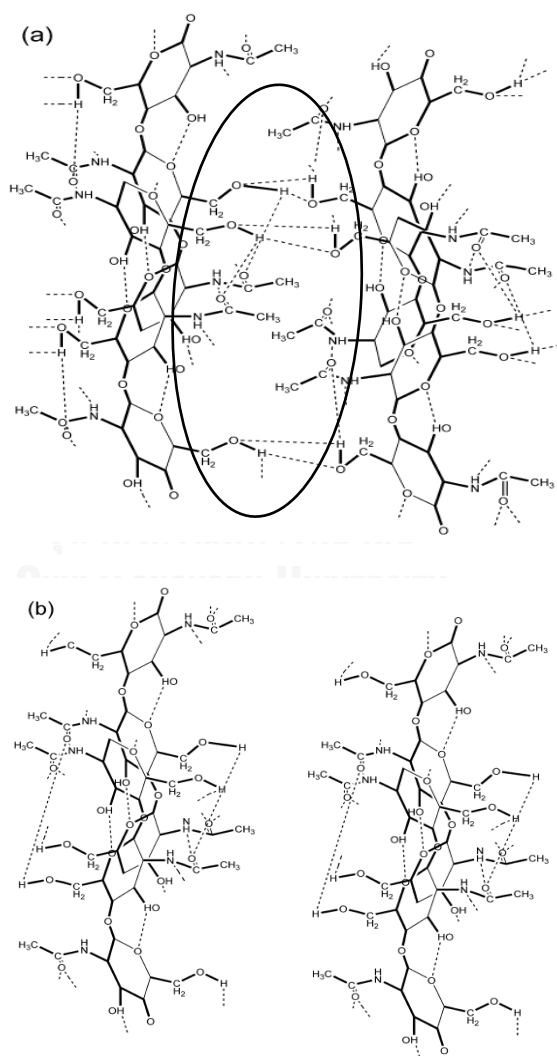
ไคโตซาน [16]

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน

โครงสร้างแบ่งตามลักษณะการเรียงตัวของเส้นใยของไคโตซานได้ 2 กลุ่ม [17] คือ

❖ โครงสร้างแบบอัลฟา (alpha form) เป็นโครงสร้างที่มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในลักษณะสวนทางกันและเกี่ยวพันกันระหว่างระนาบที่พันธะไฮโดรเจน (inter-sheet hydrogen bonds) ของโครงสร้างไคโตซาน ดังรูปที่ 2.2 จึงมีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู เป็นต้น

❖ โครงสร้างแบบเบต้า (beta form) เป็นโครงสร้างที่มีการเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลในทิศทางเดียวกัน ไม่มีการเกี่ยวพันระหว่างระนาบจึงมีความแข็งแรงต่ำ และมีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าโครงสร้างแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินและไคโตซานจากแกนปลาหมึก เป็นต้น



รูปที่ 2.2 แสดงการจัดเรียงของโครงสร้างเส้นใยของไคโตซาน (a) แบบอัลฟา (alpha form) และ (b) แบบเบต้า (beta form)

องค์ประกอบหลักในโครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน (รูปที่ 2.1) มีอยู่ 2 ส่วนคือ

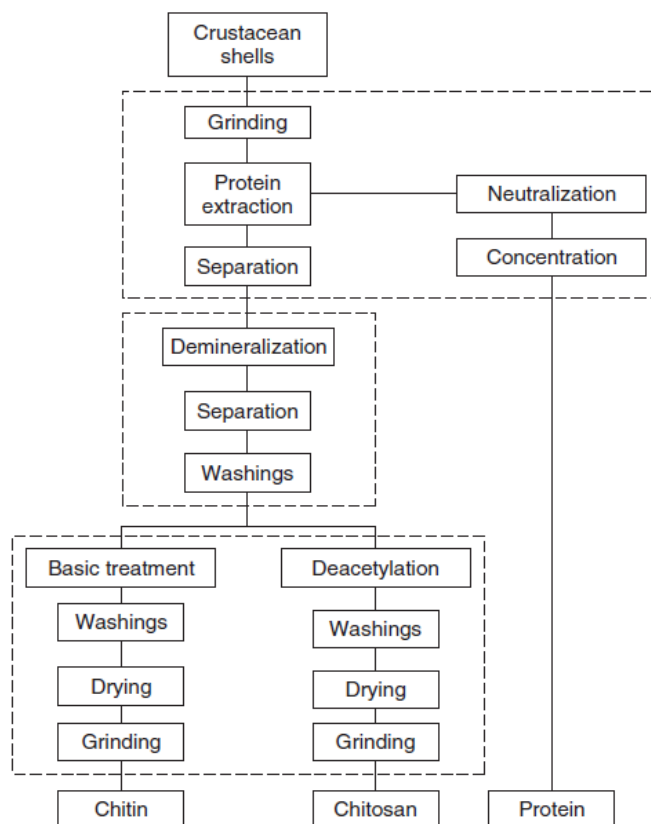
1. กลูโคซามีน (Glucosamine)
2. เอ็น-แอสิติลกลูโคซามีน (N-acetyled glucosamine)

ไคโตซานเกิดจากการเรียงต่อกันเป็นสายของทั้งสองส่วนหลัก และเชื่อมด้วยพันธะ 1-4 -ไกลโคซิดิก โดยปกติแล้วไคโตซานมีส่วนผสมของทั้งน้ำตาลเอ็น-แอสิติลกลูโคซามีนและกลูโคซามีน อยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับค่าการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation, DD) ซึ่งผลต่อสมบัติของไคโตซาน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซาน ซึ่งมีผลต่อความหนืด และความสามารถในการละลายในสารละลายที่ค่าพีเอช (pH) แตกต่างกัน ไคโตซานสามารถละลายได้ดีในกรดอินทรีย์เจือจางที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 6.0 เนื่องจากที่ค่าพีเอชต่ำ หมู่เอมีน (-NH₂) ในโครงสร้างของไคโตซานสามารถรับโปรตอน (Protonated) ส่งผลให้สายโซ่ของไคโตซานแสดงประจุบวก ดังนั้นถ้าไคโตซานละลายที่ค่าพีเอชสูงเกิน 6.0 หมู่เอมีนในโครงสร้างของไคโตซาน จะเกิดการสูญเสียโปรตอน (Deprotonated) ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการละลายลดลง โดยปริมาณของหมู่เอมีนที่สูงแสดงว่ามีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลที่สูง กรดอินทรีย์ที่ละลายไคโตซานได้ เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น แต่ไคโตซานไม่ละลายใน กรดฟูริก กรดฟอสฟอริก ไดเมทิลฟอมาไมด์ (dimethylformamide) และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) [17]

2.1.1 กระบวนการเตรียมไคโตซาน

1. การแยกไคติน (Isolation of chitin)

การสกัดไคตินจากเปลือกของสัตว์ เช่น เปลือกกุ้ง กระจงปู เป็นต้น สามารถสกัดได้ไคติน (ร้อยละ 20 - 30) โปรตีน (ร้อยละ 30- 40) และเกลือของพวกสารอนินทรีย์ ซึ่งส่วนมากเป็น แคลเซียมคาร์บอเนต หรือ ฟอสเฟส (ร้อยละ 30 - 40) และลิปิด (ร้อยละ 0 -14) โดยปริมาณของไคตินที่สกัดได้นั้นเปลี่ยนแปลงตามแหล่งที่มาของวัตถุดิบ และฤดูกาล [18, 19] โดยแผนผังขั้นตอนการแยกไคตินแสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กระบวนการเตรียมไคโตซาน

[18]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 การกำจัดโปรตีน (deproteinization) โดยนำวัตถุดิบ เช่น เปลือกกุ้ง หรือ กระดองปู เป็นต้น มาทำการต้มด้วยด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไบคาร์บอเนต หรือโซเดียมคาร์บอเนต เป็นต้น ที่อุณหภูมิสูง (65 -100 องศาเซลเซียส) [20] จากนั้นทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 0.5 - 2 ชั่วโมง และปรับพีเอชให้ต่ำเพื่อให้ตะกอนของโปรตีน หากสกัดที่อุณหภูมิสูงหรือระยะเวลานานเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการตัดของสายโซ่ได้ นอกจากนี้ได้มีการพัฒนากระบวนการสกัดไคตินด้วยการใช้เอนไซม์แอลคาเลส (*Alcalase*) ในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวภาพ ใช้สารเคมีปริมาณต่ำ และลดการสลายตัวของไคติน [21]

1.2 การกำจัดแร่ธาตุ (demineralization) ขั้นตอนการกำจัดสารอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งส่วนใหญ่คือ แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) หรือ แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ส่วนใหญ่ใช้กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCL) แต่อาจใช้กรด

ซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4) หรือกรดอะซิติก (acetic acid, CH_3COOH) แทนได้ ซึ่งทำการกำจัดที่อุณหภูมิห้อง และสมการการเกิดปฏิกิริยาที่ใช้กรดไฮโดรคลอริก ตามสมการที่ (2.1)



ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยานั้นต้องคำนึงถึงชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ และถ้าหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการสลายตัวทางความร้อนได้ [22]

1.3 การกำจัดสีของไคติน (decolouration) เม็ดสี (pigment) นั้นมาจากเปลือกของสัตว์ โดยเม็ดสีที่พบส่วนมากเป็น astaxanthin, cantaxanthin, astacene, lutein และ β -carotene เป็นต้น ซึ่งตัวทำละลายที่สามารถกำจัดเม็ดสีเหล่านี้ ได้แก่ อะซิโตน (acetone), คลอโรฟอร์ม (chloroform), อีเทอร์ (ether), เอทานอล หรือ ใช้เป็นตัวทำละลายผสม เป็นต้น [19] เม็ดสีอาจถูกกำจัดโดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [23]

2. การเตรียมไคโตซาน (Preparation of chitosan)

ไคตินที่สกัดได้ถูกนำมาผ่านปฏิกิริยาดีอะซีติเลชันเพื่อกำจัดหมู่อะซิล ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) ที่กลุ่มอะซิตาไมด์ (acetamide groups, $-COCH_3$) โดยการใช้ต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้นสูง ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส แต่ความเข้มข้นและสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ และความต้องการปริมาณการกำจัดกลุ่มอะซิตาไมด์ หรือ การกำจัดหมู่อะซิลมากน้อยเพียงใด [24]

2.2. การวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิล (Determination of the degree of deacetylation) ของไคตินและไคโตซาน

ปริมาณอะซีติเลชัน (Degree of acetylation, DA) แสดงถึงปริมาณของหมู่อะซิล ในน้ำตาลเอ็น-แอซีติลกลูโคซามีนของไคตินและไคโตซานซึ่งแสดงผลเป็นร้อยละของ DA ส่วนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิลอยู่บนโมเลกุลของไคตินเพื่อให้กลายเป็นไคโตซาน เป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่เอมีน ซึ่งจะแสดงผลเป็นร้อยละการกำจัดหมู่อะซิล โดยร้อยละของการมีอยู่ของหมู่อะซิล (% DA) กับร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิล (% DD) มีความสัมพันธ์ตามสมการที่ (2.2)

$$\% DD = 100 - \% DA \quad (2.2)$$

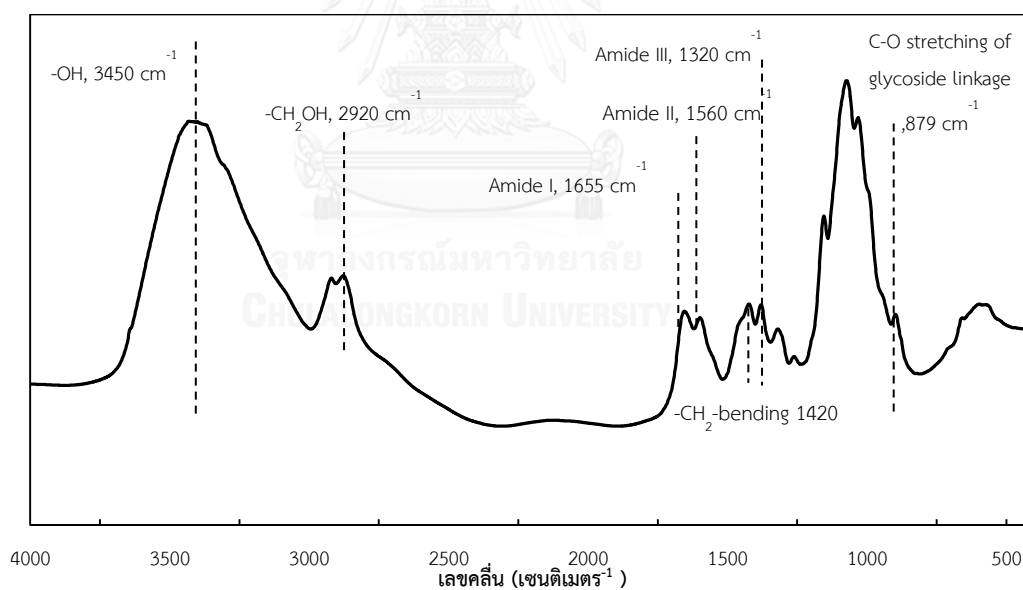
ถ้าร้อยละของหมู่อะซิติกน้อยกว่าร้อยละ 50 [11] ไคโตซานจะสามารถละลายในกรดอินทรีย์หรือในสารละลายที่พีเอชเป็นกลาง นั่นคือเมื่อมีหมู่เอมีนในโครงสร้างของไคโตซานเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลายเพิ่มขึ้นซึ่งช่วยในการละลายดีขึ้น โดยทั่วไปไคโตซานสามารถละลายได้ดีในสารละลายที่พีเอชต่ำหรือในกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งโดยธรรมชาติแล้ว ไคโตซานไม่สามารถละลายน้ำหรือในสารละลายที่มีพีเอชเป็นกลางถึงสูงได้ [19] และในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติกของไคโตซานด้วยเทคนิคอินฟราเรด (infrared spectroscopy, IR)

2.2.1 การวิเคราะห์การกำจัดอะซิติก (Degree of Deacetylation) ของไคโตซานด้วยเทคนิคอินฟราเรด (infrared spectroscopy, IR)

เนื่องจากไคตินและไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ผสม (copolymer) จะแสดงความเป็นไคตินเมื่อมีหมู่อะซิติกอยู่มาก แต่จะแสดงความเป็นไคโตซานเมื่อหมู่อะซิติกที่น้อย โดยสามารถดูปริมาณหมู่อะซิติกได้จากร้อยละของหมู่อะซิติก ซึ่งค่าร้อยละหมู่อะซิติกตรงข้ามกับค่าร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติก การวิเคราะห์ปริมาณของเอ็น-อะซิติกกลูโคซามีนในไคโตซาน ด้วยเทคนิคอินฟราเรด โดยใช้หลักการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น (Wave Number) ที่เหมาะสม โดยอยู่ในช่วง $4000 - 400$ เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งมีตารางที่ 2.1 แสดงช่วงการดูดกลืนที่หมู่ฟังก์ชันหลักของโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานและรูปที่ 2.4 [25]

ตารางที่ 2. 1 ช่วงการดูดกลืนที่หมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน

ตำแหน่งการดูดกลืน (Absorption band)	เลขคลื่น (Wave Number) (เซนติเมตร ⁻¹)
O-H stretching	3450
C-H stretching	2870
N-H bending of NH ₂	1620 – 1630
Amide I (C=O stretching)	1655
Amide II (N-H bending)	1560
CH ₂ bending	1420
Amide III	1320
C-O stretching	1030 1070
C-O stretching of glycoside linkage	897
Glycoside linkage/C-O-C bridge	1160



รูปที่ 2. 4 ค่าการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซานที่วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR

จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลเป็นอัตราส่วนเทียบระหว่าง ค่าการดูดกลืนที่เลขคลื่นต่างๆ สัดส่วน A_{1655}/A_{3450} ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะซิติก โดยการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1655 เซนติเมตร⁻¹ แสดงถึงการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันเอไมด์หนึ่ง (amide-I) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของไคติน ที่หมู่เอ็น-แอสิติลกลูโคซามีน ส่วนการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่น 3450 เซนติเมตร⁻¹ เป็นตำแหน่งไฮดรอกซิล (O-H stretching) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของไคโตซาน ซึ่งใช้สมการที่ (2.3)

$$DA (\%) = (A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1.33 \quad (2.3)$$

จากสมการ หากค่า A_{1655}/A_{3450} เท่ากับ 1.33 แสดงความเป็นไคตินทั้งหมด แต่ถ้าค่า A_{1655}/A_{3450} เท่ากับศูนย์ แสดงความเป็นไคโตซานทั้งหมด ถ้าหากไคโตซานมีความชื้นสูงอาจส่งผลต่อการดูดกลืนที่ตำแหน่งไฮดรอกซิล (O-H stretching) ดังนั้นจึงต้องคำนวณหา ร้อยละของการมีอยู่ของอะซิติกในโครงสร้างไคโตซาน โดยใช้อัตราส่วนของ A_{1320}/A_{1420} ตามสมการที่ (2.4) โดยเป็นการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1320 เซนติเมตร⁻¹ ของเอไมด์สาม (amide-III) และการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งของเมทิล (CH_2 - bending) ที่เลขคลื่น 1420 เซนติเมตร⁻¹

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133DA \quad (2.4)$$

2.3 การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (Determination molecular weight of chitosan)

2.3.1 การวัดความหนืด (Viscosimetry)

ความหนืดเป็นสมบัติของของไหล เกิดจากโมเลกุลของของไหลเคลื่อนที่ผ่านกัน ซึ่งเกิดแรงต้านทานการไหลระหว่างชั้น (layer) ภายในของเหลว ความหนืดบ่งบอกถึงแรงเสียดทานภายในของเหลวนั้น ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าแรงเสียดทานระหว่างชั้นของของไหล ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างและรูปร่างของโมเลกุลของของไหลนั้น ตลอดจน อุณหภูมิ ความดัน เป็นต้น การวัดความหนืดของสารพอลิเมอร์ สามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารพอลิเมอร์ได้ โดยพิจารณาจากค่าความหนืดสัมบูรณ์ (absolute viscosity) ของของเหลวนั้น แต่โดยทั่วไปในทางปฏิบัติ นิยมใช้ความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity, η_r) ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับความหนืด ของของเหลวมาตรฐาน (เช่น น้ำหรือตัวทำละลายบริสุทธิ์)

$$\eta_r = \eta_1/\eta_0 = (\rho t)_1/(\rho t)_0 \quad (2.5)$$

เมื่อ ตัวเลข 1 และ 0 หมายถึง สารละลายแต่ละชนิด

t คือ เวลาของการไหลของของเหลว

ρ คือ ความหนาแน่นของของเหลว

เมื่อทราบความหนืดสัมบูรณ์ (η) และความหนาแน่นของของเหลวมาตรฐานที่อุณหภูมิที่กำหนดสามารถคำนวณหาความหนืดสัมพัทธ์ของสารนั้นได้จากสมการที่ (2.5) สามารถหาใช้น้ำหนักโมเลกุลของสารละลายพอลิเมอร์ได้ในสภาวะสารละลายเจือจาง (ความเข้มข้นสูงสุดไม่เกินร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ความหนาแน่นของสารละลายพอลิเมอร์ มีค่าเทียบเท่ากับความหนาแน่นของตัวทำละลาย ตามสมการที่ (2.6) [26]

$$\eta_r = \eta_1/\eta_0 = (t)_1/(t)_0 \quad (2.6)$$

เมื่อ t_1 และ t_0 คือเวลาการไหลของสารละลายและตัวทำละลายบริสุทธิ์ตามลำดับ

$$(\eta_1 - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1 = \eta_{sp} \quad (2.7)$$

η_{sp} เป็นความหนืดจำเพาะ (specific viscosity) โดยปกติแล้วค่าความหนืดของสารขึ้นอยู่กับความเข้มข้น (C) ของสารละลาย จึงเปรียบเทียบค่าความหนืดจำเพาะกับความเข้มข้น η_{sp}/C และความสัมพันธ์ ระหว่าง η_{sp}/C กับความเข้มข้น เรียกว่า สมการของ Huggins ดังสมการที่ (2.8)

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 \quad (2.8)$$

และความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(\eta_r)/C$ กับความเข้มข้นแสดงดังสมการของ Kraemer (2.9)

$$\ln(\eta_r)/C = [\eta] - k''[\eta]^2 \quad (2.9)$$

$[\eta]$ เป็นค่าความหนืดในตัว (intrinsic viscosity) หรือเลขความหนืดจำกัด (limiting viscosity number)

k' และ k'' เป็นค่าคงที่ของพอลิเมอร์ในตัวทำละลายที่กำหนดและมีความสัมพันธ์กันคือ

$$k' + k'' = 0.5 \quad (2.10)$$

จากสมการ (2.8) และ (2.9) สามารถหาค่าความหนืดในตัวได้จากการสร้างกราฟระหว่าง η_{sp}/C และ $\ln(\eta_r)/C$ กับความเข้มข้น โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายที่มีหลายความเข้มข้น เพื่อทำการหา จุดตัดแกนตั้ง ซึ่งเท่ากับค่า $[\eta]$ ซึ่งเป็นความเจือจางอนันต์ (infinite dilution, $C = 0$) ซึ่งคือ

$$\eta_{sp}/C = \ln(\eta_{red})/C = [\eta] \quad (2.11)$$

ค่าความหนืดในตัวส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยแบบความหนืด (M_v) ของพอลิเมอร์ดังสมการของ Mark-Houwink [27]

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad (2.12)$$

โดยที่ค่า K และ a เป็นค่าคงที่เฉพาะคู่ของพอลิเมอร์กับตัวทำละลาย โดยเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ [26] ในทางปฏิบัติค่า η_{sp} และ η_r จะได้มาจากการวัดความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้หลอดแก้วรูปตัวยูสำหรับวัดความหนืด (Ubbelohde viscometer) ดังรูปที่ 2.5

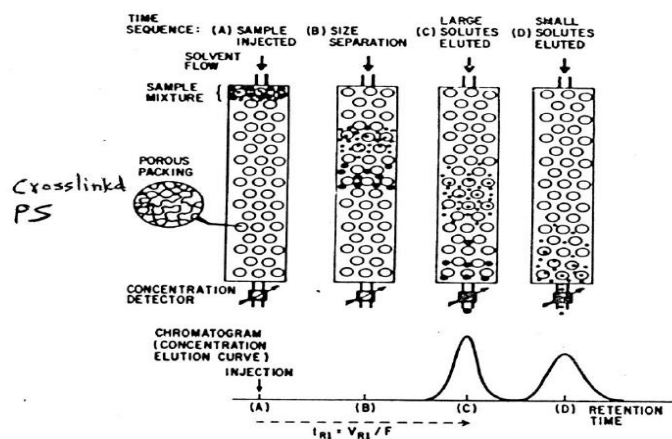


รูปที่ 2.5 หลอดแก้วรูปตัวยูสำหรับวัดความหนืด (Ubbelohde viscometer)

2.3.2 เจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (Gel Permeation Chromatography, GPC)

เจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ โดยใช้หลักการเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในสารละลาย จะเกิดการพองตัวของสายโซ่อิสระ (random coil) ที่ส่งผลต่อขนาดที่ต่างกัน ปริมาณไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic volume) ที่เกิดจากการพองตัวของพอลิเมอร์แปรผันตามน้ำหนักโมเลกุล และเมื่อสารละลายพอลิเมอร์ไหลผ่านคอลัมน์ที่ภายในบรรจุสารที่มีลักษณะเป็นรูพรุน เช่น เม็ดอนุภาคเชื่อมขวาง (Crosslink)

ของพอลิस्टาไร์ที่มีรูพรุน พบว่าพอลิเมอร์ที่มีขนาดของสายโซ่อิสระหรือปริมาณไฮโดรไดนามิกต่างกัน จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และไหลออกจากคอลัมน์ในเวลาที่ไม่เท่ากัน โดยพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่จะออกมาได้เร็วกว่า เนื่องจากไม่สามารถแทรกเข้าไปตามรูพรุนของสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้ ในขณะที่พอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็กกว่าจะไหลผ่านออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า เนื่องจากโมเลกุลมีขนาดเล็กพอที่สามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้จึงใช้เวลานานกว่าสรุปได้ว่าเทคนิคจีพีซี เป็นเทคนิคที่แยกพอลิเมอร์ตามขนาด ดังนั้นจึงอาจเรียกชื่อเทคนิคนี้ว่า “Size Exclusion Chromatography (SEC)” สารละลายพอลิเมอร์ที่ไหลออกจากคอลัมน์ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จึงมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากัน ซึ่งเมื่อทำการวัดปริมาณของสารละลายพอลิเมอร์ที่ไหลออกในช่วงเวลาต่าง ๆ กันโดยใช้เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิดต่าง ๆ เช่นตัวตรวจวัดด้วยยูวี (UV detector) หรือตัวตรวจวัดแบบดัชนีสะท้อนแสง (Reflective Index detector, RI) และสามารถเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสาร (Retention volume) กับเวลาที่ไหลออกจากคอลัมน์ (retention time) ซึ่งกราฟดังกล่าวจะเรียกว่า “จีพีซี โครมาโตแกรม (GPC chromatogram)” และมีลักษณะดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ตัวอย่างของ GPC โครมาโตแกรมที่เกิดจากการไหลผ่านคอลัมน์ของพอลิเมอร์ที่มีขนาดต่างๆ ภายใต้อัตราการไหล (F) โดยมีแกนนอน (x-axis) เป็น retention time (T_{Rt})

[26]

ในบางกรณีค่าเวลา retention time ในจีพีซี โครมาโตแกรม (GPC chromatogram) สามารถแทนด้วย retention volume ได้ ซึ่งค่าทั้งสองสามารถเทียบกลับไปมาได้ดังสมการ (2.13)

$$T_{Rt} = \frac{V_{Rt}}{F} \quad (2.13)$$

เมื่อ T_{Rt} คือ เวลาของสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ (Retention Time) หน่วยวินาที

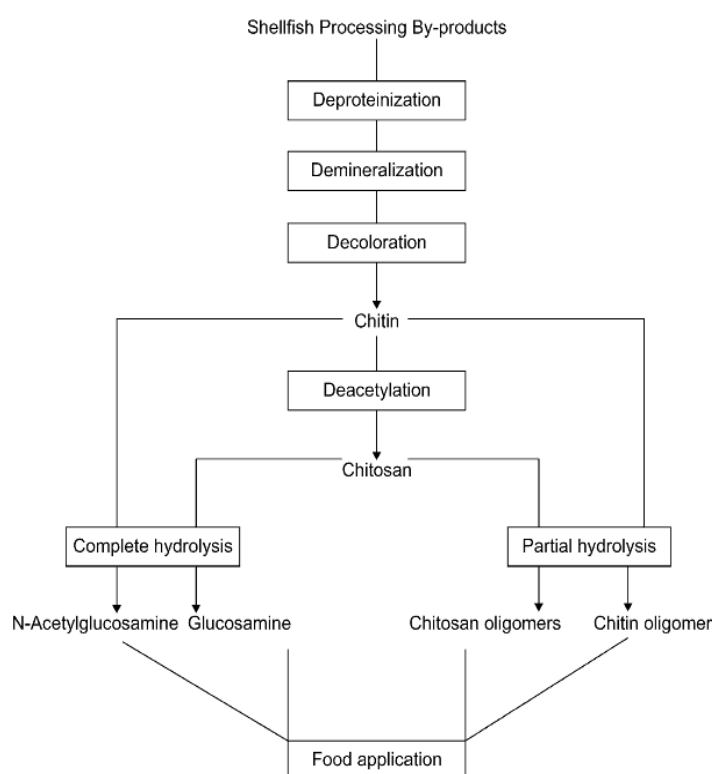
V_{Rt} คือ ปริมาณของสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ (Retention Volume) หน่วยมิลลิลิตร

F คือ อัตราการไหลของสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ หน่วยมิลลิลิตรต่อวินาที

โดยปกติแล้วอัตราการไหลที่ใช้อยู่ที่ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อวินาที นอกจากนั้นสังเกตเห็นได้ว่าจีพีซีโครมาโตแกรม (GPC Chromatogram) ที่ได้อาจไม่มีลักษณะเป็นพีคเดี่ยวๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าสารพอลิเมอร์ตัวอย่างที่วิเคราะห์นั้นมีความกว้างของการกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุลหรือมีค่า polydispersity Index (PDI) มากน้อยเพียงใด การวิเคราะห์ผลข้อมูลดิบที่ได้จากเครื่องตรวจวัดของเครื่องจีพีซี คือ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของไหลที่ผ่านคอลัมน์กับปริมาณสารหรือความเข้มข้นของสัญญาณที่ไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งจากกราฟดังกล่าวอาจมีการเปลี่ยนแปลงเวลาการไหลของสารไปเป็นปริมาณสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ โดยใช้ค่าอัตราการไหลมาคำนวณ หลังจากนั้นการเปลี่ยนปริมาณสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ เป็นน้ำหนักโมเลกุลโดยอาศัยกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์มาตรฐาน กับค่าปริมาณของสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ (Retention volume) ในสภาวะเดียวกัน สารมาตรฐานที่ใช้ได้มาจากการผลิตที่ทำการสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนและมี PDI เท่ากับ 1 ดังนั้นจึงมักเรียกวิธีการเทียบมาตรฐานแบบนี้ว่า “Narrow Molecular Weight Calibration” ซึ่งควรเลือกสารมาตรฐานที่เป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกันกับสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ แต่ในบางครั้งสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์อาจไม่ตรงกับสารมาตรฐานที่ผู้ผลิตทำออกขายได้ ในกรณีหลังนี้อาจมีปัญหาเนื่องจาก เมื่อทำการเทียบมาตรฐานแล้ว อาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งอาจมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับสารมาตรฐาน อาจมีขนาดของสายโซ่อิสระหรือปริมาณไฮโดรโดนามิกที่ต่างไปจากสารมาตรฐานได้ ซึ่งเมื่อทำการทดลองแล้วได้ค่าเวลาของสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ ที่ต่างกันและเมื่อนำเอาค่าที่ได้ของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารมาตรฐานที่เป็นพอลิเมอร์ต่างชนิด ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไป [26]

2.4 การลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

ไคโตซานเป็นสารที่สังเคราะห์ได้จากธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษ จึงได้มีการนำไปใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์ อาหาร และเครื่องสำอาง แต่ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง ($M_w \sim 10^6$ ดาลตัน ขึ้นไป) มีข้อจำกัดในด้านการละลาย และมีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลที่ต่ำ [28] จึงส่งผลให้ต้องละลายไคโตซานในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดต่างค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปไคโตซานที่จำหน่ายทางการค้าจะมีความเข้มข้นมีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลอยู่ในช่วงร้อยละ 50 – 90 [28] โดยงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าที่น้ำหนักโมเลกุล $10^3 - 10^4$ ดาลตัน สามารถละลายได้ที่ค่าพีเอชเป็นกลางเข้าใกล้ 7.0 [29] ดังนั้นจึงมีความต้องการที่จะลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ให้กลายเป็นไคโตซานโมเลกุลสายสั้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการละลายในสภาวะที่พีเอชใกล้เคียงความเป็นกลางยิ่งขึ้น รูปที่ 2.7 แสดงขั้นตอนการผลิตน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน (depolymerization) ให้เป็นไคโตซานสายสั้น (chitooligomer) ด้วยกระบวนการเกิดไฮโดรไลซิส มีด้วยกันหลายวิธี เช่น ทางเคมี ทางเคมีร่วมกับความร้อน และการใช้เอนไซม์ เป็นต้น [11]

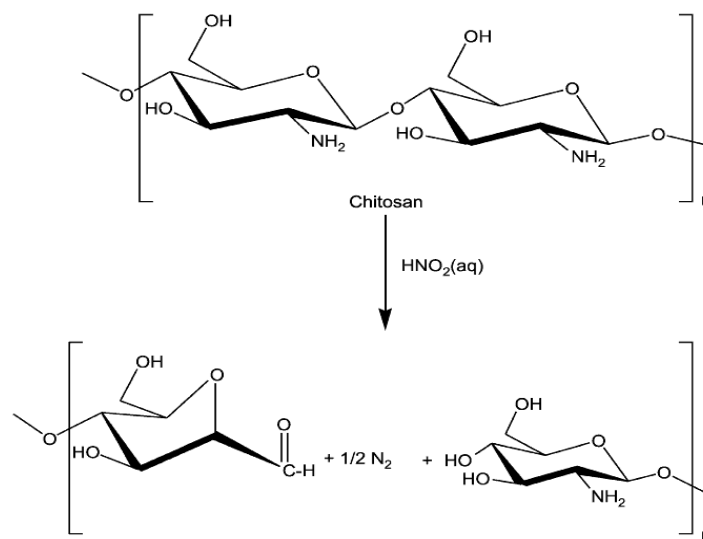


รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการผลิตไคโตซานสายสั้น

2.4.1 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทางเคมี (Chemical hydrolysis) และปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสทางเคมีรวมกับความร้อน

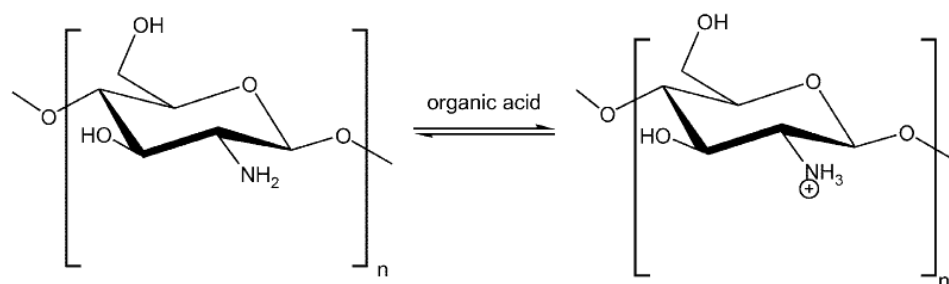
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทางเคมี เกิดในสภาวะที่เป็นกรด ต่าง หรือออกซิเดชัน กรดที่ใช้ในการเกิดไฮโดรไลซิสส่วนมากเป็น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดฟอสฟอริก ดังรูปที่ 2.8 และ 2.9 เป็นต้น [12]



รูปที่ 2.8 การเกิดไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดไนตริก

[11]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

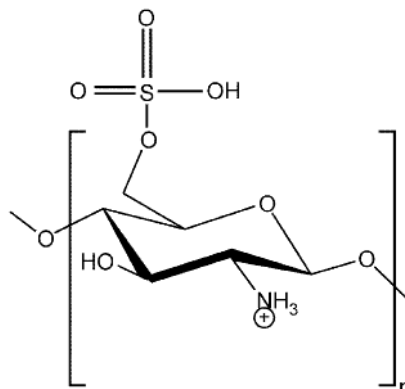


รูปที่ 2.9 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดอินทรีย์

[11]

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานโดยใช้โซเดียมไนเตรต (NaNO_2) ทำให้ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุลที่สั้นลงโดยที่โครงสร้างของไคโตซานไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งการใช้กรด

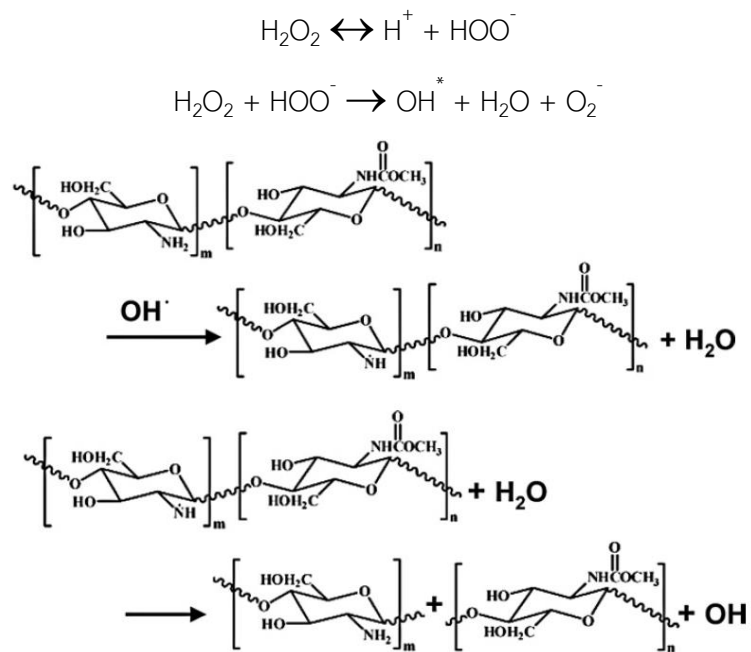
รุนแรงอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานได้ [11] เช่น การใช้กรดคลอโรซัลฟอนิก ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2. 10 โครงสร้างของไคโตซานหลังจากทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรซัลฟอนิก

[11]

ถ้ามีการปรับสภาวะโดยให้ความร้อนร่วมกับการเกิดปฏิกิริยาเกิดไฮโดรไลซิสทางเคมี ซึ่งช่วยลดปริมาณความเข้มข้นของกรดที่ใช้ H.K. No และคณะ (2001) [29] ได้ศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อน อุณหภูมิ และตัวทำละลาย ในการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน พบว่าการดอะซิทริกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นระยะเวลา 15 นาที และเมื่อปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มเป็น 30 และ 60 นาที พบว่าสามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานได้ถึงร้อยละ 46-51 และ 55-60 ตามลำดับ และพบว่าอุณหภูมิ ระยะเวลาในการให้ความร้อน และชนิดของตัวทำละลาย ส่งผลต่อการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน จากนั้นคณะผู้วิจัยได้มีการเปลี่ยนมาใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน โดยใช้ความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานได้ร้อยละ 83 ที่สภาวะเดียวกับการใช้กรดอะซิทริก จากงานวิจัยของ Feng Tian และคณะ(2004) [7] ได้ทำการศึกษาการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานด้วยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มจาก 0.5 ถึง 2.0 โมลาร์ และใช้อุณหภูมิเริ่มจาก 25 ถึง 70 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาในการทดลองเป็น 1-3 ชั่วโมง เมื่อทดลองพบว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อุณหภูมิ และรวมถึงระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลอย่างสูง เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะแตกตัวให้อนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical : OH^{*}) ซึ่งไปทำปฏิกิริยาตัดสายโซ่ของไคโตซานให้สั้นลงตามปฏิกิริยาที่แสดงดังรูปที่ 2.11

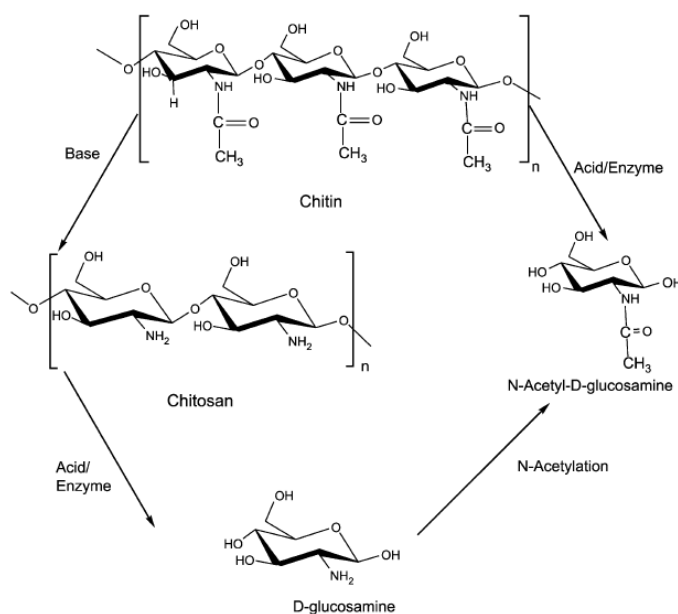


รูปที่ 2. 11 ปฏิกริยาของการลดโมเลกุลของโคโตซานด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

[8]

และมีงานวิจัยที่กล่าวถึงการทำให้โคโตซานเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว โดยการใช้เทคนิคพลาสมา ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สารเคมีที่ต่ำ เพราะมีการยิงพลาสมาไปที่ออกซิเจนและทำให้ออกซิเจนแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระแล้วไปทำปฏิกิริยาตัดกับสายโซ่โคโตซานทำให้สายโซ่นั้นสั้นลง [8] แต่วิธีพลาสมานี้มีข้อจำกัดในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีต้นทุนสูง

2.4.2 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)



รูปที่ 2.12 การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับกรด

[11]

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยการใช้เอนไซม์ (รูปที่ 2.12) เกิดจากการที่จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายสายโซ่ของไคโตซาน โดยเอนไซม์มีชื่อว่า ไคโตซานเนส (*chitosanases*) มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างได้ เช่น ไคโตซานเนส ที่ผลิตจาก *Penicillium islandicum* สามารถทำการย่อยสลายไคโตซานที่มีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติกเท่ากับร้อยละ 30 ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เอนไซม์ไคโตซานเนสที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp. nr 7-M* สามารถย่อยสลายไคโตซานได้เป็น ไคโตไตรโอส (*chitotriose*) และ ไคโตเตตระโอส (*chitotetraose*) เป็นต้น และไคโตซานสามารถย่อยสลายได้ด้วยเชื้อรา เช่น *Aspergillus sp. Y2K* ที่สามารถพบได้ตามดิน ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไคโตซานเนสได้เช่นกัน หรืออาจเป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตจาก *Bacillus cereus NTU-FC-4* ผลิตโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบเยื่อ (*membrane reactor*) ได้เป็น ไคโตไตรโอส (*chitotriose*) ไคโตเตตระโอส (*chitotetraose*) ไคโตเพนตะโอส (*chitopentaose*) และ ไคโตเฮกซะโอส (*chitohexaose*) นอกจากนี้เอนไซม์ไคโตซานเนสแล้วยังมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคโตซานได้ เช่น ปาเปน (*papain*) เพปซิน (*pepsin*) และโปรเนส (*pronase*) ซึ่งมีผู้วิจัยว่าเอนไซม์ปาเปน สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลไคโตซานได้ถึง $4.1 \times 10^3 - 5.6 \times 10^3$ ดาลตัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 3.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์เพปซินสามารถลดน้ำหนักโมเลกุลไคโตซานได้ถึง $4.1 \times 10^5 - 1.0 \times 10^4$ ดาลตัน ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง

5 ชั่วโมง [31] และเอนไซม์ โพรเนสสามารถลดน้ำหนักโมเลกุลไคโตซานได้ถึง $8.5 \times 10^3 - 9.0 \times 10^3$ ดาลตัน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 3.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ในกลุ่ม เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ไลโซซาม (lysozyme) เพกทีเนส (pectinase), และ เอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) โดยตารางที่ 2.2 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

ตารางที่ 2. 2 งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

งานวิจัย	กระบวนการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน	ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุล			
		ระยะเวลาในการให้ความร้อน (นาที)	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_w) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_w) (ดาลตัน)	ร้อยละการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน
Hong Kyoon No และคณะ (2001) [29]	ละลายไคโตซานด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำมาให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นระยะเวลา 15-60 นาที	60	1.60×10^6	6.00×10^5	62.5
			1.10×10^6	4.19×10^5	61.9
			7.89×10^6	3.13×10^5	96.0
Hong Kyoon No และคณะ (2001) [29]	ลดน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้ไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 - 1.0 โดยปริมาณ ผสมกับสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำมาให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 พีเอสไอ เป็นระยะเวลา 15 นาที	ร้อยละของความเข้มข้นของ H_2O_2	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_w) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_w) (ดาลตัน)	ร้อยละการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน
		0.1	1.10×10^6	3.39×10^5	69.2
		0.25		2.90×10^5	73.6
		0.5		2.85×10^5	74.1
1.0	1.94×10^5	82.4			

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

งานวิจัย	กระบวนการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน	ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุล			
		สภาวะที่เหมาะสม	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_v) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_v) (ดาลตัน)	ร้อยละการลดลงน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน
Feng Tian และคณะ (2004) [7]	ละลายไคโตซานน้ำหนัก 2 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 0.5 จากนั้นเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.5 – 2.0 โมลาร์ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 25 – 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง	ความเข้มข้นของ H_2O_2 2.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 °C ระยะเวลา 4 ชม.	2.17×10^5	1.1×10^4	94.9
		เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายกรดอะซิติกร้อยละ 1 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างเพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นเติมเอนไซม์ในอัตราส่วน 100:1 w/w โดยเอนไซม์ที่ใช้คือ เปปซิน ปาเปน และโพเรนส ที่อุณหภูมิ 27 °C จากนั้นตกตะกอนกลับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นาน 1-5 ชั่วโมง	ชนิดของเอนไซม์	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_w) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_w) (ดาลตัน)
A.B. Vishu Kumar และคณะ (2004) [31]		เปปซิน	7.10×10^4	4.6×10^3 - 1.0×10^4	85.7 - 93.5
		ปาเปน		4.1×10^3 - 5.6×10^3	92.1- 93.5
		โพเรนส		8.5×10^3 - 9.5×10^3	86.6 - 88.0

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

งานวิจัย	กระบวนการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน	ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุล			
		ระยะเวลาในการให้พลาสมา	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_w) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_w) (ดาลตัน)	ร้อยละการลดลงน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน
I. Prasertsung และคณะ (2012) [32]	นำไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ มากกรอง แล้วนำมาให้พลาสมา ที่ความถี่ 15 กิโลเฮิรท์ ความต่างศักย์ 1.6 กิโลโวลต์ และ 2 ไมโครซีเมนต์ ที่อุณหภูมิ 25 – 30 °ซ นาน 0-300 นาที จากนั้นนำกลับไคโตซาน	30	2.1×10^5	6.2×10^4	69.5
		60		5.6×10^4	73.3
		180		2.9×10^4	86.2
		300		3.2×10^4	84.8
Nguyen Quoc Hien และคณะ (2012) [32]	นำไคโตซานหนัก 5 กรัมละลายในกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำมาให้รังสีแกมมา 1.33 kGy ต่อชั่วโมง จนถึง 16 kGy ที่อุณหภูมิห้อง	รังสีแกมมา (kGy)	น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (M_w) (ดาลตัน)	น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ (M_w) (ดาลตัน)	ร้อยละการลดลงน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน
		4	9.05×10^5	8.60×10^4	90.5
		8		5.60×10^4	93.8
16	2.70×10^4	97.0			

2.5 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน (Antimicrobial properties)

ไคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากไคโตซานเมื่ออยู่ในสารละลายจะเกิดการจับโปรตอนจากตัวทำละลาย และทำให้สายโซ่ของไคโตซานแสดงประจุบวก [1] ดังนั้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก ไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถก่อตัวเป็นฟิล์มล้อมเซลล์ แล้วจะทำให้สารอาหารไม่สามารถเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ เนื่องจากผนังเซลล์เป็นบวกเหมือนกัน จึงให้เซลล์ตาย และเมื่อพิจารณาแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานต่ำ ลงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี เนื่องจากประจุบวกของไคโตซาน ซึ่งตรงข้ามกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียและขณะเดียวกันเมื่อโมเลกุลขนาดต่ำสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ง่ายเมื่อผนังเซลล์นั้นถูกทำลาย จึงเข้าไปรบกวนเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรียและทำให้เซลล์ตายในที่สุด จึงสรุปได้ว่ากระบวนการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไคโตซานนั้นมี 2 กระบวนการด้วยกันคือ

- 1) ไคโตซานสามารถเกาะตัวเป็นพื้นผิวที่ผนังของเซลล์คล้ายกับเป็นเยื่อพอลิเมอร์ ที่ป้องกันการเข้าของสารอาหารเพื่อนำไปเลี้ยงเซลล์
- 2) ไคโตซานที่ขนาดโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปภายในโมเลกุลของเซลล์ได้และไปรบกวนระบบเผาผลาญอาหารของเซลล์และส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด [34]

จากงานวิจัยจำนวนมากซึ่งมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานเพื่อให้มีการใช้งานได้หลากหลายมากขึ้น พบว่าไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้แตกต่างกัน โดยมีข้อมูลสรุปดังตารางที่ 2.4 และนอกจากน้ำหนักโมเลกุลแล้วยังมีผลของร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติลด้วย พบว่าไคโตซานที่มีค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตซานที่มีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลที่ต่ำ [35]

ตารางที่ 2.3 งานวิจัยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานด้วยน้ำหนักร้อยละแตกต่างกัน

งานวิจัย	ชนิดของแบคทีเรีย	ร้อยละในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซาน			
		น้ำหนักร้อยละของโคโตซาน (Mw) (ตาลตัน)			
		6.85x10 ⁵	1.0 x10 ⁴	5.0 x10 ³	1.0 x 10 ³
You-Jin Jeon และ คณะ (2001) [36]	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682	> 99 ± 0	98 ± 0	62 ± 6	51 ± 7
	<i>Escherichia coli</i> O-157 ATCC 11775	> 99 ± 0	71 ± 3	56 ± 4	60 ± 2
	<i>Salmonella typhi</i> KCTC 2424	> 99 ± 0	91 ± 3	88 ± 0	89 ± 0
	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> KCTC 1750	68 ± 3	47 ± 5	35 ± 5	22 ± 8
	แบคทีเรียแกรมบวก				
	<i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> KCTC 3065	100 ± 0	100 ± 0	99 ± 0	99 ± 0
	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i> KCTC 10240	> 99 ± 0	70 ± 0	67 ± 3	63 ± 7
	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 6538P	100 ± 0	97 ± 0	95 ± 0	93 ± 9
	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> KCTC 1917	> 99 ± 0	82 ± 0	57 ± 3	23 ± 1
	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1028	98 ± 2	63 ± 5	60 ± 5	63 ± 7

หมายเหตุ ; โคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และบ่มกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 32 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) งานวิจัยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานด้วยน้ำหนักร้อยละแตกต่างกัน

งานวิจัย	ชนิดของแบคทีเรีย	ร้อยละในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซาน					
		น้ำหนักร้อยละของโคโตซาน (Mw) (กิโลตาลตัน)					
Hong Kyoon Noและ คณะ (2002) [33]	แบคทีเรียแกรมลบ	22	10	7.0	4.0	2.0	1.0
	<i>Escherichia coli</i>	13.6	15.3	30.3	31.0	31.9	32.4
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12.0	18.3	54.5	30.7	29.9	56.6
	<i>Salmonella typhimurium</i>	21.8	26.8	29.5	29.3	31.3	39.2
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20.7	28.9	30.8	28.0	34.6	27.3
	แบคทีเรียแกรมบวก						
	<i>Listeria monocytogenes</i>	15.9	33.4	44.9	41.7	53.5	38.9
	<i>Bacillus megaterium</i>	52.8	43.5	45.4	43.5	26.1	41.1
	<i>B. cereus</i>	20.2	23.3	42.3	23.1	38.7	23.3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	22.1	26.1	48.3	52.6	53.4	40.6
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	9.2	38.2	33.2	39.7	38.2	20.8
	<i>L. brevis</i>	29.6	15.0	20.2	34.3	43.6	24.7
	<i>L. bulgaricus</i>	10.0	29.6	31.7	34.0	31.4	19.6

หมายเหตุ ; โคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร และบ่มกับเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2. 4 งานวิจัยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานด้วยน้ำหนักรวมของแบคทีเรียที่ต่างกันแต่ความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียต่างกัน

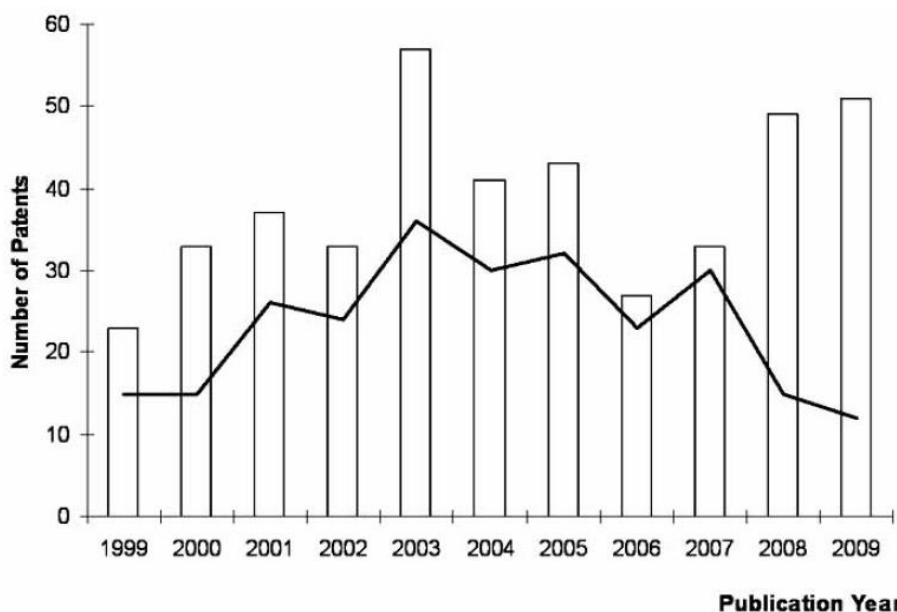
งานวิจัย	ชนิดของแบคทีเรีย	ร้อยละในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซาน				
S. Chaiyakosa และคณะ (2001) [34]	แบคทีเรียแกรมลบ <i>Vibrio parahae molyticus</i>	ระยะเวลาที่โคโตซานสัมผัสเชื้อ (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล (M_w) 1.61×10^5 ดาลตัน (พีพีเอ็ม)			
			250	500	1000	2000
		10	63.0 ± 3.2	65.3 ± 4.9	77.7 ± 3.8	81.2 ± 1.8
		30	72.6 ± 2.0	78.3 ± 1.6	96.4 ± 0.1	96.7 ± 0.5
A. Anas และคณะ (2005) [35]	แบคทีเรียแกรมลบ <i>V. cholerae</i>	ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล (M_w) 1.80×10^5 ดาลตัน (ร้อยละ)				
		0.25	0.50			
	<i>V. cholerae</i>	55.7 ± 30.8	75.5 ± 23			
	<i>V. parahaemolyticus</i>	39.2 ± 26.3	50.2 ± 25.8			
	<i>V. mediterranei</i>	51.1 ± 27.2	63.7 ± 26.7			
	<i>V. nereis</i>	63.6 ± 20.7	73.1 ± 13.9			
	<i>V. proteolyticus</i>	59 ± 36.3	65.2 ± 27.2			
	<i>V. splendidus</i>	26.2 ± 9.8	29.3 ± 2.8			
	<i>V. vulnificus</i>	46 ± 41.2	63 ± 29.3			
<i>V. alginolyticus</i>	21.9 ± 19.8	29.2 ± 16.1				

จากตารางที่ 2.3 แสดงงานวิจัยของ You-jin Jeon และคณะ พบว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงมากกว่า 10^4 ดาลตัน เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดี แต่โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10^4 ดาลตัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจะลดลง [36] และมีผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hong Kyoon No และคณะ [33] ซึ่งพบว่าโคโตซาน

ที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $4.70 \times 10^5 - 7.46 \times 10^5$ ดาลตันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลที่ $1.11 \times 10^6 - 1.67 \times 10^6$ ดาลตัน แต่เมื่อพิจารณาโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10^4 ดาลตัน ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย จะมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น และโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ นั้นมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานสูงขึ้น ซึ่งมีจากงานวิจัยของ You-jin Jeon และคณะ ได้ผลิตโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3.0×10^3 ดาลตัน พบว่าโคโตซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 – 0.1 หลังจากทำการบ่มไว้เป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง [37] จึงเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโคโตซานนั้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และจากงานวิจัยของ S. Chaiyakosa และคณะ [38] และ A. Anas และคณะ (2005) [39] ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโคโตซาน ในกรดอะซิติก และปรับพีเอช 5.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานสูงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีดังแสดงในตารางที่ 2.4

2.6 สิทธิบัตรของโคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหาร

ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาโคโตซานเป็นที่ยอมรับและนำมาใช้กับอาหารมากขึ้น ซึ่งตามรูปที่ 2.13 ได้แสดงปริมาณของจำนวนสิทธิบัตรในช่วงปี 1999 ถึง 2009 โดยเป็นการสำรวจจากงานวิจัยวารสาร และหนังสือ เป็นต้น ซึ่งในช่วงปี 2003 เป็นช่วงที่ปริมาณของสิทธิบัตรมากที่สุด และตามด้วยปี 2008 และ 2009 ตามลำดับ



รูปที่ 2. 13 จำนวนสิทธิบัตรของไคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้กับอาหารในช่วงปี 1999 – 2009 [38]

ไคโตซานมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) และต่อต้านเชื้อรา (antifungal) ได้ดี เนื่องจากผลิตมาจากธรรมชาติจึงไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเมื่อนำมาใช้ในอาหาร โดยกระบวนการในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานนั้น เนื่องจากหมู่เอมีนที่เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน จะแสดงประจุเป็นบวกเมื่ออยู่ในสารละลายไคโตซาน และเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์รั่วออกสู่ภายนอก ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด ดังนั้นเมื่อปริมาณของการกำจัดหมู่อะซิติล หรือร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติล สูงจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สูง [39] และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานนั้นก็ยังมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5

ไคโตซานจึงถูกใช้งานเป็นสารละลายในอุตสาหกรรมอาหารสด ไคโตซานสามารถนำมาทำฟิล์มและสารเคลือบเพื่อทำการยืดอายุอาหารสดและอาหารที่ผ่านการปรุงสุกแล้ว และยังสามารถนำมายืดอายุอาหารจำพวกเนื้อและอาหารทะเล ซึ่งการสังเคราะห์ฟิล์มส่วนมากนั้น ทำโดยนำไคโตซานมาละลายด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก หรือ กรดแลกติก เป็นต้น จากนั้นทำการขึ้นรูปแบบฟิล์มหรือใช้เป็นสารละลายแล้วนำไปเคลือบอาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำไคโตซานไปรวมกับสารเคลือบที่ใช้อยู่แล้ว เช่น คานูบาแว็กซ์ (carnauba wax) โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate) ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2. 5 ตัวอย่างสิทธิบัตรและงานวิจัย การของไคโตซานที่นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหาร

สิทธิบัตร (Patent)	เป้าหมายของสิทธิบัตร
Antimicrobial Effect Of Chitosan in Beverages [2]	การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์เครื่องดื่ม (packaged beverage) ซึ่งใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 6.0×10^3 ดาลตัน ความเข้มข้น 0.1-200 พีพีเอ็ม ใช้ร่วมกับ sodium benzoate, potassium sorbate และ EDTA ที่พีเอช น้อยกว่า 4 ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และรา ได้เหลือน้อยกว่า 1 ซีเอฟยูต่อมิลลิตรภายในระยะเวลาน้อยกว่า 8 สัปดาห์ ซึ่งความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ในช่วง 1-200 พีพีเอ็ม
Chitosan-Base Antimicrobial Thermoplastic Polymer Blends [4]	การนำไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 7.5×10^5 ดาลตัน ที่ร้อยละการกำจัดหุอะซีติล 95 มาทำการผสมกับพอลิเมอร์ ที่มีหมู่ฟังก์ชันของอะมิโน ยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>Salmonella choleraesuis</i> , ATCC 9239 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร ในระยะเวลา 8 ชั่วโมง
สารเคลือบผิวที่มีคุณสมบัติป้องกันและกำจัดโรคเน่าของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว และกรรมวิธีการผลิต [40]	สารเคลือบผิวที่มีไคโตซานความเข้มข้นในช่วงความเข้มข้น 0.3-2 กรัม ในกรดซิตริกและมียีสต์ <i>Pichia tannicola</i> สายพันธุ์ 5035 เป็นองค์ประกอบ และมีคุณสมบัติในการลดการสูญเสียน้ำหนักและยืดอายุผลผลิต ตลอดจนมีคุณสมบัติในการป้องกันและกำจัดโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว
การใช้กราฟต์โคพอลิเมอร์ของไคโตซานและแคทไอออนิกพอลิเมอร์ที่มีหมู่เกลือควอเตอร์นารีแอมโมเนียมเพื่อการใช้งานด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เกี่ยวข้องกับ งานทางด้านทางการแพทย์และทางด้านอุตสาหกรรมทั่วไป โดยการเตรียมกราฟต์โคพอลิเมอร์ ใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของมอนอเมอร์ที่มีหมู่เกลือควอเตอร์นารีแอมโมเนียมพร้อมเติมไคโตซาน ในปฏิกิริยา โดยไคโตซานที่ใช้ในการเตรียมกราฟต์โคพอลิเมอร์ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยในช่วง 2.0×10^3 ถึง 1.0×10^6 ดาลตัน และร้อยละการกำจัดหุอะซีติล ในช่วง 75 ถึง 99	

2.7 การจำแนกชนิดแบคทีเรียและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ และยาฆ่าเชื้อที่ใช้ในอาหารทะเล [42]

2.7.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การจำแนกแบคทีเรีย ตามสมบัติในการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) ซึ่งใช้ในการศึกษาลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 ประเภทได้แก่

- **แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria)** เป็นแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสีคริสตัล ไวโอเลต(crystal violet) แล้วติดสีม่วง แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. cereus*, *C. botulinum*, *Staphylococcus*

- **แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria)** เป็นแบคทีเรียที่ย้อมด้วยสีแซฟรานิน (safranin) แล้วติดสีแดง แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter*, *E.coli*

2.7.2 ปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- **อุณหภูมิ (Temperature)** แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิหนึ่ง ส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียส แต่มีบางกลุ่มสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและมีบางกลุ่มเจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 0 -15 องศา

- **เวลา (Time)** แบคทีเรียใช้เวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย ชนิดของอาหารที่ใช้ และปัจจัยอื่นๆ การอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและใช้เวลาที่ในการเจริญเติบโตสั้นลง

- **อากาศ (Oxygen)** แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการอากาศที่แตกต่างกัน เราสามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจนได้ดังนี้

- 1 **แอโรบิก (Aerobic)** เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สร้างพลังงานโดยกระบวนการหายใจ (respiration) ซึ่งเป็นการสร้างพลังงานโดยใช้ออกซิเจน

- 2 **เฟคัลเททีฟ แอโรบิก (Facultative anaerobes)** เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างพลังงานได้จากกระบวนการหายใจ และยังสามารถสร้างพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation)

3 แอนนาโรบิก (Anaerobic) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต จึงไม่สามารถเติบโตในสภาพอากาศปกติได้ บางพวกอาจทนต่อสภาพที่มีออกซิเจนในระดับต่ำๆได้ (tolerant anaerobes) แต่บางพวกไม่สามารถทนต่อออกซิเจนได้เลย จุลินทรีย์เหล่านี้ตายเมื่อถูกออกซิเจน

4 ไมโครแอโรฟิลิก (Microaerophilic) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เป็นพวกต้องการออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยในการเติบโต แต่ไม่สามารถทนต่อสภาพที่มีออกซิเจนได้ในระดับปกติ

- **พีเอช** สภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงค่าพีเอช 6 – 8 อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่ทนต่อกรด (acid-tolerant bacteria) และบางกลุ่มที่ทนต่อด่าง (alkaline-tolerant bacteria) โดยทั่วไปแบคทีเรียจะเจริญในช่วงค่าพีเอช เป็นต่าง (ค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 7) ได้ดีกว่า ช่วงค่าพีเอชเป็นกรด (ค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 7) แต่ก็มีแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น Sulfur bacteria ที่เจริญได้โดยใช้กรด sulfuria เป็นแหล่งพลังงาน

- **ความชื้นในอาหาร** ปริมาณน้ำในอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยมีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (water activity, a_w) เป็นค่าที่แสดงปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้

- **สารอาหาร** เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับแบคทีเรีย แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดเมื่อได้รับสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งจะแตกต่างกันไปตามความต้องการอาหาร ของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ

- **ความเข้มข้นของเกลือ** แบคทีเรียหลายชนิดสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือมากน้อยต่างกัน เกลือจะช่วยให้แบคทีเรียบางกลุ่มเจริญเติบโตได้ดี แต่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมากๆ จะทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

2.7.3 แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเล

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคนั้นจะมาจากการปนเปื้อนจากแหล่งวัตถุดิบหรือมาจากระหว่างกระบวนการผลิต ตัวอย่างแบคทีเรียที่พบส่วนมาก เช่น ครอสตริเดียม (*Clostridium*) สปีชีส์ *C. botulinum* สแตฟฟีโลคอคคัส (*Staphylococcus*) วิกิริโอ คลอเลอรา (*Vibrio cholerae*) สายพันธุ์ V1 หรือ V139 หรือ วิกิริโอ พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*) เป็นต้น ตารางที่ 2.6 แสดงชนิดของแบคทีเรียและปริมาณที่พบในอาหารทะเล

ตารางที่ 2. 6 แสดงชนิดของแบคทีเรียและปริมาณที่พบในอาหารทะเล

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่พบเบื้องต้น	ปริมาณเชื้อ
<i>Clostridium botulinum</i> - Non-proteolytic type B,E,F	พบในแหล่งน้ำทั่วไป และในซากของสัตว์น้ำที่ตาย	พบในปริมาณต่ำ (co.1 spore /g fish) but up to 5.3 spore/g fish
<i>Pathogenic Vibrio spp.</i> <i>v. cholerae</i> <i>v. parahaemolyticus</i> <i>v. vulnificus</i> other vibrios	แพร่หลายในอบอุ่น (> 15 องศาเซลเซียส) และสภาพแวดล้อมของน้ำทะเล	พบมากถึง 10^2 - 10^3 cfu/g ในหอย และพบมากถึง 10^4 - 10^8 cfu/g ในลำไส้ของปลาที่กินหอยที่มีเชื้อ
<i>Aeromonas spp.</i>	พบในแหล่งน้ำ	พบในปริมาณที่ต่ำ, แต่ไม่ถึง 10^4 cfu/ml ในน้ำทะเล และ 10^7 cfu/ml ในน้ำเสียและ 10^6 cfu/g ในอาหารทะเล
<i>Plesimonas shigellodies</i>	สภาวะแวดล้อมในน้ำอุ่นและปลาน้ำจืด (สัตว์)	-

[ที่มา:Hans Henrik Huss(1994)]

1. **ครอสทริเดียม (*Clostridium*)** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนและเจริญได้ดีที่สุดในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีหลายสปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ได้แก่ *C. botulinum* และ *C. perfringens* ซึ่ง *C. botulinum* สามารถสร้างสปอร์ที่ทำให้มีชีวิตรอดได้ในขณะปรุงอาหาร แต่สารพิษที่ผลิตโดย *C. botulinum* จะไม่ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สามารถทำลายสารพิษชนิด A ได้ใน 6 นาที ส่วนสปอร์ ค่อนข้างทนความร้อน โดยทั่วไปความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 360 นาทีสามารถทำลายสปอร์ของ *C. botulinum* ได้หมด การเจริญของ *C. botulinum* เกิดขึ้นหลังจากที่ผ่านกระบวนการสเตอริไลส์ (sterilised) ซึ่งไม่มีการให้ความร้อนอย่างเพียงพอที่จะทำลายสารพิษ และเป็นการยากที่จะทำลายสปอร์ของ *C. botulinum* ทั้งหมดลงได้

2. **วibriโอ คอเรลา (*Vibrio cholerae*)** เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Negative Gram) เจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน รูปร่างเป็นท่อนขนาด 1.4-2.6 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.14) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แส้ที่เป็นขั้ว (polar flagellum) ช่วยในการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์ ใช้ระบบเมตาบอลิซึมเป็นแบบหมัก (fermentative metabolism) สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีทั้งการเติมร้อยละ 1 โซเดียมคลอไรด์และไม่เติม จึงแตกต่างจากวibriโอ (*Vibrio spp.*) สายพันธุ์อื่นสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่เป็นเบสค่าความเป็นกรดต่าง 9.0-9.6 แต่เจริญเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นกรด



รูปที่ 2. 14 แบคทีเรีย *Vibrio cholerae*

[ที่มา; <http://microbeonline.com>]

แหล่งที่พบเชื้อ ได้แก่ตามเขตน้กร่อย บริเวณปากแม่น้ำที่ติดทะเล พบได้ในน้ำจืด และอาหารทะเล จำพวกกุ้ง หอย ปู เป็นต้น โดยเชื้อ vibrio ครอบคลุม สายพันธุ์ O1 และ O139 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ ถ้าเชื้อเจริญเติบโตในลำไส้ของคน ซึ่งก่อให้เกิดโรคระบาดตามมา อาจมีสาเหตุมาจากมีการปนเปื้อนจากอุจจาระหรือสิ่งสกปรก

3. vibrio พาราฮีโมไลติคัส (*Vibrio parahaemolyticus*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนโค้ง เพิ่มจำนวนได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 5-44 องศาเซลเซียส แต่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโตและมักพบในอาหารทะเล

2.7.4 สารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง

ยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรีย ที่ใช้กันในปัจจุบันนั้นสามารถแบ่งได้ตามระดับการทำลายเชื้อ แบ่งได้ 3 ระดับคือ [43]

ระดับที่ 1 การทำลายเชื้อระดับสูง น้ำยาฆ่าเชื้อระดับสูงนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า คีโมสเตอร์ริแลนต์ (Chemosterilant) สารเคมีกลุ่มนี้ใช้สำหรับเครื่องมือแพทย์ที่ต้องนำเข้าสู่ร่างกาย น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีคุณสมบัติการทำลายเชื้อระดับสูงนี้ที่รู้จักกันดีได้แก่ คลอรีนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เปอร์อะซิติก เอซิด และ กลูตารัลดีไฮด์ น้ำยาเคมีเหล่านี้เป็นทั้งน้ำยาที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (คือทำให้เชื้อตายหมด)และเป็นน้ำยาทำลายเชื้อ (คือทำให้เชื้อบางส่วนตาย)

ระดับที่ 2 การทำลายเชื้อระดับกลาง น้ำยาที่ฆ่าเชื้อพวกแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 60-90 ซึ่งอาจเป็นเอทานอลหรือไอโซโพรพานอลก็ได้ นอกจากนี้ยังมีสารที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (อย่างเช่น เดทตอล) พวกที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ หรือพวก ไอโดฟออร์ (idophor) น้ำยาฆ่าเชื้อระดับกลางนี้แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไวรัสได้ดี แต่ก็ยังไม่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้ทุกชนิด

ระดับที่ 3 การทำลายเชื้อระดับต่ำ เป็นการทำลายจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย ไวรัส และราบางชนิด แต่ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่มีความคงทนอย่างพวก tubercle bacilli หรือพวกสปอร์ของแบคทีเรียได้ น้ำยาฆ่าเชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ สารประกอบควอเทอร์นารี แอมโมเนียม (quaternary ammonium compound) สารเคมีกลุ่มนี้ใช้ทั่วไปในน้ำยาทำความสะอาด หลายประเภท (ถ้าสังเกตฉลากผลิตภัณฑ์ซักล้างจะพบว่ามีส่วนผสมของสารตัวนี้) นอกจากนี้พวก ไอโดฟออร์และพวก

สารประกอบฟีนอล เป็นทั้งสารเคมีที่อยู่ในประเภทการทำลายระดับกลางและระดับต่ำ ซึ่งการแสดงฤทธิ์การทำลายจะอยู่ในระดับใดนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้

- **ยาฆ่าเชื้อที่เป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมอาหารประกอบด้วย 3 หลักคือ [43]**

1. **คลอรีน** เป็นยาฆ่าเชื้อที่มีการใช้กันมากที่สุด อาจอยู่ในรูปสารประกอบ คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) คลอรีนน้ำ (NaClO) และคลอรีนผง ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) โดยจะมีการใช้งานที่แตกต่างกันไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้เกือบทุกชนิด และราคาไม่แพงมาก ซึ่งจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15 – 24 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอยู่ในน้ำร้อนประสิทธิภาพการทำงานจะลดลง และความเข้มข้นที่ใช้ได้อยู่ในช่วง 50 – 100 พีพีเอ็ม ถ้าสูงอาจทำให้ลักษณะของอาหารเปลี่ยนไป

2. **ควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium; QUAT, QAC)** เป็นยาฆ่าเชื้ออยู่ในรูปของสารประกอบที่เจือจาง ไร้กลิ่น ไร้สี ยาฆ่าเชื้อชนิดนี้จะทำตัวเป็นฟิล์มยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และมีประสิทธิภาพมากกว่าคลอรีนเมื่อใช้กับอินทรีวัตถุ และเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียทั่วไปบางชนิด และความเข้มข้นตามคำแนะนำของผู้ผลิต

3. **ไอโอดีนและไอโอดิฟอร์ม** เป็นสารฆ่าเชื้อที่ทำปฏิกิริยาเร็วและใช้ได้ผลกับแบคทีเรียทุกชนิด สารประกอบไอโอดีนไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้ผิวหนังระคายเคือง และคงตัว แต่สารละลายไอโอดิฟอร์มอาจทำให้พื้นผิวเป็นรูและพลาสติกบางชนิดเกิดรอยได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 12.5 – 25 พีพีเอ็ม [44]

2.7.5 กระบวนการผลิตกึ่งสดแช่แข็ง

การล้างในน้ำที่สะอาดและเย็นจัดที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลง น้ำที่ใช้ในโรงงานควรเป็นน้ำที่สะอาด สำหรับน้ำที่ใช้ล้างโต๊ะภาชนะต่างๆ ควรมีคลอรีน 50 - 100 พีพีเอ็ม และน้ำแข็งที่ใช้ควรสะอาดด้วยเช่นกัน ภาชนะที่ใช้ในการล้างกึ่งควรเป็นพลาสติกหรือโลหะเคลือบสแตนเลสเพื่อสะดวกในการทำความสะอาด ควรเด็ดหัวกุ้งออกเพราะเป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์อย่างมาก ควรทำบนโต๊ะที่สะอาด เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อน และกุ้งที่เด็ดหัวแล้วต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่อย่างสม่ำเสมอ (0 องศาเซลเซียส) เพื่อชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแก่ผู้บริโภคและสำหรับกุ้งต้มแช่เยือกแข็ง เมื่อต้ม

เสร็จต้องทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในน้ำที่เย็นและสะอาดและจากนั้นนำเข้าแช่เยือกแข็งทันที เมื่อแช่แข็งแล้วกึ่งต้องเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิต่ำกว่าและควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 70 เพราะถ้าความชื้นสัมพัทธ์ไม่เหมาะสมจะเกิดปัญหาน้ำระเหยออกจากตัวกึ่งง่ายขึ้น และผลิตภัณฑ์บรรจุกึ่งควรใช้พลาสติกที่มีคุณภาพดีหรือกล่องกระดาษที่เคลือบแว็กซ์ เพื่อป้องกันการระเหยและป้องกันปัญหาการหืน (Rancidity) ด้วย [45]

2.7.6 มาตรฐานการตรวจสอบเชื้อไวรัส คอเลรา ของผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ

การวิเคราะห์เชื้อไวรัส คอเลรา (*Vibrio cholera*) โดยใช้สารละลายแอลคาไลน์ แปปโตน (Alkaline Peptone Water ;APW) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (enrichment medium) จากนั้นทำการแยกเลี้ยงเชื้อโดยเชื้อสารละลายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เฉพาะเชื้อไวรัส คอเลรา คือ Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS) Agar ถ้าเป็นเชื้อไวรัส คอเลราจะปรากฏลักษณะ สีเหลืองขุ่นตรงกลาง ใสรอบนอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นเลือกโคโลนีมาเลี้ยงบนจานอาหาร Tryptic (trypticase) Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 – 24 ชั่วโมง เพื่อให้บริสุทธิ์ และถ่ายเชื้ออีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาเท่าเดิม จากนั้นแยกเชื้อที่มีลักษณะดังกล่าวมาทำการตรวจสอบทางชีวเคมี เพื่อยืนยันผลว่าเป็นเชื้อไวรัส คอเลรา โดยมีการตรวจสอบด้วยกัน 5 วิธี [46]

1. **Arginine glucose slant (AGS)** ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียว จากเชื้อที่เตรียมไว้ และจากนั้น streak ลงบน slant จากนั้นแทงลงในสวน butt ให้ถึงก้นหลอด ปิดฝาไม่แน่นมาก จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าหากเป็นเชื้อไวรัส คอเลรา จะปรากฏสีม่วงและ butt สีเหลืองเล็กน้อย ไม่สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

2. **การทดสอบการเจริญในน้ำเกลือ** ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียว จากเชื้อที่เตรียมไว้ นำมาลงในหลอด Tryptone broth (T_1N_0) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ หลอด Tryptone broth (T_1N_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีโซเดียมโครอไรด์ร้อยละ 3 ซึ่ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 เป็นระยะเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ถ้าหากเป็นเชื้อไวรัส คอเลราจะเจริญเติบโตได้ดีในหลอดทั้งสองชนิดนี้

3. **String test** ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียว จากเชื้อที่เตรียมไว้ และนำมาวางไว้บนสไลด์สะอาดหยด sodium desoxycholate ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ลงไป 1 หยด ภายในเวลา 1 นาที

ถ้าหากเป็นไวรัสโ คลอกเลรา เซลล์จะแตกตัวและดีเอ็นเอ จะออกมานอกเซลล์ เมื่อใช้ loop กวนเชื้อ แล้วยก loop ขึ้นเหนียวคล้ายยาง มีความสูงได้ 2-3 มิลลิเมตร

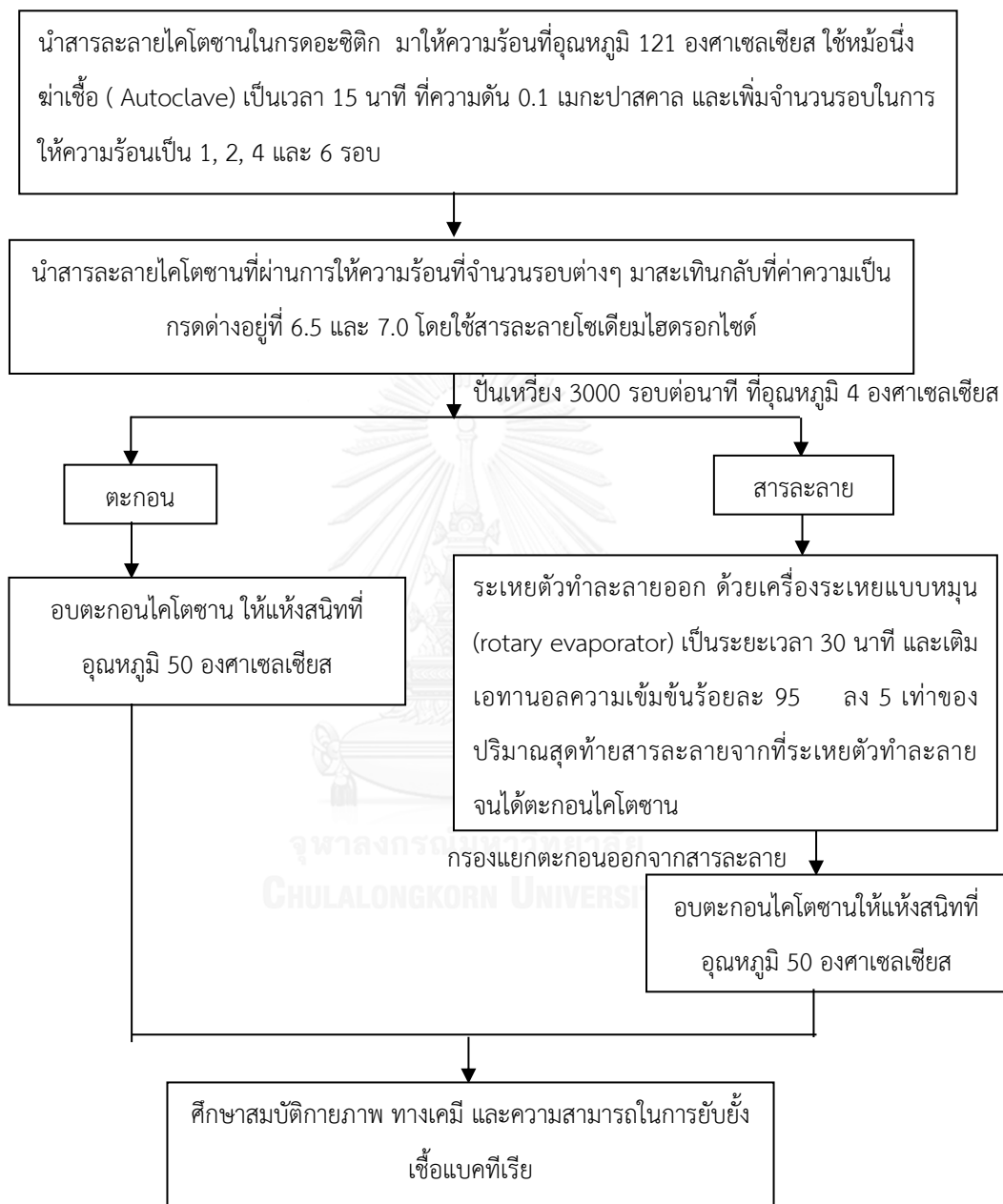
4. Oxidase reaction ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดียว จากเชื้อที่เตรียมไว้ จากนั้นใช้แพลตตินัม loop หรือไม้จิ้มฟันป้ายลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลาย N,N,N,N-Tetramethyl-p-Phenylenediamine dihydrochloride ความเข้มข้นร้อยละ 1 ถ้าหากเป็นเชื้อไวรัสโ คลอกเลรา จะทำให้กระดาษกรองเปลี่ยนเป็นสีม่วงภายใน 10 วินาที

5. การทดสอบการตกตะกอน กับ antiserum หากทราบว่าเป็นเชื้อไวรัสโ คลอกเลราแล้ว จะตรวจสอบว่าเป็น Serotype ไต ทำการทดสอบดังนี้

- นำเชื้อที่เตรียมไว้มาเขี่ยลงบน สไลด์ที่มี TSA ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้นหยดน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 กวนให้เข้ากัน จากนั้นสังเกตการตกตะกอน ถ้าหากเป็นเชื้อ ต้องไม่พบตะกอนในน้ำเกลือ
- ทดสอบเชื้อไวรัสโ คลอกเลรา ว่าเป็นชนิด Serotype แบบ O1 หรือ O139 นำเชื้อที่เตรียมไว้มาเขี่ยลงบน สไลด์ที่มี TSA ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 จากนั้นหยด polyvalent *V. cholerae* O1 Antiserum ลงไป 1 หยด ถ้าเป็นเชื้อไวรัสโ คลอกเลรา O1 จะตะกอนภายใน 1 วินาที ถ้าทดลองว่าเป็นเชื้อไวรัสโ คลอกเลรา O139 ให้หยด polyvalent *V. cholerae* O139 จะเกิดตะกอนขึ้นภายใน 1 วินาที [46, 47]

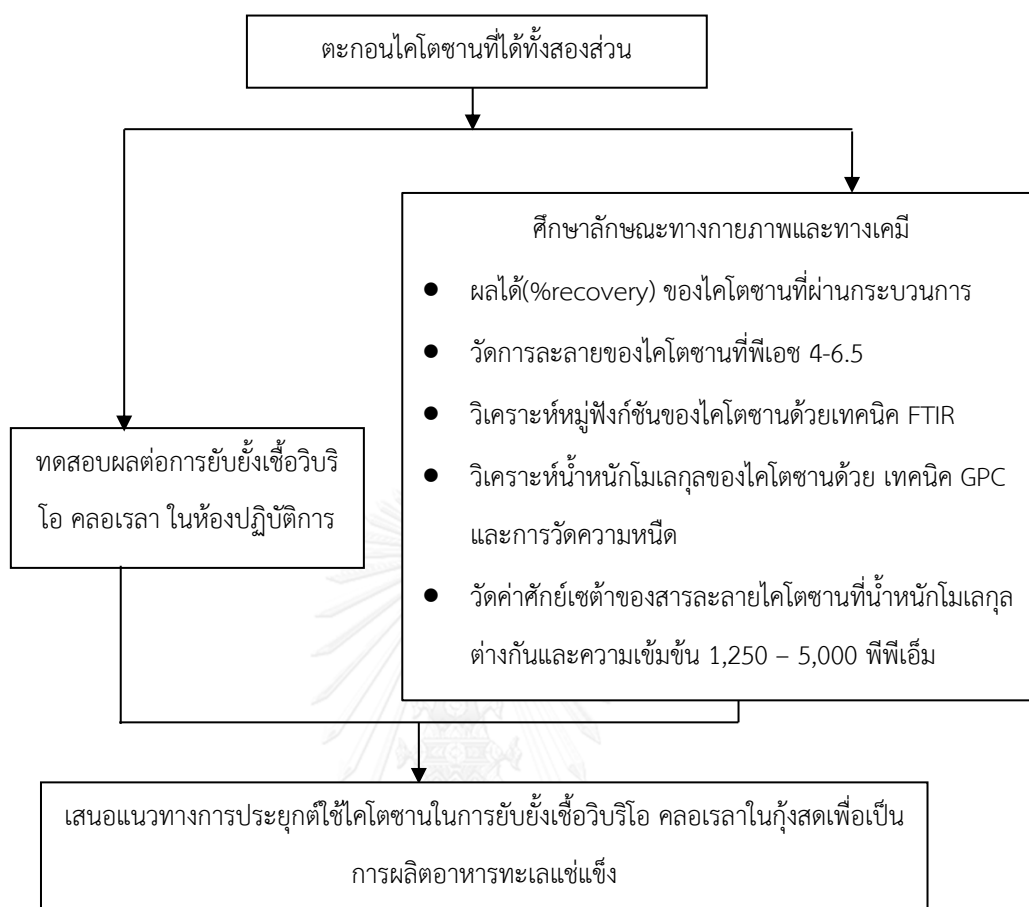
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 3. 1 แผนผังการทำวิจัย

3.2 แผนผังการศึกษาสมบัติของไคโตซาน



รูปที่ 3. 2 แผนผังการศึกษาสมบัติของไคโตซาน

3.3 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. โคโคซานจากเปลือกกุ้ง (น้ำหนักโมเลกุล (M_w) 3.26×10^5 และ 1.18×10^6 ดาลตัน) จาก บริษัท มารีนไบโอ รีซอสเซส จำกัด
2. กรดอะซิติก (Ajax Finechem, Australia)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Ajax Finechem, Australia)
5. โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
6. เอทานอลความเข้มข้น 95.0% (Merk-chemical , Germany)
7. กระดาษกรองเบอร์ 4 ยี่ห้อ Whatman qualitative filter paper จาก Whatman, Germany
8. น้ำก่่าจัดประจุ (DI water) รุ่น Easy pure II จาก Thermo scientific, Germany
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Auto-Clave) ยี่ห้อ TOMMY, USA
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง ยี่ห้อ Metter Toledo, USA
11. เครื่องกวนสาร IKA , Germany
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง Kubota Laboratory centrifuge ,Japan
13. ตู้อบให้ความร้อน (Memert Co, Ltd ,USA)
14. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (Perkin Elmer Spectrum GX NIR FT-Raman,USA)
15. หลอดแก้วรูปยู (Ubbelohde viscometer) ยี่ห้อ Cannon (Cannon Instrument company, USA)

3.4 ขั้นตอนในการทำวิจัย

3.4.1 การลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานด้วยความร้อน

โคโตซาน (M_w 1.18×10^6 , 3.25×10^5 , และ 2.8×10^4 ดาลตัน ค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล 5.57, 7.46 และ 2.72) มาทำละลายในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0-2.0 โดยน้ำหนัก [Hong Kyoon No และคณะ 2001] และนำสารละลายมาให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 0.1 เมกะปาสคาล ระยะเวลา 15 นาที โดยเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อนเป็น 1, 2, 4 และ 6 รอบ จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วมาสะเทินกลับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 6.5 และ 7.0 จากนั้น สารละลายโคโตซาน จะเกิดการแยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่ตกตะกอนลงมาและส่วนที่ยังอยู่ในสารละลาย จากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองแยกตะกอนออกจากสารละลาย และล้างตะกอนด้วยน้ำปราศจากประจุหลายๆ รอบเพื่อล้างเกลือ และอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โคโตซานที่ละลายที่พีเอช 6.5 และ 7.0 ถูกนำกลับโดยนำสารละลายมาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังเติมเอทานอล (ความเข้มข้นร้อยละ 95) 5 เท่าของปริมาณสุดท้ายสารละลายจากที่ระเหยตัวทำละลาย จนได้ตะกอนโคโตซานออกมาจากนั้นกรอง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิทเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยมีชื่อสูตรของกลุ่มตัวอย่างตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 กลุ่มตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ

โคโตซานน้ำหนักโมเลกุล (M_w) (ดาลตัน)	พีเอชการ สะเทินกลับ	รอบให้ความร้อน (15 นาที x รอบ)	สูตร
1.18×10^6	6.5	0	A0
		1	A1
		2	A2
		4	A3
		6	A4
3.25×10^5		0	B0
		1	B1
		2	B2
		4	B3
		6	B4
1.18×10^6	7.0	1	C1
		2	C2
		4	C3
		6	C4
3.25×10^5		1	D1
		2	D2
		4	D3
		6	D4

3.5 วิเคราะห์การทดลอง

3.5.1 ทดสอบการละลายของโคโตซาน

การละลายของโคโตซานถูกทดสอบที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 5.5 และ 6.0 โดยตัวทำละลายเป็นกรดอะซิติก โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยโซเดียมโบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จากนั้นนำมาทำลายโคโตซาน โดยมีความเข้มข้นของสารละลายเป็นร้อยละ 1.0 โดยมวล จากนั้นกวนทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองที่ทำกรซังน้ำหนักแล้ว

(W_p) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีไคโตซาน อยู่มาชั่งน้ำหนัก (W_s) แล้วคิดเป็นร้อยละการละลายตามสมการที่ (2.1)

$$\% \text{ soluble of chitosan} = [(W_s - W_p) / W_{cs}] \times 100\% \quad (3.1)$$

โดยที่

W_s คือ น้ำหนักของไคโตซานรวมกับกระดาษกรอง หน่วย กรัม

W_p คือ น้ำหนักของกระดาษกรอง หน่วย กรัม

W_{cs} คือ น้ำหนักเริ่มต้นของไคโตซาน หน่วย กรัม

3.5.2 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไคโตซาน

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไคโตซานด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) ด้วยโหมด KBr ในช่วงความยาวคลื่น 400-4000 เซนติเมตร⁻¹ และคำนวณหา ร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติกจากสูตร (2.3) [25] ตัวอย่างการคำนวณตามภาค ผนวก. จ.

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133DA \quad (3.2)$$

$$\%DD = 100 - \%DA \quad (3.3)$$

โดยที่

$\%DA$ คือ ร้อยละของการมีอยู่ของหมู่อะซิติก (degree of acetylation) ในโครงสร้างของไคโตซาน

$\%DD$ คือ ร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) ในโครงสร้างของไคโตซาน

A_{1320} คือ ตำแหน่งของการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1320 เซนติเมตร ของ Amide-III

A_{1420} คือ ตำแหน่งของการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1420 เซนติเมตร ของ CH_2 bending

3.5.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อน ด้วยเทคนิคเจลเพอร์มีเอชัน โครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography, GPC) โดยทำการละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คอลัมน์เป็นอัลตราไฮโดรเจล (Ultrahydrogel linear) ที่วัดน้ำหนักโมเลกุล (M_w) ในช่วง $1.0 \times 10^3 - 2.0 \times 10^7$ ดาลตัน ตัวเทียบมาตรฐานที่ใช้เป็นพุลูลาน (Pullulans) น้ำหนักโมเลกุล (M_w) ในช่วง $5.9 \times 10^3 - 7.08 \times 10^5$ ดาลตัน ตัวตรวจวัดแบบการดัชนีสะท้อนแสง (Refractive Index Detector) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (National Metal and Material Technology

Center, MTEC) อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับค่าหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการวัดความหนืดด้วย Ubbelohde viscometer ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายโคโตะซานในสารละลายกรดอะซิติก 0.25 โมลาร์และโซเดียมอะซิเตรท 0.25 โมลาร์ ใช้วัดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตะซานที่ โดยเตรียมความเข้มข้นแตกต่างกัน จากนั้นจับเวลาและทำการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตะซานตามสมการที่ (2.4), (2.5), (2.6), (2.7) และ (2.8)

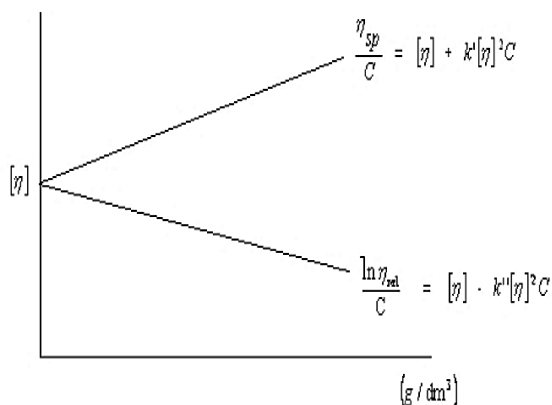
$$\eta_1/\eta_0 = (t)_1/(t)_0 \quad (3.4)$$

$$(\eta_1 - \eta_0)/\eta_0 = \eta_r - 1 = \eta_{sp} \quad (3.5)$$

$$\eta = [\eta] + k'[\eta]^2 \quad (3.6)$$

$$\ln(\eta_r)/C = [\eta] - k''[\eta]^2 \quad (3.7)$$

จากนั้นนำสมการที่ (3.6) และ (3.7) ที่ได้มาสร้างกราฟ เพื่อหาค่าความหนืดในตัวที่ความเข้มข้นเข้าใกล้ศูนย์ตามรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 กราฟในการหาค่าความหนืดในตัว (intrinsic viscosity)

สูตรคำนวณน้ำหนักโมเลกุลตาม Mark-Houwink

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad (3.8)$$

โดยที่

t_1 คือ เวลาของการไหลของสารละลายโคโตะซาน (นาท)

t_2 คือ เวลาของการไหลของตัวทำละลายบริสุทธิ์ (นาท)

C คือ ความเข้มข้นของโคโตะซาน (กรัมต่อเดซิลิตร)

η_r คือ ความหนืดลดทอน (reduced viscosity)

η_{sp} คือ ความหนืดจำเพาะ (specific viscosity)

$[\eta]$ คือ ความหนืดในตัว (intrinsic viscosity)

K เท่ากับ 1.4×10^{-4} เดซิลิตรต่อกรัม และ a เท่ากับ 0.83 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของ
โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 10^6 ดาลตัน

K เท่ากับ 7.6×10^{-4} เดซิลิตรต่อกรัม และ a เท่ากับ 0.76 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของ
โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 10^5 ดาลตัน [7]

3.5.4 ทดสอบค่าศักย์เซต้า (zeta potential) ของสารละลายโคโตซาน

ค่าศักย์เซต้า คือความแตกต่างของค่าศักย์ไฟฟ้าระหว่างบริเวณพื้นผิวของอนุภาคโคโตซาน
กับชั้นของสารละลาย ซึ่งเตรียมเป็นสารละลายในการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholera*) ที่
ความเข้มข้นร้อยละ 0.125 0.250 และ 0.50 โดยน้ำหนัก ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตรท โดยตรวจ
ด้วยเครื่อง Zetasizer ที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย [48]

3.5.5 วัตสี

วัตสีของโคโตซาน นำผงโคโตซานใส่ลงในฐานใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำการวัดสีโดยใช้เครื่องวัดสี
ที่ยิงลำแสงไปยังตัวอย่าง ซึ่งใช้ระบบ $L^* a^* b^*$ color space ในการประมวลผล โดย L^* แสดงความ
มืดและสว่างโดยที่สว่างน้อยจะให้ค่าใกล้ 0 แต่ถ้าสว่างมากจะให้ค่าใกล้ 100 a^* จะแสดงความเป็นสี
แดงหรือเขียวโดยถ้าเป็นสีแดงจะมีค่าเป็นบวกมากแต่ถ้าเป็นสีเขียวจะให้ค่าเป็นลบ ส่วน b^* แสดง
ความเป็นสีน้ำเงินหรือสีเหลือง ถ้าแสดงค่าเป็นบวกจะความเป็นสีเหลือง แต่ถ้าเป็นสีน้ำเงินจะแสดงค่า
เป็นลบ[49]

3.6 ศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลรา (*Vibrio cholera*)

3.6.1 เตรียมสารละลายโคโตซาน

สารละลายโคโตซานที่ความเข้มข้น 1,250, 2,500 และ 5,000 พีพีเอ็ม (ร้อยละ 0.125, 0.25 และ 0.50 โดยน้ำหนัก) (รูปที่ 3.6) ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ถูกกวนผสม 4 ชั่วโมง จนละลายหมด (รูปที่ 3.4) จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ให้ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 5.5 – 6.0 และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณร้อยละ 1 โดยปริมาณของสารละลาย และกวนให้ละลายประมาณ 30 นาที จากนั้นนำสารละลายทุกความเข้มข้น มาทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งทางความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 15 นาที เมื่อครบระยะเวลา ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมทำการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholerae*)



รูปที่ 3. 4 สารละลายโคโตซานสูตรต่างๆสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์

3.6.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลราในห้องปฏิบัติการ

เทคนิคทดสอบการยับยั้งเชื้อตามมาตรฐาน ASTM E2149-10 [50] ซึ่งการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลราทั้งหมด ได้ส่งวิเคราะห์ที่คณะจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เตรียมเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholerae*) ที่ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เดิมในขวดรูปชมพู่ ตามจำนวนขวดตัวอย่างที่ทดสอบ ในปริมาณขวดละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโคโตซานตัวอย่างปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ในทุกขวดรูปชมพู่ที่เตรียมไว้ จากนั้นเขย่าเป็นระยะเวลา 20 นาที ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบระยะเวลา นำแต่ละตัวอย่างเป็นมาทำการเจือจางลดลงทีละ 10 เท่า จากนั้นดึงตัวอย่างแต่ละ

หลอดที่เจือจาง แล้วมาอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เชื้อ (Spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็น Tryptic soy agar (TAS) แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณเชื้อที่ลดลง

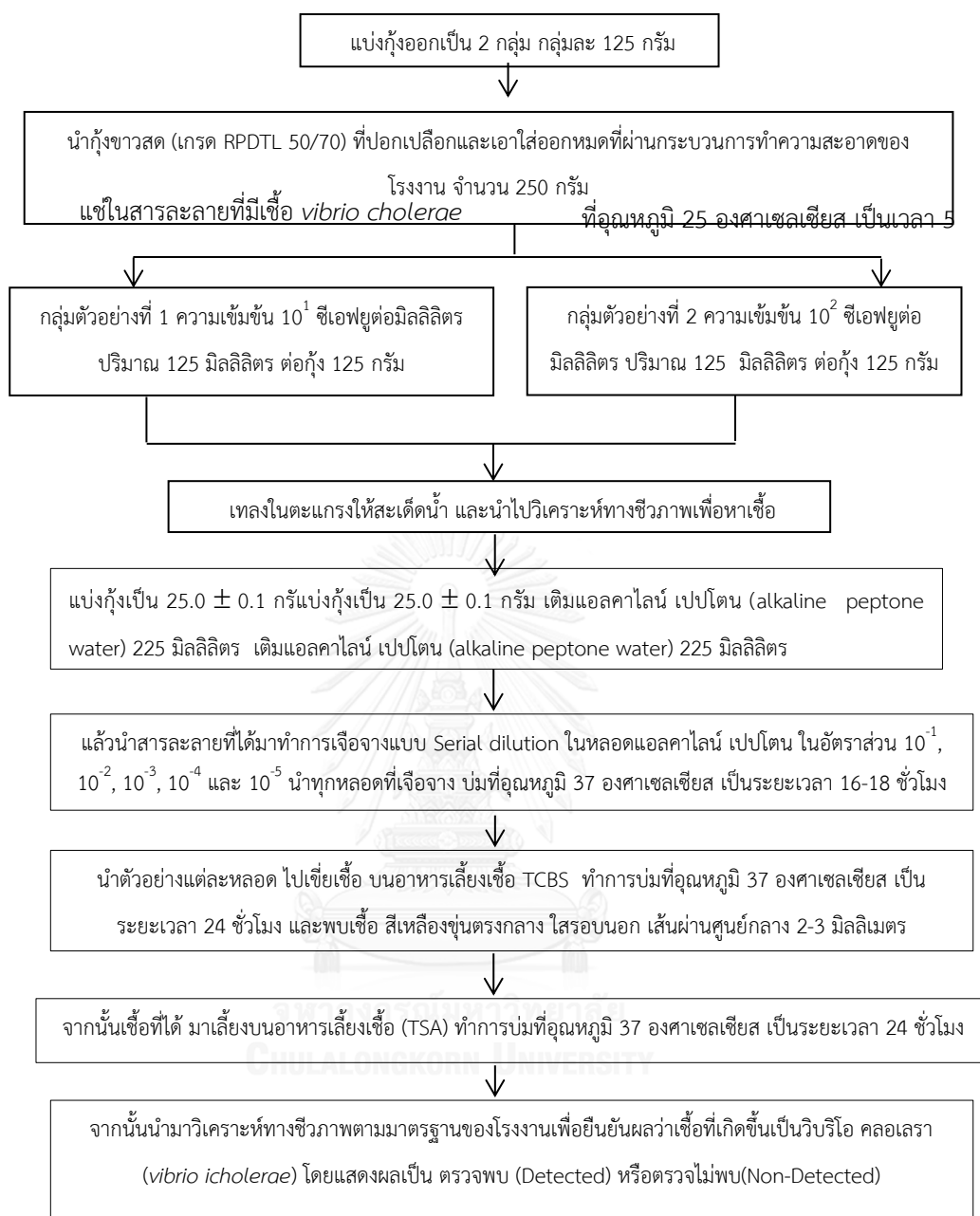
3.6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ vibrio คลอเลราในกุ้งสด

- การหาสภาวะความเข้มข้นของเชื้อ vibrio คลอเลรา เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเชื้อในกุ้งสด

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ vibrio คลอเลรา ในกุ้งสด ที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานของโรงงาน โดยคุณ ชื่นชนก แก้วรินทร์ เจ้าหน้าที่แผนกประกันคุณภาพ (Quality Assurance ; QA) เริ่มจากการหาสภาวะความเข้มข้นของเชื้อ vibrio คลอเลรา เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเชื้อในกุ้งสด เพื่อต้องการหาความเข้มข้นของเชื้อ vibrio คลอเลราต่ำสุด ที่สามารถตรวจพบได้ เนื่องจากมาตรฐาน Bacteriological Analytical Manual; BAM [46] ของโรงงานมีการตรวจวัดเชื้อและรายงานผลแบบ “พบ (+)” หรือ “ไม่พบ (+)” เท่านั้น โดยกุ้งขาวสดปอกเปลือกและหาง นำไส้ออก (เกรด Raw peeled and devined tail off Vannamei White shrimp; RPDTL) ขนาดของตัวกุ้งอยู่ที่ 50 – 70 มิลลิเมตร ที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อบรรจุและส่งออก ของโรงงาน มารีน โกลด์ โปรดักส์ ถูกนำไปแช่ในเชื้อ vibrio คลอเลรา ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^1 และ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร แช่กุ้งสด (รูปที่ 3.5) ที่เตรียมไว้ โดยใช้สัดส่วนของกุ้งสดต่อสารละลายเชื้อเป็น 25 ± 0.1 กรัม ของกุ้งสด ต่อ 25 มิลลิลิตร ของสารละลายเชื้อ เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้ววิเคราะห์หาเชื้อเริ่มต้นทันที แผนการทดสอบดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3. 5 กุ้งแช่ในสารละลายเชื้อ *vibrio cholera* ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร



หมายเหตุ; Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar

Typical (tripticase) Soy agar (TSA)

รูปที่ 3. 6 แผนผังการทดสอบหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนที่ทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยไคโตซาน

- **การยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คอลเลราในกุ้งสด ด้วยสารละลายไคโตซาน**

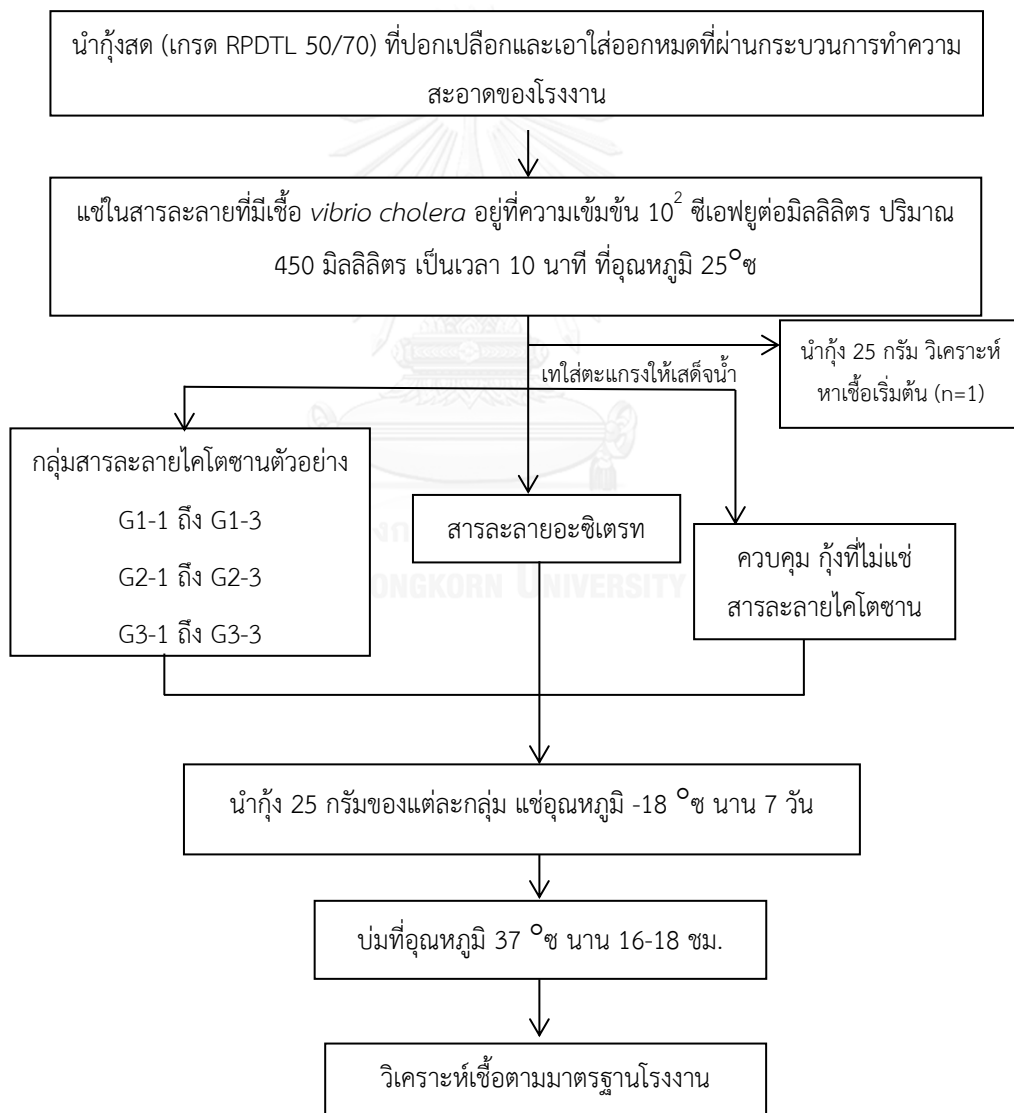
กุ้งขาวสดที่ถูกแช่ในสารละลายเชื้อไวรัสโอ คอลเลราที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^2 ซีเอฟยูต่อ มิลลิลิตร โดยใช้สัดส่วนของกุ้งสดต่อสารละลายเชื้อเป็น 25 ± 0.1 กรัม (กุ้งประมาณ 5 ตัว) ของกุ้ง สด ต่อ 25 มิลลิลิตร ของสารละลายเชื้อ โดยแช่เป็นระยะเวลา 5 นาที (รูปที่ 3.6) จากนั้นนำออกจาก สารละลาย พักในตะแกรงอลูมิเนียมให้สะเด็ดน้ำ นำกุ้งที่ปนเปื้อนเชื้อมาทำการแช่ในสารละลายไคโต ซานที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (สูตรควบคุม) ที่เตรียมไว้ โดยใช้สัดส่วน ของกุ้งสดต่อสารละลายไคโตซานเป็น 25 กรัม ต่อ 50 มิลลิลิตร โดยการแช่เป็นระยะเวลา 20 นาที (ที่ 3.7) จากนั้นเทใส่ตะแกรงให้สะเด็ดน้ำ แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกแล้วแช่แข็งเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน (รูปที่ 3.8) เมื่อครบระยะเวลาจึงนำออกมาวิเคราะห์หาเชื้อไวรัส โอ คอลเลรา ตามมาตรฐาน Bacteriological Analytical Manual; BAM [47] ซึ่งโรงงานใช้ในการ ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ โดยการทดลองนี้ได้ทำโดยเจ้าหน้าที่ของโรงงานมารีน โกลด์ โปรดัคส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร มีแผนผังการดำเนินงานแสดงดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3. 7 กุ้งติดเชื้อแช่ในสารละลายไคโตซาน และ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์



รูปที่ 3. 8 กู้บรรจุในถุงพลาสติก แห้งเย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3. 9 แผนผังการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอเลราในก๊วสด

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดสอบและความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบอโนวา (ANOVA) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Window version 14) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \geq 0.05$) [51] การทดลองทุกขั้นตอน มีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

3.8 สถานที่ทำงานวิจัย

- ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- โรงงานมารีน โกลด์ โปรดักส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของความร้อนต่อน้ำหนักโมเลกุลของโคโคซาน โดยสภาวะในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร [44] คือการอบในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 0.1 เมกะปาสคาล เป็นระยะเวลา 15 นาที ผลการศึกษาแบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

- 4.1 การศึกษาลักษณะของตัวอย่างโคโคซานเริ่มต้น
- 4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของโคโคซานหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน
 - 4.2.1) ร้อยละการได้กลับ
 - 4.2.2) การเปลี่ยนแปลงสี
 - 4.2.3) โครงสร้างทางเคมี
 - 4.2.4) น้ำหนักโมเลกุล
 - 4.2.5) ความสามารถในการละลายน้ำ
 - 4.2.6) ค่าศักย์ゼต้า
- 4.3 การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อไวรัสโคคลอเลรา (*Vibrio cholerae*) ของโคโคซาน
 - 4.3.1) ผลของสารละลายโคโคซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโคคลอเลรา ในกุ้งสด
 - 4.3.2) ผลของสารละลายโคโคซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโคคลอเลรา ในห้องปฏิบัติการ

4.1 การศึกษาลักษณะของตัวอย่างโคโตซานเริ่มต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยจากความหนืด (Viscosity-molecular weight average; M_v) ด้วยเทคนิคการวัดความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity), น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (Number average molecular weight; M_n), น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (Weight average molecular weight ; M_w) และค่าการกระจายตัว (Polydispersity index; PDI) ของน้ำหนักโมเลกุล ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography ; GPC) ทำโดยการส่งทดสอบที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี และร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of deacetylation ; % DD) วิเคราะห์จากการคำนวณค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ที่ได้จากเทคนิค FTIR

ผลการทดลองในตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะของโคโตซานเริ่มต้นที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (M_w) 11.8×10^5 และ 3.25×10^5 ดาลตัน (ใช้สัญลักษณ์ A0 และ B0 ตามลำดับ) ซึ่งมีค่า PDI 5.57 และ 7.46 และร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติล 83.9 และ 82.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของโคโตซานจากโรงงานมารินไบโอ รีซอสเซส จำกัด ที่ถูกวิเคราะห์ซ้ำโดยผู้วิจัย

ตัวอย่างโคโตซาน	น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน ⁵ ($\times 10^5$ ดาลตัน)			ค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล (PDI) ¹	ร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติล (%DD) ²
	M_w	M_v	M_n		
A0	11.8	11.99 ± 0.09	2.12	5.57	83.85 ± 0.04
B0	3.25	2.42 ± 0.01	0.44	7.46	82.38 ± 0.03

1 ค่าการกระจายตัวของโคโตซาน (PDI) = M_w/M_n

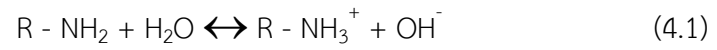
2 คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง จากเทคนิค FTIR (ดูสมการที่ 3.2 และ 3.3)

4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของไคโตซานหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน

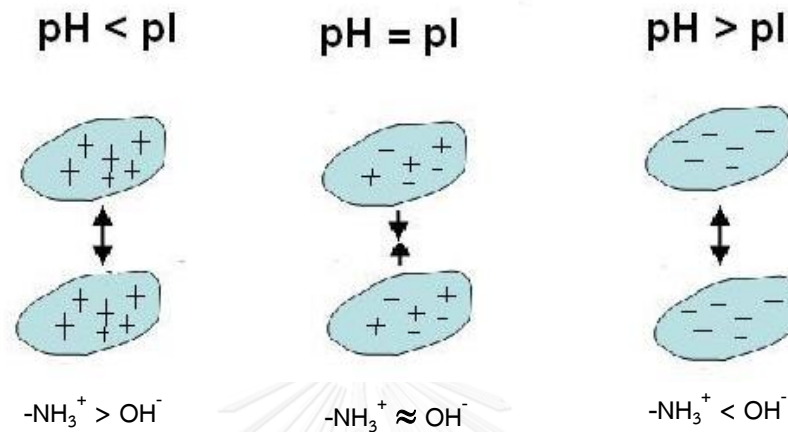
4.2.1) ร้อยละการได้กลับของไคโตซาน

สารละลายไคโตซานในกรดอะซิติก (พีเอช 2.0) ผ่านการให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่างๆ และทำการสะท้อนกลับที่ค่าพีเอช 6.5 และ 7.0 ได้ร้อยละการได้กลับของตะกอนไคโตซาน (percentage recovery of chitosan) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อสะท้อนกลับมาที่พีเอช 6.5 ไคโตซานสูตร A0-A4 มีตะกอนไคโตซานตกกลับมาสูงกว่าไคโตซานสูตร B0-B4 เนื่องจากไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีความสามารถในการละลายได้ดี จึงเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงกว่าที่น้ำหนักโมเลกุลสูง [13] และตกตะกอนได้ยากกว่า แต่เมื่อสะท้อนกลับที่พีเอชเท่ากับ 7.0 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไม่ส่งผลต่อปริมาณของตะกอนที่เกิดขึ้น เพราะปริมาณตะกอนไคโตซานที่ตกลงมานั้นมีปริมาณค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกัน โดยไคโตซานสูตร C0 – C4 และ D0 – D4 มีการตกตะกอนกลับร้อยละ 91.5 - 96.0 และ 89.8 – 96.3 ตามลำดับ

การสะท้อนสารละลายไคโตซานที่ผ่านความร้อน กลับที่พีเอช 6.5 ไคโตซานมีการตกตะกอนลงมาน้อยกว่าเมื่อสะท้อนกลับที่พีเอช 7.0 เนื่องจากไคโตซานละลายได้ที่พีเอชต่ำ เมื่อมีการสะท้อนกลับที่พีเอชสูงขึ้น จึงเกิดการตกตะกอน เพราะ OH^- ในสารละลายเข้าจับกับ $-\text{NH}_3^+$ ทำให้การแตกตัวลดลง (สมการที่ 4.1) และยิ่งพีเอชสูงขึ้นตะกอนจะตกลงมาได้มากขึ้น ซึ่งจุดที่ไคโตซานเริ่มตกตะกอนนั้นเรียกว่าจุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point; pI) เกิดจากการปรับพีเอช จนทำให้เกิดสมดุลทางประจุในสารละลาย (รูปที่ 4.1) ซึ่งค่า pI เป็นค่าเฉลี่ยของค่า pK_a [52] โดยในที่นี้ค่า pK_a คือค่าการแตกตัวของ $-\text{NH}_2$ เป็น $-\text{NH}_3^+$ จากรายงานของ Li-Ying Huang และคณะ (2013) สำหรับไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 2.15×10^5 ดาลตัน ร้อยละของการจำกัดหมู่อะซิติก 80 มีค่า pK_a ประมาณ 6.2 [53]



หมายเหตุ; R – แทนสายโซ่โมเลกุลของโคโคซาน



รูปที่ 4. 1 การเกิดจุดไอโซอิเล็กตริก (Isoelectric point; pI) ของโคโคซานในสารละลาย

ตารางที่ 4. 2 ร้อยละการได้กลับของไคโตซานหลังสะเทินกลับที่พีเอช 6.5 และ 7.0

สูตร	ตะกอนไคโตซาน ¹⁾ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ไคโตซานส่วนที่ละลายได้ ²⁾ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
สะเทินกลับที่พีเอช 6.5		
A1	69.2 ± 9.2	30.8 ± 9.2
A2	79.4 ± 16.9	20.6 ± 16.9
A3	72.2 ± 14.6	20.6 ± 16.9
A4	68.5 ± 25.4	27.6 ± 14.6
B1	31.3 ± 9.1	68.7 ± 9.1
B2	35.6 ± 26.3	64.4 ± 26.3
B3	43.2 ± 4.7	56.8 ± 4.7
B4	40.9 ± 5.2	59.1 ± 5.2
สะเทินกลับที่พีเอช 7.0		
C1	96.0 ± 0.3	4.0 ± 0.3
C2	94.4 ± 0.2	5.7 ± 0.2
C3	93.2 ± 1.6	6.8 ± 1.8
C4	91.5 ± 1.6	8.5 ± 1.6
D1	96.3 ± 0.3	3.7 ± 2.9
D2	95.8 ± 0.2	4.2 ± 2.1
D3	85.3 ± 15.1	14.7 ± 15.1
D4	89.8 ± 6.1	10.19 ± 6.1

หมายเหตุ ; ²⁾ ร้อยละของไคโตซานที่ละลายได้ = 100 - 1)

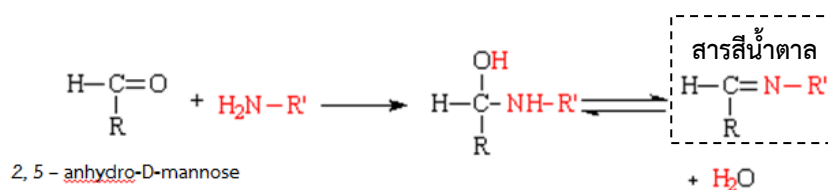
4.2.2) การเปลี่ยนแปลงสี

ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและการเปลี่ยนแปลงสีของไคโตซานหลังให้ความร้อนจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและวัดด้วยระบบ L^*a^*b พบว่าเมื่อไคโตซานได้รับความร้อนที่จำนวนรอบสูงขึ้น สังเกตได้ว่าสารละลายและตะกอนของไคโตซานมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4. 2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารละลายและตะกอนไคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน

เนื่องจากความร้อนที่ให้แก่สารละลายไคโตซานที่ละลายในกรดอะซิติก สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตัดสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานที่พันธะไกลโคซิดิก และเกิดหมู่ 2, 5 – แอนไฮโดร-ดี-แมนโนส (2, 5 – anhydro-D-mannose) ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (amide group) ที่เป็นโครงสร้างหลักของไคโตซานส่งผลให้เกิดเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้น โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า เมลลาร์ด (maillard reaction) ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งปฏิกิริยานี้พบได้ทั่วไปได้ในสารพอลิแซ็กคาไรด์ทุกชนิดที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนเมื่อละลายอยู่ในน้ำ [7, 54, 55]



R และ R' แทนสายโซ่ของโคโตซาน

รูปที่ 4. 3 ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction)

[54]

สีของโคโตซานถูกวัดด้วยระบบ $L^*a^*b^*$ โดยที่ค่า L^* แสดงถึงความสว่างที่เปลี่ยนแปลงจากสีขาว ($+L^*$) จนถึงสีดำ ($-L^*$) ค่า a^* แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสีจากสีเขียว ($-a^*$) ไปจนถึงสีแดง ($+a^*$) ค่า b^* แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงิน ($-b^*$) ไปจนถึงสีเหลือง ($+b^*$) [49] จากผลการทดลองพบว่า ค่า L^* a^* และ b^* มีค่าที่เป็นบวกทั้งหมด ดังตารางที่ 4.3 โดยค่า L^* มีแนวโน้มลดลงเมื่อจำนวนรอบในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโคโตซานเริ่มต้น ส่วนค่า a^* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า b^* ที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน มีแนวโน้มลดลงซึ่งเข้าใกล้สีน้ำเงินมากขึ้น แต่โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 1.18×10^6 ดาลตัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งเข้าใกล้สีเหลือง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะทางกายภาพ พบว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 1.18×10^6 ดาลตัน มีสีที่น้ำตาลอ่อนกว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 3.25×10^5 ดาลตัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเป็นที่ต้องพิจารณา หากมีการนำไปใช้งานด้านอาหาร เนื่องจากอาจทำให้ลักษณะทางกายภาพของอาหารเปลี่ยนไป

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงสีของโคโตนพิจรณาจากค่า L^* a^* และ b^*

กลุ่มตัวอย่าง	L^*	a^*	b^*
A0 (M_w 11.8 x10 ⁵ Da)	53.8 ± 1.75	-0.18 ± 0.31	2.71 ± 0.48
A1	38.4 ± 0.51	0.95 ± 0.02	10.6 ± 0.05
A2	38.8 ± 0.92	1.59 ± 0.16	9.63 ± 0.04
A3	37.5 ± 0.04	1.97 ± 0.03	8.85 ± 0.04
A4	34.4 ± 0.06	2.87 ± 0.04	8.22 ± 0.01
B0 (M_w 3.25 x10 ⁵ Da)	45.4 ± 0.25	-1.39 ± 0.02	9.46 ± 0.14
B1	28.4 ± 0.01	4.75 ± 0.05	4.59 ± 0.34
B2	24.8 ± 0.02	5.18 ± 0.02	4.30 ± 0.01
B3	25.8 ± 0.04	3.69 ± 0.11	2.69 ± 0.27
B4	25.9 ± 0.05	2.12 ± 0.01	2.81 ± 0.02

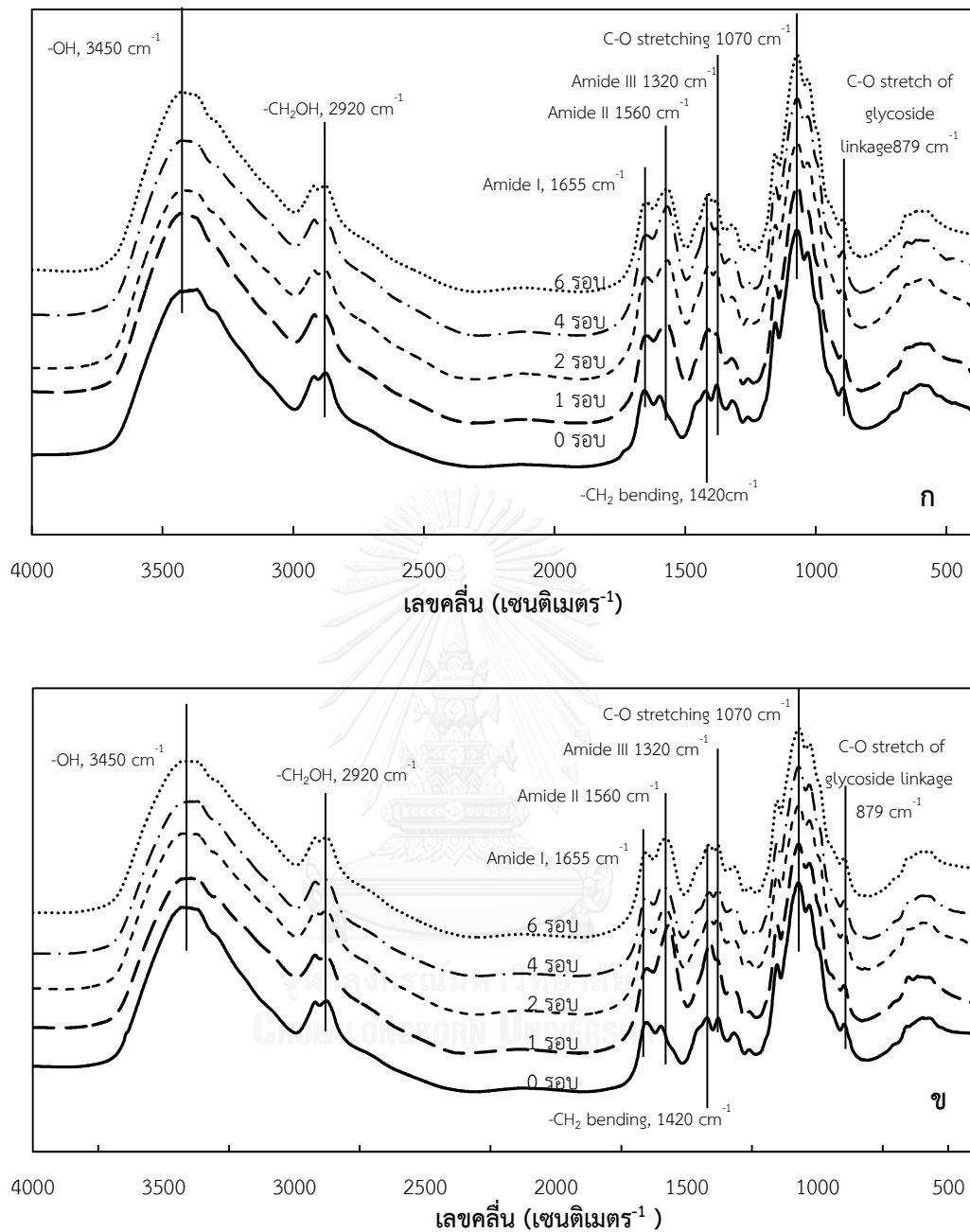
4.2.3) โครงสร้างทางเคมีของโคโตซานด้วยการวิเคราะห์ FTIR

โคโตซานที่ได้มีหมู่ฟังก์ชันหลักที่เกิดจากค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่นต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ดังตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างโคโตซาน ชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.4

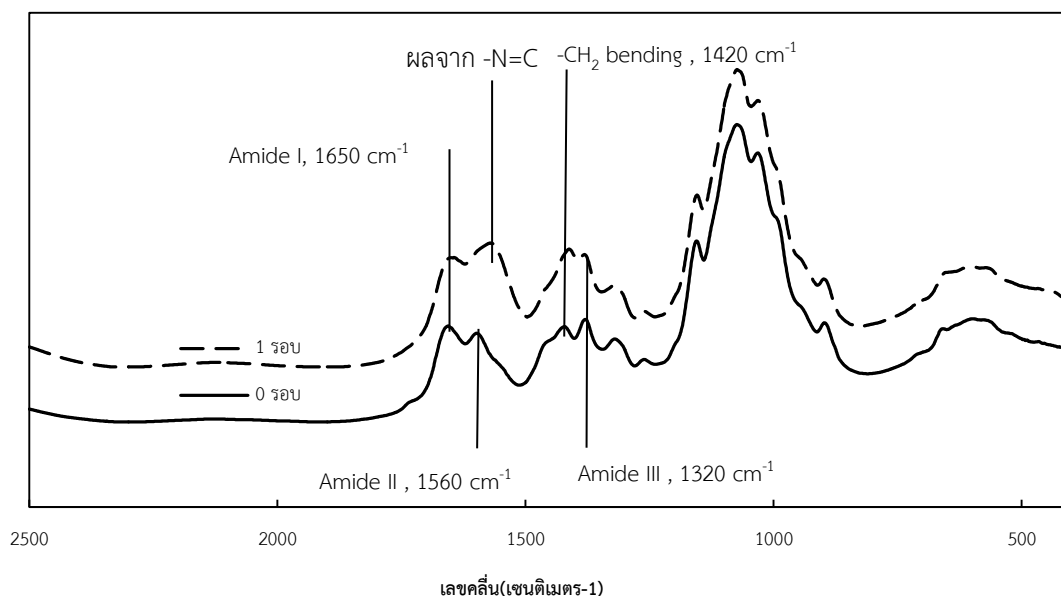
ตารางที่ 4. 4 ค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่เลขคลื่นต่างๆ ของหมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน [25]

หมู่ฟังก์ชันหลักของโคโตซาน	เลขคลื่น (ต่อเซนติเมตร)
-OH stretching	3450
-CH stretching	2870-2920
-C=O stretching (amide I)	1600 - 1650
-NH bending (amide II)	1550- 1559
-CH ₂ bending	1420
-NHCO (amide III)	1320
-CO stretching ของพันธะไกลโคซิดิก	897

การที่ให้ความร้อนกับสารละลายโคโตซานนั้น สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสบนสายโซ่ของโคโตซานด้วยกัน 2 ตำแหน่งคือ พันธะไกลโคซิดและพันธะที่ตำแหน่งเอ็น - เอ็นอะซิดิล [54] การเกิดไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งพันธะไกลโคซิดิก ส่งผลให้เกิด 2, 5 -แอนไฮโดร-ดี-แมนโนสที่ปลายสายโซ่ และเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนซึ่งอยู่ในสายโซ่ของโคโตซาน ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดดังกล่าวในหัวข้อ 4.2.2) ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1560 ต่อเซนติเมตร ของ amide II เกิดการเคลื่อนไปทางขวา ส่วนค่าการดูดกลืนที่ตำแหน่ง 1650 ของ -C=O stretching (amide I) มีค่าน้อยลง (รูปที่ 4.5) เป็นผลจากการเกิดพันธะ -N=C จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด [7, 55, 56]



รูปที่ 4. 4 การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ตำแหน่งหมู่ฟังก์ชันหลักต่างๆ ของไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล (M_w) 3.25×10^5 ดาลตัน (ก) และ 11.8×10^5 ดาลตัน (ข)

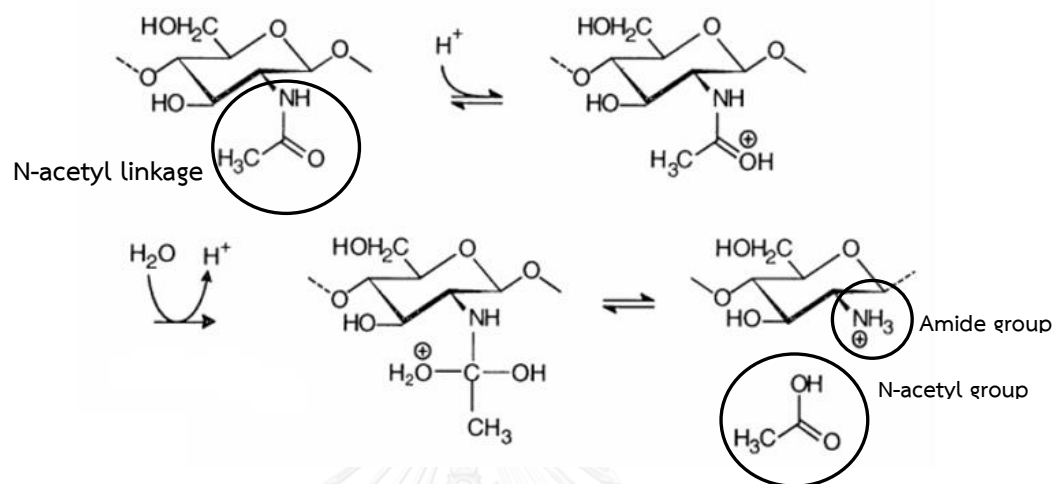


รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ตำแหน่ง 1650, 1560, 1420 และ 1320 ต่อเซนติเมตร ของไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อน 0 รอบและ1 รอบ

นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยความร้อนที่ตำแหน่งเอ็น-อะซิติดิล (amide III) หรือปฏิกิริยาดีอะซิเตชัน ซึ่งเป็นการกำจัดหมู่อะซิติดิลออกจากโครงสร้างไคโตซาน (รูปที่ 4.6) [54] ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนที่ตำแหน่งเลขคลื่น 1320 ต่อเซนติเมตร คือตำแหน่งของ -NHCO (amide III) (รูปที่ 4.6) เมื่อนำมาคำนวณร้อยละกำจัดหมู่อะซิติดิล ร่วมกับค่าการดูดกลืนที่ตำแหน่ง 1420 (-CH_2 bending) ตามสมการที่ (3.2) และ (3.3) [25] จึงส่งผลให้ร้อยละกำจัดหมู่อะซิติดิลจึงสูงขึ้น (ตารางที่ 4.5) และเมื่อจำนวนรอบให้ความร้อนสูงขึ้น จาก 2 ถึง 6 รอบ พบว่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติดิลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ไคโตซานสูตร B2-B4 มีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติดิลสูงกว่าไคโตซานสูตร A2-A4 เนื่องจากไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถละลายได้มากกว่าไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีกว่า [13]

ไคโตซานที่ให้ความร้อนจำนวนรอบเท่ากัน ไคโตซานที่น้ำหนักกลับของด้วยเอทานอล (สูตร B4^c) นั้นมีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติดิลที่สูงกว่าไคโตซานที่ตกตะกอนทันทีหลังจากสะเทินกลับที่พีเอช 6.5 (สูตร B4) เนื่องจากไคโตซานส่วนนี้เป็นส่วนที่อยู่ในสารละลายหลังจากสะเทินกลับเป็น 6.5 แสดงถึง

การมีปริมาณของหมู่เอมีนที่สามารถแตกตัวเป็น -NH_3^+ ได้สูง ดังนั้นเมื่อคำนวณหาร้อยละการกำจัด หมู่อะซิติลจึงมีค่าที่สูง



รูปที่ 4. 6 ปฏิกิริยาดีอะซิติลเลชันที่พันธะของเอ็น-อะซิติล (N-acetyl linkage) [54]
มีผลทำให้หมู่ อะซิติล ของโคโคซานหลุดออกจากสายโซ่และแทนที่ด้วยหมู่เอมีน

ตารางที่ 4. 5 ผลร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติก (Degree of deacetylation, % DD) ของโคโตซาน ด้วยเทคนิค FTIR

กลุ่มตัวอย่าง	รอบให้ความร้อน	ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติก \pm SD
A0 (M_w 11.8×10^5 Da)	0	83.85 ± 0.04^a
A1	1	88.29 ± 0.06^b
A2	2	84.23 ± 0.03^a
A3	4	83.40 ± 0.11^a
A4	6	82.38 ± 0.07^a
B0 (M_w 3.25×10^5 Da)	0	81.47 ± 0.03^c
B1	1	85.61 ± 0.12^d
B2	2	85.33 ± 0.11^d
B3	4	86.71 ± 0.06^d
B4	6	85.57 ± 0.10^d
B4 ^e	6	93.85 ± 0.08^f
S	0	81.42 ± 0.03^g

b มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่างที่ M_w เริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน

c มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่างที่ M_w เริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน

a และ d ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่างที่ M_w เริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน และ 3.25×10^5 ดาลตัน

e แทนโคโตซานที่ยังสารละลายที่พีเอช 6.5 และถูกนำกลับด้วยเอทานอล สูตร B4

f มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่างที่ M_w เริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน และแตกต่างจาก c

g มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่าง a, b, d, และ f

S โคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (M_w 2.8×10^4 ดาลตัน) จากโรงงานมารีน ไบโอ รีซอสเซส จำกัด

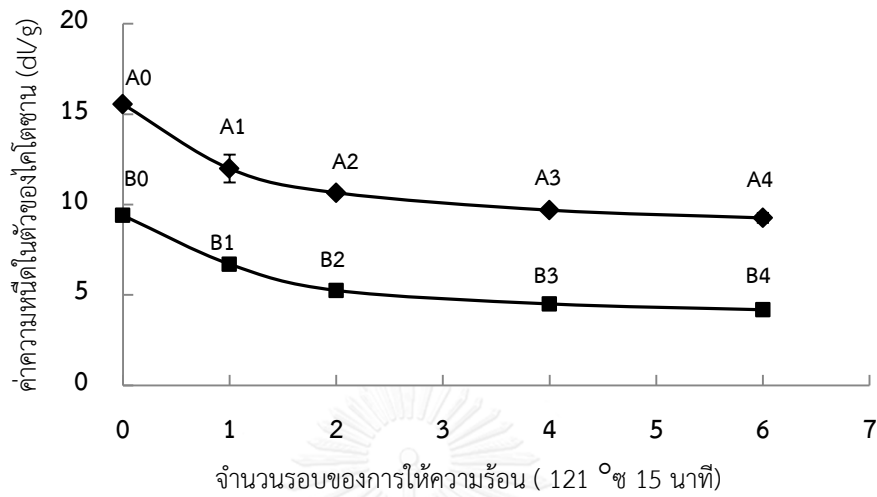
4.2.4) น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน

ในการวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานโดยใช้เทคนิคการวัดความหนืด เพื่อประเมินค่าความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity) และหาน้ำหนักโมเลกุล (M_v) ของโคโตซานแสดงวิธีการ ตามภาคผนวก ค. รวมทั้งทำการส่งวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

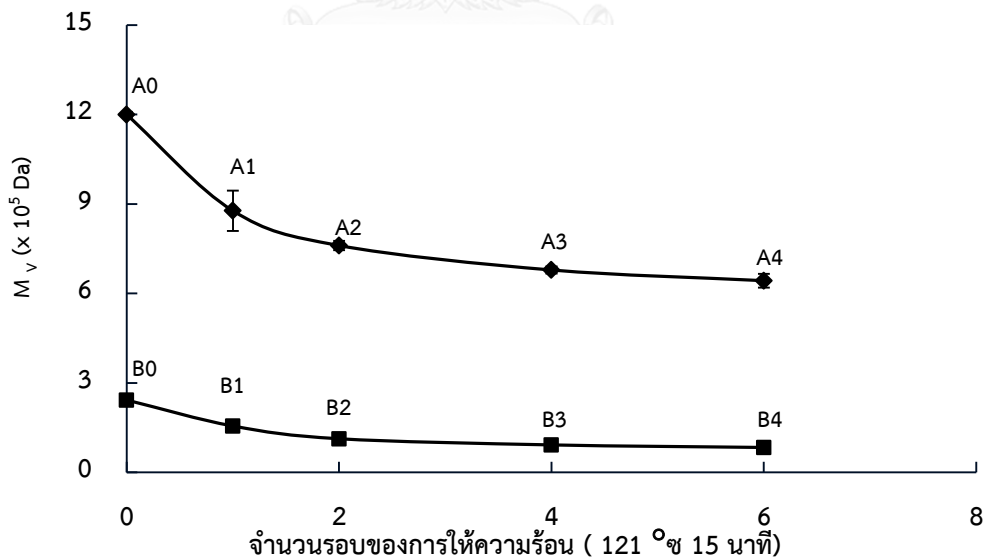
ค่าความหนืดภายในตัวและ M_v ของโคโตซานหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน มีแนวโน้มลดลงเมื่อจำนวนรอบในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.7 - 4.8) เมื่อจำนวนรอบในการให้ความร้อน 1-2 รอบ M_v ของโคโตซาน A0 ลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 1.19×10^6 ถึง 7.61×10^5 ดาลตัน และโคโตซาน B0 จาก 2.42×10^5 ถึง 1.12×10^5 ดาลตัน แต่เมื่อให้ความร้อน 4 - 6 รอบ พบว่า M_v เริ่มคงที่ อยู่ในช่วงระหว่าง $6.79 \times 10^5 - 6.42 \times 10^5$ ดาลตัน และ $9.21 \times 10^4 - 8.35 \times 10^4$ ดาลตัน สำหรับโคโตซาน A0 และ B0 ตามลำดับ แสดงว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสร่วมกับความร้อนมีข้อจำกัดในการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน เพราะเมื่อโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถตัดโมเลกุลได้มาก แต่เมื่อน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง เริ่มไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของ M_v ซึ่งพิจารณาจากร้อยละการลดลงของ M_v แสดงตามตารางที่ 4.6 จากนั้นนำโคโตซานสูตร B1 ซึ่งผ่านการให้ความร้อน 1 รอบ เนื่องจากเป็นสถานะที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และโคโตซานสูตร B6 ซึ่งเป็นสูตรที่ M_v ลดลงมากที่สุด มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีพีซี ผลวิเคราะห์พบว่าโคโตซานเมื่อให้ความร้อน 1 รอบ (สูตร B1) ทำให้น้ำหนักโมเลกุล M_w ลดลงร้อยละ 27 แต่เมื่อให้ความร้อน 6 รอบ ทำให้น้ำหนักโมเลกุล M_w ลดลงร้อยละ 85 (สูตร B4) แสดงตามตารางที่ 4.7 ซึ่งแสดงถึงระยะเวลาการให้ความร้อนทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานลดต่ำลง เนื่องจากความร้อนสามารถเพิ่มอัตราในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

รายงานวิจัยของ Hong Kyoon No และคณะ (2001) [29] ได้ลด M_v ของโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นที่ 1.11×10^6 ดาลตัน ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากับ 98.2 โดยละลายโคโตซานที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวล ในกรดอะซิติก ให้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 15, 30, 60 นาที สามารถลด M_v ของโคโตซาน ได้ร้อยละ 47, 55, และ 62 ตามลำดับ ซึ่งเห็นว่าการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องโดยวิธีของ Hong Kyoon No และคณะ (2001) สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลได้มากกว่าการให้ความร้อนเป็นรอบที่ใช้ในงานวิจัยนี้

นอกจากนั้นโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำแต่ร้อยละการจำกัดหมู่อะซิลสูง สามารถลดน้ำหนักโมเลกุลได้ดี เพราะสามารถละลายได้ดี จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสตัดสายโซ่ได้มากขึ้น [52]



รูปที่ 4.7 ผลของการให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่างๆ ต่อค่าความหนืดในตัว (Intrinsic viscosity)



รูปที่ 4.8 ผลของการให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่างๆ ต่อการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล (M_v)

ตารางที่ 4. 6 ร้อยละการลดลงของ M_v ของโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน

กลุ่มตัวอย่าง	รอบให้ความร้อน (15 นาที x รอบ)	ร้อยละการลดลงของ M_v
A0 (M_w 11.8 x10 ⁵ Da)	0	-
A1	1	26.87
A2	2	36.59
A3	4	43.43
A4	6	46.42
B0 (M_w 3.25 x10 ⁵ Da)	0	-
B1	1	35.87
B2	2	53.48
B3	4	62.00
B4	6	65.55

- แทนโคโตซานเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนจึงไม่มีร้อยละการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน

ตารางที่ 4. 7 ผลการส่งวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคเจลเพอร์เมียมเยลเอชเอ็นโครมาโตกราฟี (GPC) เปรียบเทียบกับการวัดน้ำหนักโมเลกุล (M_v) โดยเทคนิควัดความหนืด ในห้องปฏิบัติการ

สูตร	น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน ($\times 10^5$ ตาลตัน)				ร้อยละการลดลง M_w
	M_w	M_v	M_n	PDI*	
A0	11.8	11.99 \pm 0.09	2.12	5.57	-
B0	3.25	2.42 \pm 0.01	0.44	7.46	-
B1	2.98	1.55 \pm 0.04	0.41	5.77	8.31
B1**	2.36	1.51 \pm 0.02	0.41	7.20	27.4
B4	0.48	0.84 \pm 0.02	0.31	2.72	85.2
B4**	0.46	0.76 \pm 0.02	0.35	2.52	85.9
S	0.28	0.53 \pm 0.02	0.11	2.72	-

* PDI คือ ค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน เท่ากับ M_w/M_n

** แทนโคโตซานที่ยังสารละลายที่พีเอช 6.5 และถูกนำกลับด้วยเอทานอล

- แทนโคโตซานเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนจึงไม่มีร้อยละการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน

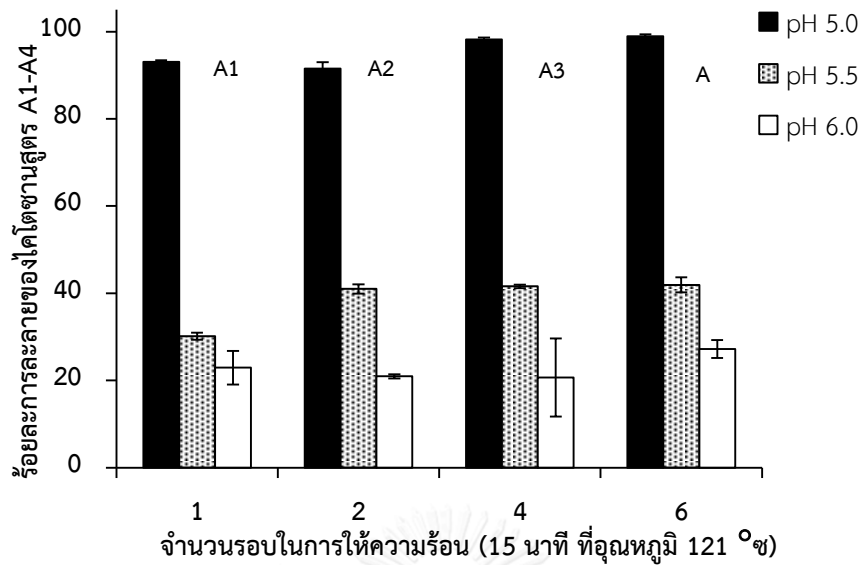
S แทนโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ของโรงงานมารีไบ โอไอ รีซอสเซส จำกัด

เมื่อพิจารณาจากค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลหรือ ค่า PDI ของไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อน เปรียบเทียบกับไคโตซานเริ่มต้น พบว่าเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลง ค่า PDI ของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลง (ตารางที่ 4.7) แสดงถึงขนาดโมเลกุลของไคโตซานที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ [26] เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และให้ความร้อนที่จำนวนรอบต่ำ สายโซ่ของไคโตซานถูกตัดสั้นลงบางส่วน จึงมีค่า PDI สูง แต่เมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการให้ความร้อน สายโซ่ไคโตซานที่ยังยาวอยู่จะถูกตัดให้สม่ำเสมอมากขึ้น จึงมีค่า PDI ต่ำลง

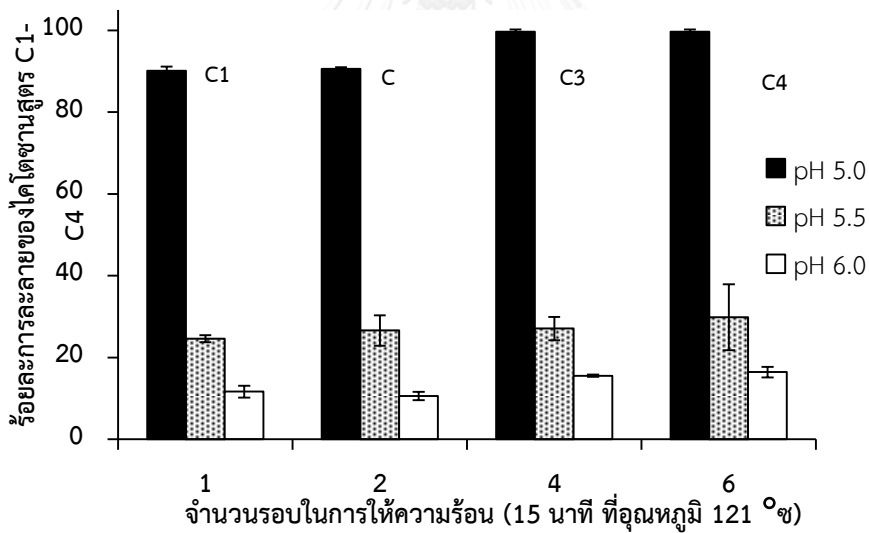
รายงานวิจัยของ C.Q. Qin และคณะ (2002) มีการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น 4.98×10^5 ดาลตัน มีค่า PDI เท่ากับ 5.13 ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.45 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงจาก 60 องศาเซลเซียส นาน 1 – 2 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลง 5.10×10^4 และ 3.5×10^3 ดาลตัน มีค่า PDI เท่ากับ 2.51 และ 1.29 ตามลำดับ เนื่องการลดน้ำหนักโมเลกุลในช่วงเริ่มต้น จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันตัดกิ่งของสายโซ่ไคโตซานก่อนและตามด้วยสายโซ่หลัก ดังนั้นจึงมีความหลากหลายของน้ำหนักโมเลกุล ค่า PDI จึงสูง แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาขึ้น สายโซ่หลักของไคโตซานถูกตัดให้สั้นลงด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันได้สูงขึ้น จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานใกล้เคียงกัน ค่า PDI ต่ำลง [57] แต่งานวิจัยของ C.Q. Qin และคณะ (2002) ได้ใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันสำหรับลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ต่างจากงานวิจัยนี้ ที่ใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่ปฏิกิริยาทั้งสองนี้ ทำหน้าที่ลดน้ำหนักโมเลกุลที่พันธะไกลโคซิกเหมือนกัน

4.2.5) ความสามารถในการละลายของไคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน

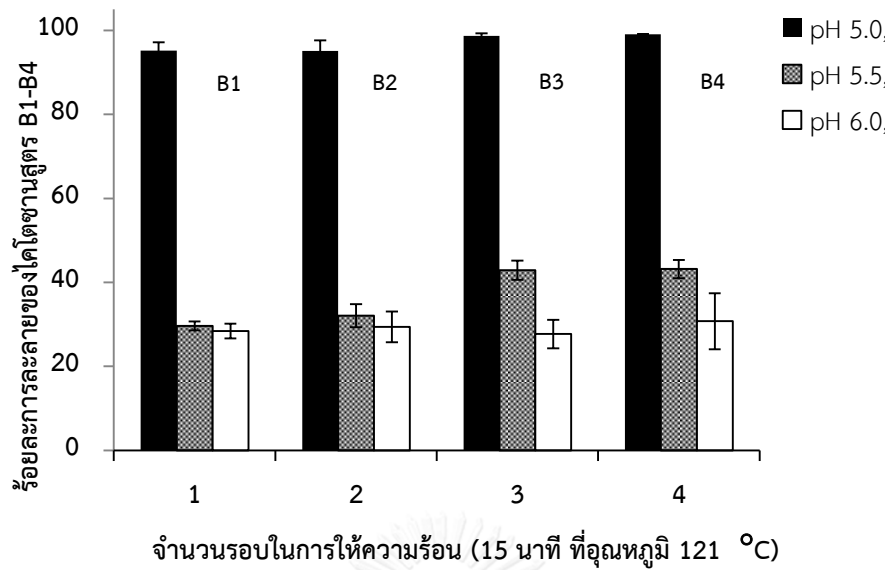
ไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อนทุกกลุ่มตัวอย่างมีความสามารถในการละลายที่พีเอช 5.0 ได้มากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานเริ่มต้น แต่สามารถละลายลดลงที่พีเอช 5.5 และ 6.0 (รูปที่ 4.9 – 4.12) เมื่อพิจารณาไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อน 6 รอบ สูตร B4 ซึ่ง M_w อยู่ในช่วง $4.6- 4.8 \times 10^4$ ดาลตัน เปรียบเทียบกับไคโตซานสูตร S ที่ M_w 2.8×10^5 ดาลตัน ซึ่งเป็นไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำของโรงงาน ที่พีเอช 5.0 ไคโตซานมีความสามารถในการละลายมากกว่าร้อยละ 90 ใกล้เคียงกัน แต่ที่ค่าพีเอช 5.5 และ 6.0 พบว่าความสามารถในการละลายต่ำกว่าไคโตซานที่ผ่านการตัดด้วยความร้อน แสดงดังรูปที่ 4.13 เนื่องจากไคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อนเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งเอ็น-อะซิติก ทำให้ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติกที่สูงขึ้นและสูงกว่าไคโตซานที่มาจากโรงงาน ซึ่งถูกลดน้ำหนักโมเลกุลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ตารางที่ 4.4) เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพในตัดสายโซ่ของไคโตซานที่พันธะไกลโคซิดิก แต่ไม่สามารถกำจัดหมู่อะซิติกออกจากโครงสร้างของไคโตซานได้ [7] ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการละลายของไคโตซานคือร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ถ้าหามีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติกที่สูง จะมีหมู่เอมีนสูง มีความสามารถในการแตกตัวได้ดีในสารละลายกรดอะซิติก [58] และไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลสูงมีความสามารถในการละลายเข้าใกล้พีเอชที่เป็นกลางน้อยกว่าไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เนื่องจากไคโตซานโมเลกุลสูงมีโครงสร้างภายในที่เป็นผลึกที่มากกว่าไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพราะการละลายนั้นจะเริ่มเกิดในส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphus) ก่อน ดังนั้นถ้าปริมาณผลึกต่ำลงความสามารถละลายจึงสูงขึ้น [7]



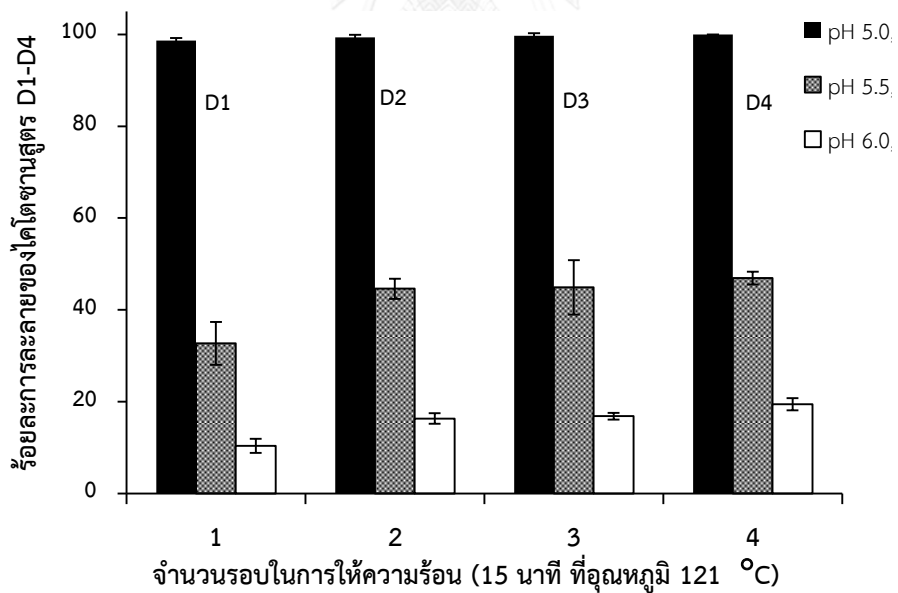
รูปที่ 4. 9 ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร A1 – A4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะเทินกลับที่พีเอช 6.5)



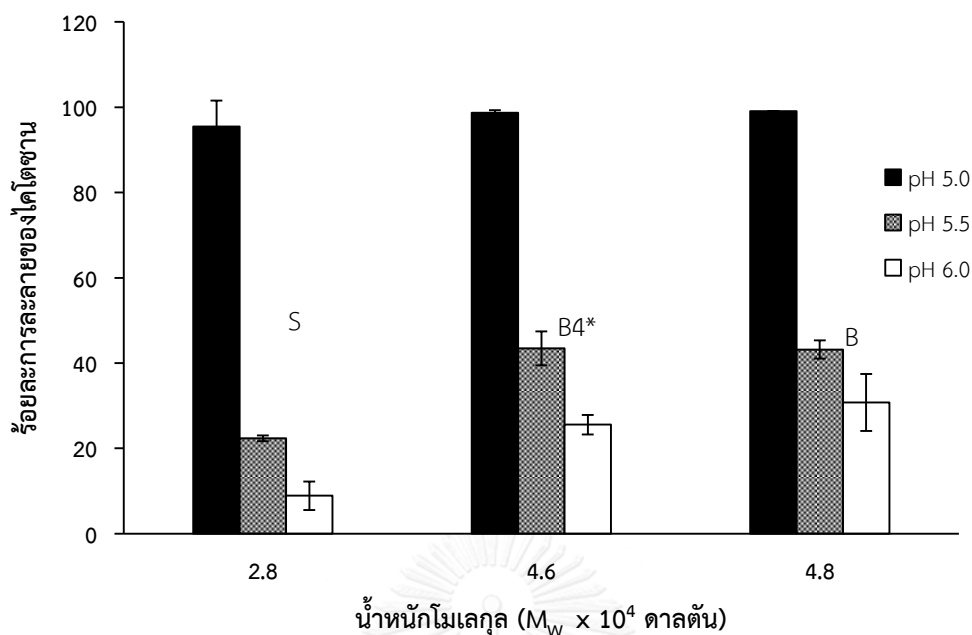
รูปที่ 4. 10 ร้อยละการละลายของโคโตซานสูตร C1 – C4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นเท่ากับ 11.8×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะเทินกลับที่พีเอช 7.0)



รูปที่ 4. 11 ร้อยละการละลายของไคโตซานสูตร B1 – B4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุล เริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะท้อนกลับที่พีเอช 6.5)



รูปที่ 4. 12 ร้อยละการละลายของไคโตซานสูตร D1 – D4 ที่ค่าพีเอช 5.0 ถึง 6.0 (น้ำหนักโมเลกุล เริ่มต้นเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน หลังจากผ่านการให้ความร้อนแล้วมีการสะท้อนกลับที่พีเอช 7.0)



หมายเหตุ ;

S แทนโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ของโรงงานมารีไบ โอไอ รีซอสเซส จำกัด

B4* แทนโคโตซานที่ละลายได้ที่พีเอช 6.5 และถูกนำกลับเอทานอล

B4 แทนโคโตซานที่ตกตะกอนกลับทันทีหลังจากสะเทินกลับที่พีเอช 6.5

รูปที่ 4. 13 ร้อยละการละลายที่พีเอช 5.0 ถึง 6.0 ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน

4.2.6) ค่าศักย์เซต้าของสารละลายโคโตซานหลังผ่านการให้ความร้อน

ค่าศักย์เซต้า คือค่าผลต่างระหว่างประจุของบริเวณพื้นผิวของสายโซ่โคโตซานกับตัวทำละลาย [48] โดยโคโตซานที่อยู่ในสารละลายกรด หมู่มีนสามารถแตกตัวเป็น $-NH_3^+$ เมื่ออยู่ในสารละลาย ดังนั้นค่าศักย์เซตานั้นย่อมมีค่าเป็นบวก จากผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารละลายโคโตซานที่ความเข้มข้น 1,250, 2,500 และ 5,000 พีพีเอ็ม (ร้อยละ 0.125, 0.25 และ 0.50 โดยมวล) ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันที่พีเอชเท่ากับ 5.5 แสดงตามตารางที่ 4.6 โคโตซานที่ความเข้มข้นต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากันที่ความเข้มข้นสูงขึ้น พบว่าค่าศักย์เซตามีแนวโน้มจะมีค่าเป็นบวกเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาที่น้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลต่างกัน พบว่าเมื่อน้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลเพิ่มขึ้น ค่าศักย์เซตามีค่าบวกเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Min Huang และคณะ (2005) เมื่อน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานลดลงจาก 2.13×10^5 ดาลตัน ถึง 1.0×10^4 ดาลตัน ที่ร้อยละการกำจัด

หมู่อะซิติลเท่ากัน พบว่าค่าศักย์เซต่าลดลงจาก +22.2 มิลลิโวลต์ ถึง +9.4 มิลลิโวลต์ และที่น้ำหนักโมเลกุล 2.13×10^5 ดาลตัน แต่ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลลดลงจากร้อยละ 88 ถึง 61 พบว่าค่าศักย์เซต่าลดลงจาก +22.2 มิลลิโวลต์ ถึง +12.5 มิลลิโวลต์ ทั้งนี้เนื่องจากร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลที่ลดลง ย่อมมีหมู่เอมีน ($-NH_2$) น้อยลงซึ่งเมื่ออยู่ในสารละลายสามารถรับโปรตอนเป็นประจุบวก ($-NH_3^+$) ที่น้อย ซึ่งส่งผลให้ค่าศักย์เซต่ามีค่าบวกน้อยลง [59]

ตารางที่ 4. 8 ค่าศักย์เซต่าของสารละลายโคโตซานในน้ำที่พีเอช 5.5

น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน (M_w)/PDI ($\times 10^4$ ดาลตัน)	ร้อยละกำจัดหมู่อะซิติล \pm SD	ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซาน (พีพีเอ็ม)	ค่าศักย์เซต่าของสารละลายโคโตซาน (มิลลิโวลต์) \pm SD
2.8 ^a /2.73	81.42 \pm 0.03	1250	+16.98 \pm 1.06 ^e
		2500	+17.10 \pm 0.47 ^e
		5000	+17.70 \pm 0.69 ^e
4.6 ^b /2.52	93.85 \pm 0.08	1250	+24.62 \pm 1.72
		2500	+24.60 \pm 1.20
		5000	+24.42 \pm 0.95
4.8 ^c /2.72	85.57 \pm 0.10	1250	+26.20 \pm 1.70
		2500	+22.45 \pm 1.39
		5000	+26.38 \pm 1.05
32.5 ^d /7.46	81.47 \pm 0.03	1250	+23.56 \pm 1.86
		2500	+22.98 \pm 1.13
		5000	+27.28 \pm 0.99

หมายเหตุ;

a แทนโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ของโรงงานมารีไบ โอไอ ริซอสเซส จำกัด

b แทนโคโตซานที่ละลายได้ที่พีเอช 6.5 และถูกนำกลับด้วยเอทานอล (สูตร B4)

c แทนโคโตซานที่ตกตะกอนกลับทันทีหลังจากสะเทินกลับ (สูตร B4)

e แทนค่าศักย์เซต่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่าง

4.3 ผลการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนา (Vibrio cholerae) ของสารละลายไคโตซาน

4.3.1) ผลของสารละลายไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ้งสด

การหาสภาวะความเข้มข้นของเชื้อไวรัสโคโรนา เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเชื้อในกุ้งสด เพื่อต้องการหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสโคโรนาต่ำสุด ที่สามารถตรวจพบได้ เนื่องจากมาตรฐานของโรงงานมีการตรวจวัดเชื้อและรายงานผลแบบ “พบ (+)” หรือ “ไม่พบ (+)” เท่านั้น ขั้นตอนในการหาสภาวะนั้น เริ่มจากนำกุ้งขาวสด ขนาดอยู่ที่ 50 – 70 มิลลิเมตร ที่ผ่านกระบวนการมาตรฐานเพื่อการบรรจุและส่งออก ของโรงงานมารีน โกลด์ โปรดักส์ จำกัด นำกุ้งสดแช่ในสารละลายเชื้อไวรัสโคโรนา ที่ความเข้มข้น 10^1 และ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้ววิเคราะห์หาเชื้อทันที และนำกุ้งที่ติดเชื้อเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อจำลองสภาวะของการส่งออกกุ้งแช่แข็งของโรงงาน จากนั้นเจ้าหน้าที่แผนกประกันคุณภาพเป็นผู้วิเคราะห์ตรวจหาเชื้อ ตามมาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM.) [47]

การทดลองนี้พยายามเลียนแบบสภาวะการติดเชื้อในกุ้งสดและหาปริมาณเชื้อต่ำที่สุด ที่จะตรวจพบ แต่พบว่าผลการทดลองมีการแปรปรวนสูง (ตารางที่ 4.9) แสดงว่าไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อของกุ้งให้เท่ากันได้ แต่สามารถพิจารณาได้เป็นแนวโน้มโดย ที่ 0 วัน พบว่ากุ้งที่ถูกเพาะเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^1 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร โดยมีการตรวจพบเชื้อ 4 ใน 5 ตัวอย่างของกุ้งติดเชื้อ ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} แต่ที่ค่าการเจือจางอื่นๆ การตรวจพบเชื้อไม่แน่นอน เมื่อเพิ่มการเพาะเชื้อขึ้นเป็นความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร พบการติดเชื้อ 4 ใน 5 และ 3 ใน 5 ตัวอย่างของกุ้งติดเชื้อที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ตามลำดับ และเมื่อนำกุ้งติดเชื้อ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ทำการแช่แข็งที่สภาวะส่งออก เป็นระยะ 7 วัน พบว่าตรวจพบเชื้อที่ทุกค่าการเจือจาง แสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แม้ว่าถูกแช่แข็ง และผลการทดลองพบว่าไม่สามารถควบคุมการเพาะเชื้อในกุ้งให้เท่าๆกันได้ แม้จะมีการทำซ้ำถึง 5 ซ้ำก็ตาม ผู้วิจัยจึงทดลองใช้กุ้งที่ถูกเพาะเชื้อที่ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มาทดสอบผลการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยสารละลายไคโตซาน (ตารางที่ 4.10) โดยส่งทดสอบในห้องปฏิบัติการต่อไป

ตารางที่ 4. 9 ผลตรวจหาเชื้อไวรัสโคโรนา ในกึ่งสดหลังจากผ่านการเพาะเชื้อในสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10^1 และ 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

จำนวนเชื้อที่เพาะ ในกึ่งสด (ซีเอฟยู ต่อมิลลิลิตรใน 25 กรัมกึ่งสด)	วันในการ เก็บรักษา แช่แข็งกึ่งที่ ติดเชื้อ	ซ้ำที่	การตรวจพบเชื้อไวรัสโคโรนาในสารละลายกึ่งติดเชื้อที่ค่า การเจือจางต่างๆ				
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
10^1	0	1	+	+	+	+	-
		2	+	+	-	-	-
		3	+	-	-	-	-
		4	+	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-
10^2	0	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	-
		3	+	+	-	-	-
		4	+	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-
10^2	7	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	+
		3	+	+	+	+	+

หมายเหตุ ; (+) แทน การตรวจพบเชื้อ และ (-) แทน การตรวจไม่พบเชื้อ

ตารางที่ 4. 10 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนาในกึ่งสด

น้ำหนักโมเลกุลของโค โคซาน ($M_w \times 10^5$ ดัลตัน)	ชื่อกลุ่มและความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (พีพีเอ็ม)		
	1250	2500	5000
3.25 (B0)	B0-1	B0-2	B0-3
2.98 (B1)	B1-1	B1-2	B1-3
2.36 (B1*)	B1*-1	B1*-2	B1*-3
Acetate buffer	-	-	-

หมายเหตุ; มีการควบคุมพีเอชให้เท่ากันทุกกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 5.5 โดยใช้โซเดียมคาร์โบเนต

* โคโคซานที่ละลายได้ที่พีเอช 6.5 และถูกนำกลับด้วยเอทานอล สูตร B1

การทดสอบการยับยั้งเชื้อในกึ่งสด ที่ทำการควบคุมพีเอชของสารละลายทุกสูตรให้เท่ากับ 5.5 เพื่อลดผลของพีเอชต่อการยับยั้งเชื้อในกึ่งสด แล้วนำกึ่งสดที่ถูกเพาะเชื้อมาแช่ในสารละลายโคโตซานตัวอย่างตามตารางที่ 4.10 เป็นระยะเวลา 20 นาที ตักออกและบรรจุในถุงบรรจุภัณฑ์ของโรงงาน แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อตามมาตรฐานของโรงงาน

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4.11) พบว่ากึ่งที่ถูกแช่ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ เพียงอย่างเดียว ตรวจไม่พบเชื้อ ตั้งแต่ค่าการเจือจาง 10^{-2} เป็นต้นไป ของทุกกลุ่มตัวอย่าง แสดงว่าสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสโอ คลอเรลา ในกึ่งสด ซึ่งเหมือนกับกลุ่มตัวอย่าง B0-1 ถึง B0-3 และกลุ่มตัวอย่าง B1-1 และ B1-3 และพบว่ากลุ่มตัวอย่าง B1-2 และ B1*-1 ถึง B1*-3 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอเรลาได้ดี เนื่องจากมีกลุ่มตัวอย่าง 1 ใน 3 กลุ่มตัวอย่างที่ไม่ตรวจพบเชื้อเลย และในสภาวะเดียวกันนี้กึ่งติดเชื้อที่ไม่ผ่านการการยับยั้งเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อทุกค่าระดับการเจือจาง (ตารางที่ 4.9) และโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.36×10^5 ดาลตัน (สูตร B1*) ที่ทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอเรลาได้ดีกว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 3.25×10^5 ดาลตัน (สูตร B0) ที่ทุกความเข้มข้น รวมถึงโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 2.98×10^5 ดาลตัน (สูตร B1) ที่ความเข้มข้น 1,250 และ 5000 พีพีเอ็ม แต่ยังสามารถได้ไม่แน่ชัดในผลของโคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อ เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อในกึ่งสดเริ่มต้นให้สม่ำเสมอได้ และจำนวนตัวอย่างซ้ำที่น้อยเกินไป






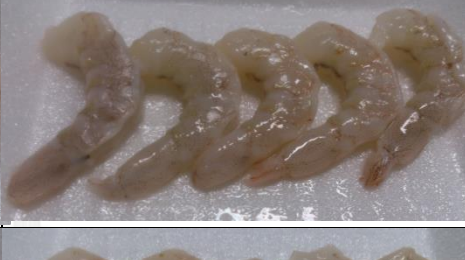






เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของกึ่งสดด้วยตา หลังจากการแช่ในสารละลายโคโตซาน เป็นระยะเวลา 20 นาทีทุกกลุ่มตัวอย่างตามตารางที่ 4.12 ความเห็นจากเจ้าหน้าที่ประกันคุณภาพของโรงงานด้านลักษณะทางกายภาพของเนื้อกึ่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างก่อนแช่สารละลายและหลังทำการแช่สารละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งเห็นได้ว่าถ้ามีการนำสารละลายโคโตซานมาทำการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอเรลา ในอุตสาหกรรมกึ่งสด จะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อกึ่ง และเพื่อแก้ปัญหาที่ยังสรุปไม่ได้ของผลการยับยั้งเชื้อ ผู้วิจัยจึงทำการทดลองอีกครั้งในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ASTM E2149-10 ซึ่งได้รับการยอมรับโดยทั่วไป

ตารางที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ ของกึ่งสดเมื่อผ่านการเติมเชื้อไวรัสโคโรนาที่ความเข้มข้น 10^2 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และในแซ่สารละลายโคโคซานที่สูตรต่างๆ ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน









สูตร	ซ้ำที่	สัดส่วนความเข้มข้นของเชื้อไวรัสโคโรนาที่เจือจาง				
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Acetate buffer	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
B0-1	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-
B0-2	1	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
B1-3	1	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
B1-1	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
B1-2	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
B1-3	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
B1*-1	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
B1*-2	1	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
B1*-3	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ; (+) แทน การตรวจพบเชื้อ (-) แทน การตรวจไม่พบเชื้อ

ตารางที่ 4. 12 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งสด แช่ในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,250 – 5,000 พีพีเอ็มและบัฟเฟอร์ อะซิเตท ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กลุ่ม ตัวอย่าง	ก่อนแช่สารละลายไคโตซาน	หลังแช่สารละลายไคโตซานนาน 20 นาที
B0-1		
B0-2		
B0-3		
B1-1		
B1-2		
B1-3		

ตารางที่ 4.12 (ต่อ) ลักษณะทางกายภาพของกุ้งสด แช่ในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,250 – 5,000 พีพีเอ็มและบัฟเฟอร์ อะซิเตท ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กลุ่มตัวอย่าง	ก่อนแช่สารละลายไคโตซาน	หลังแช่สารละลายไคโตซานนาน 20 นาที
B1*-1		
B1*-2		
B1*-3		
Acetate buffer		

4.3.2) ผลของสารละลายโคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโ คลอเลราในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสโ คลอเลรา ในห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันผลการยับยั้งเชื้อไวรัสโ คลอเลราของโคโตซาน เนื่องจากการทดลองการยับยั้งเชื้อในกึ่งสตนันให้ผลที่ไม่แน่นอน โดยใช้โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันตามตารางที่ 4.13 และที่ความเข้มข้นในช่วง 1,250 - 5,000 พีพีเอ็ม โดยมีกลุ่มตัวอย่างควบคุมเป็นกลุ่มที่เป็นสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 (เท่ากับสารละลายโคโตซาน) เพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อไวรัสโ คลอเลรานั้นถูกยับยั้งด้วยกรดหรือด้วยโคโตซาน และมีกลุ่มตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการยับยั้งเชื้อ โดยใช้เชื้อไวรัสโ คลอเลรา ที่ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เพียงความเข้มข้นเดียว ระยะเวลาให้เชื้อสัมผัสกับสารละลายที่โคโตซานและสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ นาน 20 นาที จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณเชื้อที่ลดลงตามมาตรฐาน ASTM E2149-10 [51] โดยกระบวนการยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการ ส่งวิเคราะห์ที่คณะจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. 13 น้ำหนักโมเลกุล (M_w) และร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลของโคโตซานในการทดสอบการยับยั้งเชื้อในห้องปฏิบัติการ

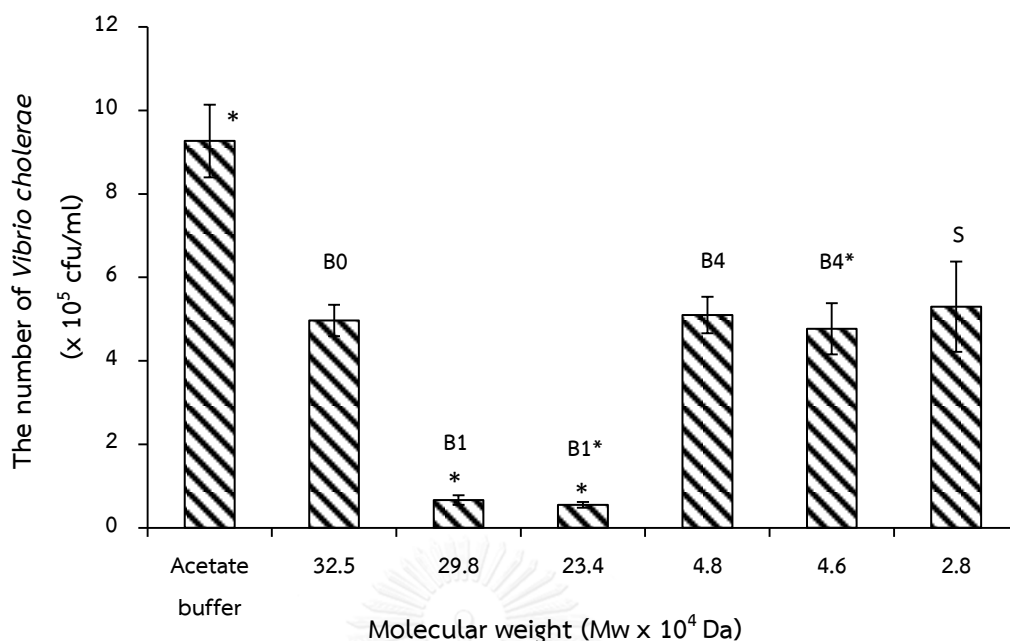
สูตร	น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน (ดาลตัน)	ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลของ โคโตซาน
S	2.8×10^{4a}	81.42 ± 0.03
B4	4.8×10^{4b}	85.57 ± 0.10
B4*	4.6×10^{4b}	93.85 ± 0.08
B1	2.98×10^{5c}	85.61 ± 0.12
B1*	2.36×10^{5c}	89.43 ± 0.83
B0	3.25×10^{5a}	81.47 ± 0.03

หมายเหตุ ; * แทนโคโตซานที่ละลายที่ได้พีเอช 6.5 และถูกนำกลับด้วยเอทานอล

จากผลการทดลองพบว่า สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ มีผลต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสโ คลอเลราน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายโคโตซาน (รูปที่ 4.14) เมื่อพิจารณาโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลแตกต่างกัน โคโตซานน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.25×10^5 (B0), 4.8×10^4 (B4), 4.6×10^4 (B4*) และ 2.8×10^4 (S) ดาลตัน ที่ความเข้มข้น 2500 พีพี

เอ็ม มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้ไม่แตกต่างกันซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 46.5 – 50.5 แต่โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.98×10^5 (B1) และ 2.36×10^5 (B1*) ดาลตัน มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่าง โดยยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 80 – 83 มีรายงานมาก่อนแล้วว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลที่สูง มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสโอ คลอกเราได้ดี เช่นจากงานวิจัยของ H. Mellegrad และคณะ (2011) ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลและร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลของโคโตซานที่ต่างกัน ต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล $1.63 \times 10^5 - 2.24 \times 10^5$ ดาลตัน เป็นช่วงที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานในช่วง 0.67 – 0.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าประมาณ 2 เท่า ของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล $1.19 \times 10^4 - 4.25 \times 10^4$ ดาลตัน ซึ่งใช้ความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อในช่วง 1.33 – 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลเท่ากัน และ H. Mellegrad และคณะ (2011) ศึกษาต่อเมื่อร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลเพิ่มขึ้น แต่น้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานคงที่ พบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อสูงขึ้น [59] จากการศึกษาวิจัย You-Jin Jeon และคณะ (2001) [36] ทำการศึกษาผลของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน พบว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6.85×10^5 ดาลตัน ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* KCTC 1682 , *Escherichia coli* O-157 ATCC 11775, *Salmonella typhi* KCTC 175 และแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococcus luteus* KCTC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P ได้มากกว่าร้อยละ 99 แต่เมื่อใช้โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 1.0×10^4 ดาลตัน พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบต่ำลงอยู่ที่ร้อยละ 50

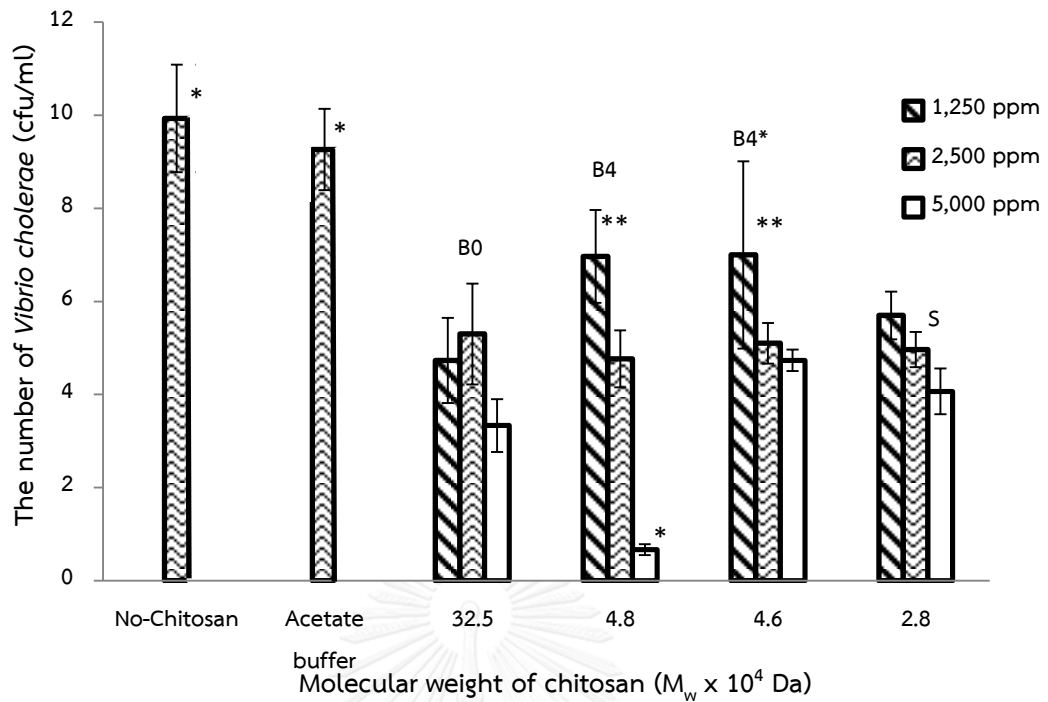
งานวิจัยเราสนใจโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพราะมีความสามารถในการละลายที่ค่าพีเอชเข้าใกล้ค่าที่เป็นกลาง ดีกว่าโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากในอนาคต จะมีการนำไปประยุกต์ใช้กับน้ำกระบวนการล้างกุ้งในอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงเลือกโคโตซานสูตร B4 และ B4* ที่น้ำหนักโมเลกุล 4.8×10^4 และ 4.6×10^4 ดาลตัน มาทดสอบต่อโดยทำการปรับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4. 14 ปริมาณเชื้อไวรัส คอลเลรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วย สารละลายโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ที่ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซาน 2,500 พีพีเอ็ม เอ็ม

* แทน ค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบทุกกลุ่มตัวอย่าง

ผลจากการศึกษาพบว่าโคโตซานสูตร B4 ที่น้ำหนักโมเลกุล 4.8×10^4 ดาลตัน มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโคโตซานกลุ่มอื่นที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม (รูปที่ 4.15) เนื่องจากมีร้อยละกำจัดหุ้เชื้อสูงกว่าโคโตซานสูตร B0 และ S รวมถึงมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า B4* จึงทำให้มีหมู่เอมีนที่แตกตัวเป็นประจุบวกสูง ซึ่งทำลายผนังเซลล์ของงเชื้อไวรัส คอลเลรา ได้มากขึ้น [59] เมื่อพิจารณาที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าโคโตซานที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัส คอลเลราเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.15 และรูปที่ 4.16 ซึ่งจากงานวิจัยของ A. Anas และคณะ (2001) [35] ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานในการยับยั้งเชื้อไวรัส คอลเลรา ที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.80×10^5 ดาลตัน เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.25 (2,500 พีพีเอ็ม) เป็นร้อยละ 0.50 (5,000 พีพีเอ็ม) สามารถยับยั้งเชื้อได้เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 55.7 เป็น 75.5 สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าโคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 4.80×10^4 ดาลตัน ที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส คอลเลรา ได้สูงสุดถึงร้อยละ 93.3 (ตารางที่ 4.14)



รูปที่ 4.15 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่มีต่อปริมาณเชื้อไวรัสโอ คอลเลรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

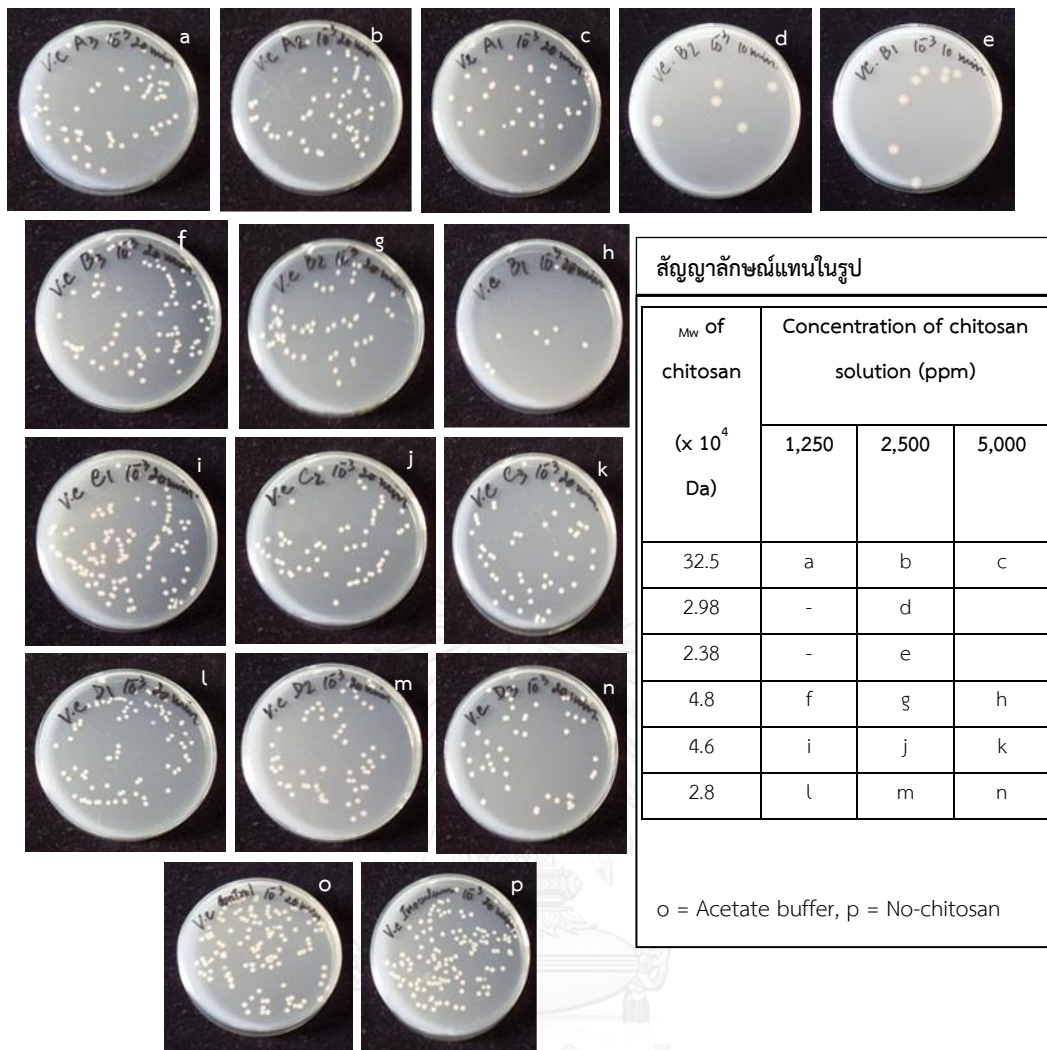
* แทน ค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มตัวอย่าง

** แทน ค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเฉพาะกลุ่มตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1250 พีพีเอ็ม

ตารางที่ 4.14 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสโอ คอลเลรา ของไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นแตกต่างกัน ในเวลา 24 ชั่วโมง ตามมาตรฐาน ASTM E2149-10

สูตร	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสโอ คอลเลรา			
		1250 พีพีเอ็ม	2500 พีพีเอ็ม	5000 พีพีเอ็ม	ควบคุม
B0	3.25×10^5	52.5	50.5	66.7	7.0
B4	4.80×10^4	30.3	48.5	93.3	
B4*	4.60×10^4	29.3	52.5	52.5	
S	2.80×10^4	42.4	46.5	58.6	

หมายเหตุ ; ร้อยละการยับยั้งเชื้อ = $\frac{\text{ปริมาณเชื้อในตัวอย่างควบคุม} - \text{ปริมาณเชื้อไคโตซาน}}{\text{ปริมาณเชื้อในตัวอย่างควบคุม}} \times 100$



รูปที่ 4.16 ตัวอย่างภาพแสดง ปริมาณโคโลนีของเชื้อไวรัสโอ คลอเลรา หลังจากผ่านการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ

ไคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก เมื่ออยู่ในสภาวะสารละลาย ไคโตซานแสดงประจุเป็นบวกซึ่งพิจารณาได้จากค่าศักย์เซต้า ซึ่งมีกลไกในการเข้าทำลายผนังเซลล์ในส่วนที่แสดงประจุลบและทำให้เซลล์ตาย โดยตำแหน่งเข้าทำปฏิกิริยามีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ กรณีของแบคทีเรียแกรมลบ สารละลายไคโตซานเข้าทำปฏิกิริยากับไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ แต่หากเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สารละลายไคโตซานเข้าทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ส่วนที่เป็น เพปติโดไกลแคน (peptidoglycans) [60]

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของความร้อนที่มีผลต่อไคโตซาน

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง สภาวะการทำปฏิกิริยาในอุตสาหกรรมอาหาร ต่อกันลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน โดยใช้ตัวอย่างไคโตซานที่มีจำหน่ายทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมคือ (M_w) 11.8×10^5 (A0) และ 3.25×10^5 (B0) ดาลตัน สารละลายไคโตซานในกรดอะซิติก พีเอช 2.0 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จำนวนรอบ 1, 2, 4, และ 6 รอบ จากนั้นสะเทินสารละลายกลับที่พีเอช 6.5 และ 7.0 พบว่าเมื่อให้ความร้อน 1 และ 2 รอบ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นน้ำหนักโมเลกุลเริ่มคงที่หลังจากให้ความร้อน 4 และ 6 รอบ โดยไคโตซาน B0 หลังผ่านการให้ความร้อน 6 รอบ น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือ $4.6 - 4.5 \times 10^5$ ดาลตัน ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบการละลาย พบว่าสามารถละลายในสารละลายที่พีเอช 5.0 ได้มากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งสูงกว่าไคโตซานเริ่มต้น และไคโตซานหลังผ่านความร้อนจะมีสีน้ำตาลที่เข้มข้นเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด และร้อยละการจำกัดหมู่อะซิติล หลังผ่านการให้ความร้อน 1 รอบ เพิ่มขึ้นจาก 83.85 เป็น 88.3 และ 81.4 เป็น 85.6 ของไคโตซาน A0 และ B0 ตามลำดับ แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ความร้อน 2 - 6 รอบ

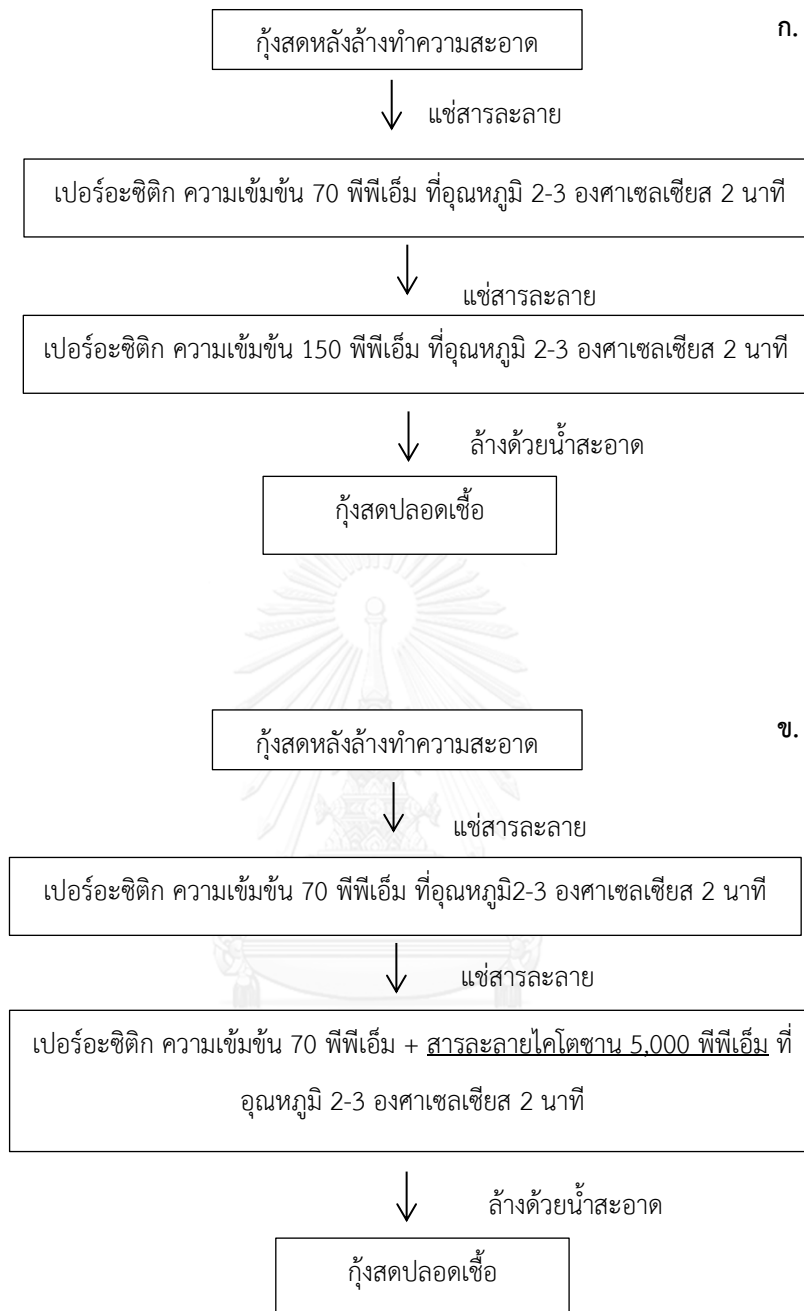
การยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ้งสด โดยการแช่ในสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,250 - 5,000 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 20 นาที นั้นไม่สามารถสรุปผลได้ เนื่องจากความแปรปรวนที่ไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อในกุ้งให้เท่ากันได้ แต่พบว่าไคโตซาน B0 ที่ผ่านการให้ความร้อน 1 รอบ ในช่วงความเข้มข้น 1,250 - 5,000 พีพีเอ็ม มีแนวโน้มที่สามารถยับยั้งเชื้อในกุ้งสดได้ โดยที่ลักษณะทางกายภาพของเนื้อกุ้งสดไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อต่อในห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ASTM E2149-10 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 83 โดยใช้ความเข้มข้น 2500 พีพีเอ็ม และหากใช้ไคโตซานสูตร B0 ที่ผ่านการให้ความร้อน 4 รอบ (M_w เท่ากับ 4.8×10^4 ดาลตัน) ที่ความเข้มข้น 5,000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งเชื้อได้ถึงร้อยละ 93 โดยไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุล 4.8×10^4 ดาลตัน นี้สามารถละลายได้ที่พีเอช 5.0 -5.5 ซึ่งจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้น้ำกระบวนกรสำหรับ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในอุตสาหกรรมกุ้งสดแช่แข็ง เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่จะผลต่อลักษณะทางกายภาพของเนื้อกุ้งสด

5.2 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้วิธีและสภาวะเหมาะสมในการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานจากเปลือกกุ้ง ในสภาวะการฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 0.1 เมกะปาสคาล ระยะเวลา 15 นาที โดยให้ความร้อน 1-2 รอบ
2. โคโคซานที่ผ่านการให้ความร้อนสามารถละลายได้ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 5.0 ซึ่งมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับโคโคซานเริ่มต้น ที่ถูกลดน้ำหนักโมเลกุลด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
3. ได้ทราบวิธีและผลในการทดสอบการยับยั้งเชื้อในกุ้งสดแช่แข็ง เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์การส่งออกกุ้งสดแช่แข็งในระดับอุตสาหกรรม

5.3 ข้อเสนอแนะของการใช้งาน

สารละลายโคโคซานที่ผ่านการให้ความร้อน มาใช้ทดแทนหรือให้รวมกันกับสารฆ่าเชื้อในกุ้งสด เช่น กรดเปอร์อะซิติก หรือคลอรีน ในกระบวนการทำความสะอาดกุ้งสดของโรงงานงานอุตสาหกรรม เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี และลดสารเคมีที่ตกค้างในเนื้อกุ้งสด โดยมีแผนผังวิธีการที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมดังรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 แผนผังการกระบวนการทำความสะอาดของกุ้งสดในอุตสาหกรรม ก. คือกระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็งทั่วไปของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล และ ข. คือกระบวนการที่มีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ร่วมด้วย

5.4 งานวิจัยในอนาคต

1. ศึกษาผลของอุณหภูมิในการลดน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานโดยตรง เพราะอุณหภูมิสูงสามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสให้สูงขึ้น โดยอาจใช้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและระยะที่คงเดิมหรือต่ำลง
2. เพิ่มจำนวนซ้ำของตัวอย่างกึ่งสด หรือลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ทำให้กึ่งติดเชื้อ และทำการเก็บข้อมูลทางสถิติ เพื่อลดปัญหาความแปรปรวน ไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อให้เท่ากันในแต่ละตัวอย่าง โดยการทดสอบในสภาวะจริงของโรงงานอุตสาหกรรม
3. ปรับวิธีการตรวจการยับยั้งเชื้อในกึ่งสด โดยใช้มาตรฐาน ASTM E2149-10 เพราะให้ผลที่แม่นยำเป็นเชิงปริมาณและเห็นความแตกต่างมากกว่ามาตรฐานของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) ที่รายงานเป็น “พบ (+)” หรือ “ไม่พบ (+)” เท่านั้น
4. ศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัสโคโรนา ด้วยโคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 2.34×10^5 และ 2.98×10^5 ดาลตัน แต่มีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นให้แตกต่างกันในการทดสอบ

รายการอ้างอิง

- [1] Kumar, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. Reactive & Functional Polymers 46 (2000): 1-27.
- [2] soedjak , H.S. and Wiseman, G.A. Antimicrobial effect of chitosan in beverages. Patent of United States. US 2005/0196497 A1, 2005.
- [3] Schumacher, E., Chitosan-stabilized peanut butter and method of preparation. Patent of United States. US 2000/ 006153250A, 2000.
- [4] Massouda, D.F., Chitosan-base antimicrobial thermoplastic polymer blends. Patent of United States. US 2006/0177490 A1, 2006.
- [5] ยวลักษณ์ ศิริพลบุญ. फिल्मเคลือบบริโภคได้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อทุเรียนพันธุ์หมอนทอง. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- [6] No, H.K., Nah, J.W., and Meyers³, S.P. Effect of Time/Temperature Treatment Parameters on Depolymerization of Chitosan. Applied Polymer Science. 87 (2001): 1890 - 1894.
- [7] Tian, F., Liu, Y., Hu, K., and Zhao, B. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. Carbohydrate Polymers 57 (2004): 31–37.
- [8] Prasertsunga, I. Preparation of low molecular weight chitosan using solution plasma system. Carbohydrate Polymers 87 (2012): 2745–2749.
- [9] Wang, S.-L. Microbialreclamationofsquidpen. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 1 (2012): 177–180.
- [10] Zheng, L.-Y. and Zhu, J.-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers 54 (2003): 527-530.
- [11] Shahidi, F. and abuzaytoun, R. Chitin, chitosan, and co-products: Chemistry, production, applications, and health effects. Advances in Food and Nutrition Research 49 (2005): 1043-4526.

- [12] Je, J.-Y. and Kim, S.-K. Chitooligosaccharides as Potential Nutraceuticals: Production and Bioactivities. Advances in Food and Nutrition Research 65 (2012): 321-333.
- [13] Nair, G.B. Vibrio cholerae. Guideline for drinking-water quality, World Health Organization, Geneva (2002).
- [14] Benhabiles, M.S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A., and Mameri, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. Food Hydrocolloids 29 (2012): 48-56.
- [15] Y., M., K., T., and Nakagawa. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. Biosc Biotech Biochem 57 (1993): 1439-1444.
- [16] Chattopad, D.P. and Inamdar, M.S. Aqueous Behaviour of Chitosan. Polymer Science (2010): 1-8.
- [17] Pillai, C.K.S., Paul, W., and Sharma, C.p. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 34 (2009): 641-678.
- [18] Peniche, C., Argüelles-Monal, W., and Goycoolea, F.M. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. polymer and composition from renewable resource (2008): 517.
- [19] No, H.K. and Meyers, S.P. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. Aquatic Food Product Technology 4(2) (1995): 27-52.
- [20] Roberts G.A.F. , Chitin Chemistry , The Macmillan Press Ltd , London, 1992. 350.
- [21] Synowiecki, J.z. and Al-Khateeb, N.A.A.Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards. Food Chemistry 68 (2000): 147-152.
- [22] Percot, A., Viton, C., and Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. Biomacromolecules 4 (2003): 12-18.
- [23] N., A., C., J., and A., H. Extraction and characterization of chitin from crustaceans Biomass Bioenergy 5 (1993): 145-153.

- [24] Tsaih, M.L. and Chen, R.H. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. Applied Polymer Science 88 (2003): 2917 - 2923.
- [25] Kasaai, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. Carbohydrate Polymers 71 (2008): 497–508.
- [26] จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. เอกสารประกอบการสอน วิชา MTT 656 Polymer Characterization and analysis. คณะพลังงาน สิ่งแวดล้อมและวัสดุ, มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี (2555).
- [27] Kasaai, M.R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. Carbohydrate Polymers 68 (2007): 477–488.
- [28] Francis Suh, J.K. and Matthew, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials 21(24) (2000): 2589-2598.
- [29] No, H.K., Nah, J.W., and Meyers, S.P. Effect of time/temperature treatment parameters on depolymerization of chitosan. Applied Polymer Science 87 (2001): 1890 - 1894.
- [30] Shahidi, f. And abuzaytoun, r. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. Advances in food and nutrition research 49 (2005): 1043-4526.
- [31] Kumar, A.B.V. and Tharanathan, R.N. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. Carbohydrate Polymers 58 (2004): 275–283.
- [32] Hien, N.Q., Phu, D.V., Duy, N.N., and Lan, N.T.K. Degradation of chitosan in solution by gamma irradiation in the presence of hydrogen peroxide. Carbohydrate Polymers 87 (2012): 935– 938.
- [33] No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., and Meyers, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Food Microbiology 74 (2002): 65– 72.

- [34] Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K., and Vuddhakul, V. Comparing the efficiency of chitosan with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. Food Control 18 (2007): 1031–1035.
- [35] Anas, A., Paul, S., Jayaprakash, S., Philip, R., and Singh, I.S.B. Antimicrobial activity of chitosan against vibrios from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* larval rearing systems. Diseases of Aquatic Organisms 67 (2005): 177–179.
- [36] Jeon, Y.-J., Park, P.-J., and Kim, S.-K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers 44 (2001): 71–76.
- [37] Jeon, Y.-J. and Kim, S.-K. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. Carbohydrate Polymers 41 (2000): 133–141.
- [38] Vargas, M. and González-Martínez, C. Recent Patents on Food Applications of Chitosan. Nutrition & Agriculture 2 (2010): 121-128.
- [39] B., J. and C., K. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. Applied polymer Science 72 (1999): 1713-1722.
- [40] คณิงนิจ บุศราคำ และ อนวัช สุวรรณกุล สารเคลือบผิวที่มีคุณสมบัติป้องกันและกำจัดโรคเน่าของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว และกรรมวิธีการผลิต. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์. เลขที่คำขอ : 0701003269, 2557
- [41] ปรีดา ตันจักร, พัชรingham วิริยะวงศ์, และ วนิดา จันทร์วิกุล. การใช้กราฟต์โคพอลิเมอร์ของไคโตซานและแคทไอออนิกพอลิเมอร์เป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์. เลขที่คำขอ 1001000854, 2556.
- [42] สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แบคทีเรียในอาหาร (bacteria in food). กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2553).
- [43] Environmental Health Division P.O. Box 3902. [Online]. Available from: www.SouthernNevadaHealthDistrict.org/ferl [2014, September, 12]
- [44] Gardner, J.R., and Peel, M.M. Introduction to Sterilization, Disinfection and Infection Control, ed. 2. Melbourne: Churchill Livingstone, 1991.

- [45] นิรชา วงษ์จินดา. กระบวนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง. สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมประมง [Online]. 2557. http://www.fisheries.go.th/technical_group [2557, ตุลาคม 30].
- [46] อธิยา สรรพวรพงษ์ และ ศิริขวัญ รสทิพย์. วิธีทดสอบเรื่อง: *Vibrio cholerae*. ศูนย์วิจัยและตรวจสอบคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ สุราษฎร์ธานี 7 (2554): 1-9.
- [47] Kaysner, C.A. and Angelo DePaola. Chapter 9 BAM: *Vibrio*. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Food and Drug Administration, (2004).
- [48] Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano Series User Manual. 1.1, 2004.
- [49] อภิตา บุญศิริ. คู่มือปฏิบัติการของศูนย์พัฒนาผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว. การวัดสี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- [50] Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions (ASTM E2149-10). ASTM International (2010).
- [51] เอกสารประกอบการใช้งานโปรแกรม Meet Minitab 16. Minitab Inc.,United States (2010).
- [52] Velasco-Rodríguez, V., Cornejo-Mazon, M., Flores-Flores, J.O., ´, G.F.G.-L.o., and anchez, H.H.-S. Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles. Revista Mexicana de Ingeniería Química 11 (2012): 155-161.
- [53] Huang, L.-Y., et al. Nanohybrid structure analysis and biomolecule arelease behavior of polysaccharide-CDHA drug carriers. Nanoscale Research. 417 (2013): 1-8.
- [54] Einbu, A. Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Thesis for the degree of philosophiae doctor (2007).
- [55] CORPORATION, T., Sapporo-Shi, and Hokkaido. Chitin oligomer having 2,5-anhydromannitol group at terminal end and method for preparation of chitin-chitosan oligomers. Office, E.P., Editor. 1997.
- [56] Liang, C., Yuan, F., Liu, F., Wang, Y., and Gao, Y. Structure and antimicrobial mechanism of ϵ -polylysine-chitosanconjugates through Maillard reaction. Biological Macromolecules 70 (2014): 427-434.

- [57] Qin, C.Q., Du, Y.M., and Xiao, L. Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. Polymer Degradation and Stability 76(2) (2002): 211-218.
- [58] Lu, S., Song, X., Cao, D., Chen, Y., and Yao, K. Preparation of Water-Soluble Chitosan. Applied Polymer Science 91 (2003): 3497-3503.
- [59] Huang, M., Fong, C.-W., Khor, E., and Lim, L.-Y. Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. Controlled Release 106(3) (2005): 391-406.
- [60] Mellegård, H., Strand, S.P., Christensen, B.E., Granum, P.E., and Hardy, S.P. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. Food Microbiology 148(1) (2011): 48-54.

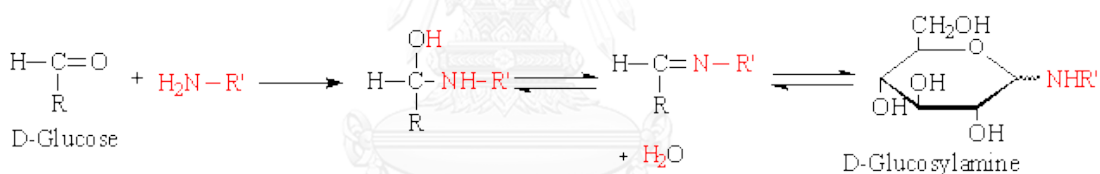


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction)

ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนสีของสารคาร์โบไฮเดรต เช่น ไคโตซาน ให้กลายเป็นสีน้ำตาล ขึ้นหลังจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในน้ำและได้รับความร้อน โดยปฏิกิริยาเมลลาร์ด เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโน (amino group) กับหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde) ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนสีของของไคตินและไคโตซาน ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะตัดสายโซ่โพลีเมอร์ที่ตำแหน่งพันธะไกลโคซิดิก ทำให้เกิดหมู่แอลดีไฮด์ ซึ่งสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของไคโตซาน และก่อให้เกิดสีน้ำตาลขึ้น ซึ่งกลไกแสดงดังรูปที่ ก.1 โดยปฏิกิริยาเมลลาร์ดจะเกิดได้น้อยลง เมื่อสารคาร์โบไฮเดรตเกิดปฏิกิริยา polymerization สูงขึ้น อาจสามารถสรุปได้ว่าถ้าสารคาร์โบไฮเดรตโพลีเมอร์ใหญ่จะเกิดสีน้ำตาลที่อ่อนกว่าที่โพลีเมอร์เล็ก



รูปที่ ก. 1 ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์

[ที่มา: <http://www.chm.bris.ac.uk>]

ภาคผนวก ข.

หลักการวัดสี

สี (Color)

สี เป็นคุณสมบัติเชิงแสงที่สามารถใช้บรรยายคุณลักษณะของวัสดุที่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ได้ง่ายที่สุดวิธีหนึ่ง ที่ดีกว่ามองตาเปล่า ซึ่งมาตรฐานของการบรรยายลักษณะสีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประสบการณ์ ลักษณะทางกายภาพของตาของผู้บรรยาย ลักษณะแสงที่ตกกระทบ ฯลฯ ดังนั้นการวัดและบรรยายสีในเชิงวิชาการจึงต้องมีการจัดมาตรฐานเพื่อเป็นการลดความไม่เป็นกลาง (bias) ของผู้บรรยายสีของวัสดุนั้น ๆ

ปัจจัยที่ทำให้เกิดสีมีอยู่ 3 ประเภท คือ

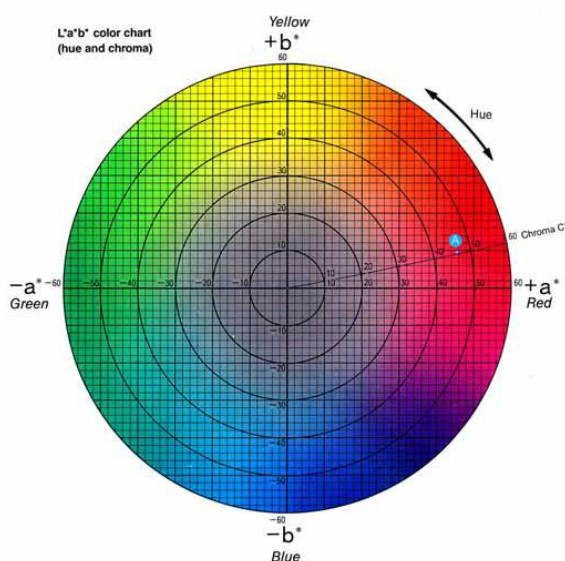
ก. แหล่งกำเนิดแสง (light source) แหล่งกำเนิดแสงมีผลอย่างมากในการบรรยายสีของวัตถุ แหล่งกำเนิดแสงถ้ามีแสงแตกต่างจากแสงขาว เมื่อตกกระทบกับวัตถุจะทำให้แสงที่สะท้อนกลับมากเกิดสีที่แตกต่างไป เช่น แสงจากหลอด incandescent ให้แสงสีส้มในขณะที่ Fluorescent ให้แสงขาวเย็น

ข. วัตถุที่มอง (specimen) วัตถุที่ทึบแสง (opaque) จะให้การสะท้อนของแสงเพื่อเกิดสีแตกต่างจากวัตถุที่โปร่งแสง (translucent) และโปร่งใส (transparent) ลักษณะของการตกกระทบของแสงบนวัตถุ

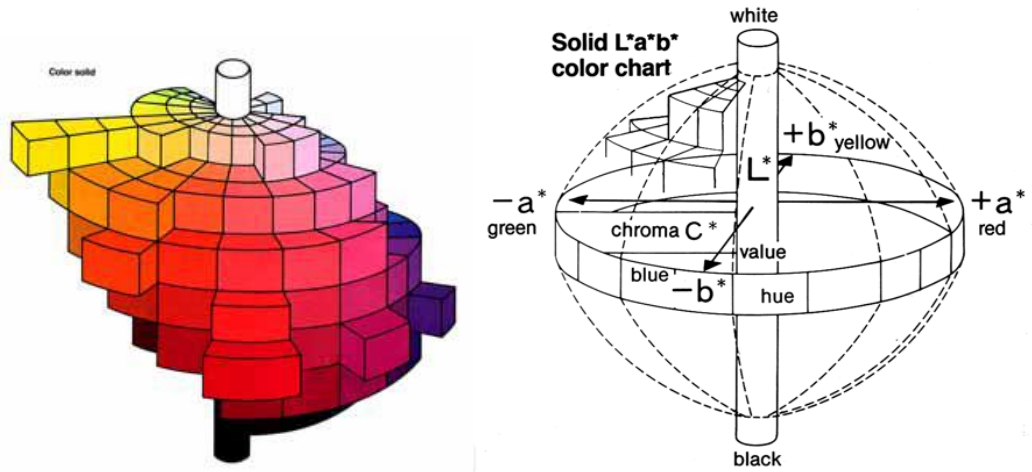
ค. ผู้สังเกตการณ์ (observer) ผู้สังเกตการณ์นั้นมีผลอย่างยิ่งต่อการบรรยายสีที่มองเห็น ผู้สังเกตการณ์ต่างคนจะบรรยายลักษณะสีต่างกันขึ้นอยู่กับสรีระทางกายภาพของตาแต่ละคน ในร่างกายคนจะมีเซลล์อยู่ 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการรับสี คือ เซลล์รูปแท่งและเซลล์รูปโคน เซลล์รูปแท่งจะตอบสนองได้ดีกับการมองเห็นในที่เกี่ยวข้องกับความมืดสว่าง ส่วนเซลล์รูปโคนจะตอบสนองต่อสีที่มองเห็น

จากหลักการพื้นฐานเรื่องสีข้างต้น จึงได้มีการพัฒนาอุปกรณ์เพื่อใช้วัดสีที่มีมาตรฐานและลดความไม่เป็นกลางเนื่องจากปัจจัยของแหล่งกำเนิดแสงและผู้สังเกตการณ์ องค์กรที่มีบทบาทสำคัญในการกำหนดมาตรฐานด้านสี คือ Commission International de l'Eclairage (CIE) หรือในชื่ออังกฤษว่า International Commission on Illumination (<http://www.cie.co.at/cie/>) มีสำนักงานใหญ่อยู่ในประเทศฝรั่งเศส องค์กรนี้ได้กำหนดมาตรฐานการวัดสีซึ่งเป็นที่ยอมรับอย่างกว้าง

ในวงการวิชาการและการวิจัย คือระบบ CIE Lab scale ในระยะเริ่มแรก CIE ได้กำหนดสเกลการวัดสีเป็น X-Y-Z ซึ่งใช้บรรยายสีแดง (Red) เขียว (Green) และ น้ำเงิน (Blue) แต่เนื่องจากระบบสีดังกล่าวไม่สามารถบรรยายถึงลักษณะความมืด-สว่างของสีได้ CIE ได้พัฒนาต่อมาเป็นระบบ X-Y-L ซึ่งบรรยายถึงค่าสีแดง เขียว และความสว่าง (lightness) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามระบบดังกล่าวก็ยังขาดส่วนที่บรรยายถึงค่าสีน้ำเงิน CIE จึงได้พัฒนาระบบสีต่อมาจนเป็นระบบที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือระบบ $L^*a^*b^*$ ซึ่งเป็นระบบการบรรยายสีแบบ 3 มิติ โดยที่แกน L^* จะบรรยายถึงความสว่าง (lightness) จากค่า $+L^*$ แสดงถึงสีขาว จนไปถึง $-L^*$ แสดงถึงสีดำ แกน a^* จะบรรยายถึงแกนสีจากเขียว ($-a^*$) ไปจนถึงแดง ($+a^*$) ส่วนแกน b^* จะบรรยายถึงแกนสีจากน้ำเงิน ($-b^*$) ไปเหลือง ($+b^*$) ลักษณะการบรรยายสีของ CIE แสดงได้ดังรูป 2.18 และ 2.19 นอกจากนี้ บริษัท Hunter lab ในอเมริกาก็เป็นอีกองค์กรหนึ่งซึ่งทำการวิจัยและพัฒนาระบบการวัดสี จนในที่สุดได้ระบบของ Hunter lab เอง ซึ่งเรียกว่า การวัดสีระบบ Hunter lab scale ซึ่งบรรยายแกนใน 3 มิติ เช่นเดียวกับระบบ CIE โดยที่ Hunter lab จะใช้สเกล L-a-b บรรยายลักษณะสีเช่นเดียวกับ $L^*a^*b^*$ ของ CIE ข้อแตกต่างระหว่างระบบสีของ CIE และ Hunter lab คือสูตรการคำนวณค่าสี ซึ่งทั้ง L-a-b และ $L^*a^*b^*$ ล้วนมีพื้นฐานการคำนวณมาจากค่าจากระบบ X-Y-Z ทั้งสิ้น



รูปที่ ข. 1 การบรรยายสีในระบบ CIE Lab มองในระนาบ 2 มิติ: Hue บรรยายถึงเฉดสี และ Chroma บรรยายถึงความมันวาวหรือความเข้มของโทนสี. ที่มา: Minolta, 1997.



รูปที่ ข. 2 การบรรยายสีพื้นในระบบ CIE Lab ในรูป 3 มิติ. ที่มา: Minolta, 1997

ข้อมูลการวัดสีของโคโตซาน

ตารางที่ ข. 1 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโตซานที่ผ่านการให้ความร้อนและค่าเริ่มต้นที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 3.25×10^5 ดาลตัน

โคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (ดาลตัน)	รอบในการให้ความร้อน	L^*	a^*	b^*
3.25×10^5	0	45.7	-1.38	9.62
		45.25	-1.38	9.36
		45.27	-1.42	9.39
	ค่าเฉลี่ย	45.41	-1.39	9.46
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.25	0.02	0.14
	1	28.38	4.7	4.2
		28.37	4.78	4.8
		28.39	4.78	4.78
	ค่าเฉลี่ย	28.38	4.75	4.59
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.01	0.05	0.34
	2	24.74	5.17	4.29
		24.77	5.17	4.31
		24.78	5.21	4.31
	ค่าเฉลี่ย	24.76	5.18	4.30
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.02	0.02	0.01
	4	25.72	3.57	2.38
		25.79	3.74	2.84
		25.78	3.77	2.86
	ค่าเฉลี่ย	25.76	3.69	2.69
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	0.11	0.27
	6	25.85	2.12	2.8
		25.87	2.13	2.81
		25.94	2.12	2.83
	ค่าเฉลี่ย	25.89	2.12	2.81
เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.05	0.01	0.02	

ตารางที่ ข. 2 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโคซานที่ผ่านการให้ความร้อนและค่าเริ่มต้นที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 1.18×10^6 ดาลตัน

โคโคซานที่น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้น (ดาลตัน)	รอบในการให้ความร้อน	L^*	a^*	b^*
1.18×10^6	0	51.84	0.18	3.26
		55.11	-0.4	2.37
		54.57	-0.31	2.5
	ค่าเฉลี่ย	53.84	-0.17667	2.71
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.75	0.31	0.48
	1	38.15	0.93	10.56
		38.06	0.95	10.59
		38.98	0.96	10.65
	ค่าเฉลี่ย	38.40	0.95	10.6
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.51	0.02	0.05
	2	37.81	1.4	9.66
		39.43	1.69	9.65
		39.39	1.68	9.58
	ค่าเฉลี่ย	38.88	1.59	9.63
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.92	0.16	0.04
	4	37.5	1.99	8.87
		37.55	1.94	8.87
		37.58	1.97	8.8
	ค่าเฉลี่ย	37.54	1.97	8.85
	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.04	0.03	0.04
	6	34.34	2.91	8.23
		34.24	2.84	8.21
		34.24	2.86	8.21
	ค่าเฉลี่ย	34.27	2.87	8.22
เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.06	0.04	0.01	

ตารางที่ ข. 3 การเปลี่ยนแปลงของค่า L^* , a^* และ b^* ของโคโคซานที่น้ำหนักโมเลกุล $2.8 - 4.8 \times 10^4$ ดาลตัน

โคโคซานที่น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^4$ ดาลตัน)	L^*	a^*	b^*
2.8	41.45	4.21	17.73
	41.39	4.2	17.71
	41.11	4.18	17.63
ค่าเฉลี่ย	41.32	4.20	17.69
เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.18	0.02	0.05
4.6	30.03	3.56	9.57
	30.25	3.52	9.59
	30.25	3.48	9.57
ค่าเฉลี่ย	30.18	3.52	9.58
เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.13	0.04	0.01
4.8	25.85	2.12	2.8
	25.87	2.13	2.81
	25.94	2.12	2.83
ค่าเฉลี่ย	25.89	2.12	2.81
เบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.05	0.01	0.02

ภาคผนวก ค.
การหาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน

ค.1 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานโดยการวัดความหนืด

หลักการ

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานกับค่าความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity, η_r) กับค่าความหนืดจำเพาะ (specific viscosity, η_{sp})

โดยกำหนด

$$\text{ค่าความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity, } \eta_r) = \frac{\text{เวลาของสารละลาย}}{\text{เวลาของตัวทำละลาย}}$$

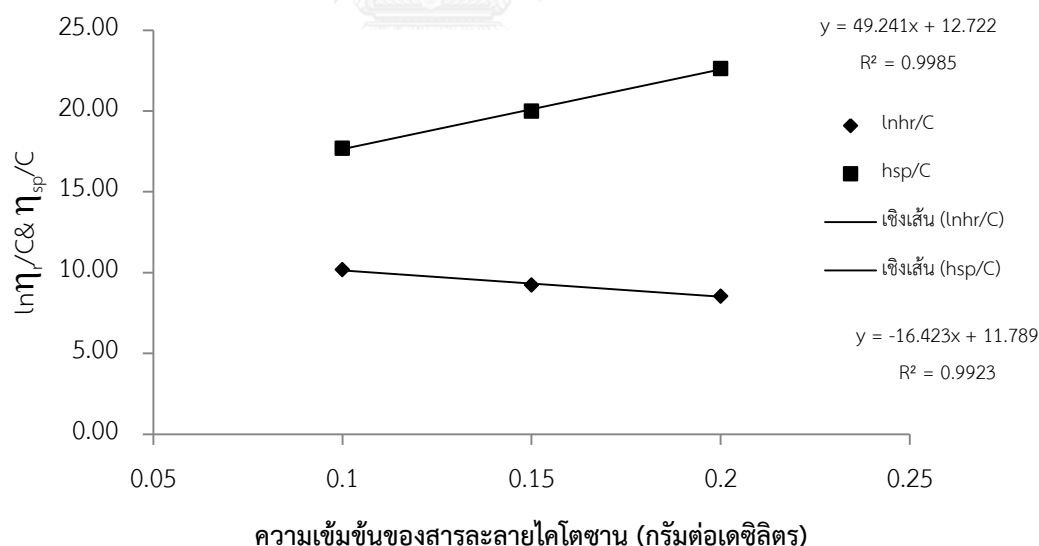
$$\text{ค่าความหนืดจำเพาะ (specific viscosity, } \eta_{sp}) = \eta_r - 1$$

$$\text{ค่าความหนืดในตัว (intrinsic viscosity, } [\eta]) = \eta_{sp}/C = \ln(\eta_r)/C \text{ ที่ } C \text{ เข้าใกล้ศูนย์}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของสารละลายโคโตซาน

สำหรับโคโตซานถูกละลายในกรดอะซิติก

ผลการทดลอง โคโตซานหลังจากให้ความร้อนทำการสร้างกราฟ



รูปที่ ค. 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคโตซานกับ $\ln(\eta_r)/C$ และ η_{sp}/C

การคำนวณหา viscosity average molecular weight (M_v)

จากกราฟรูปที่ ค.1 คำนวณหาค่า $[\eta]$ จากสมการเส้นแนวโน้มของ $\ln(\eta_r)/C$ และ η_{sp}/C ที่ความเข้มข้นเข้าใกล้ศูนย์ โดยคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของจุดตัดแกน Y

ตัวอย่างการคำนวณ

$$[\eta] = (12.722 + 11.789) / 2 = 11.117 \text{ เดซิลิตรต่อกรัม}$$

จากสูตร $[\eta] = K(M_v)^a$

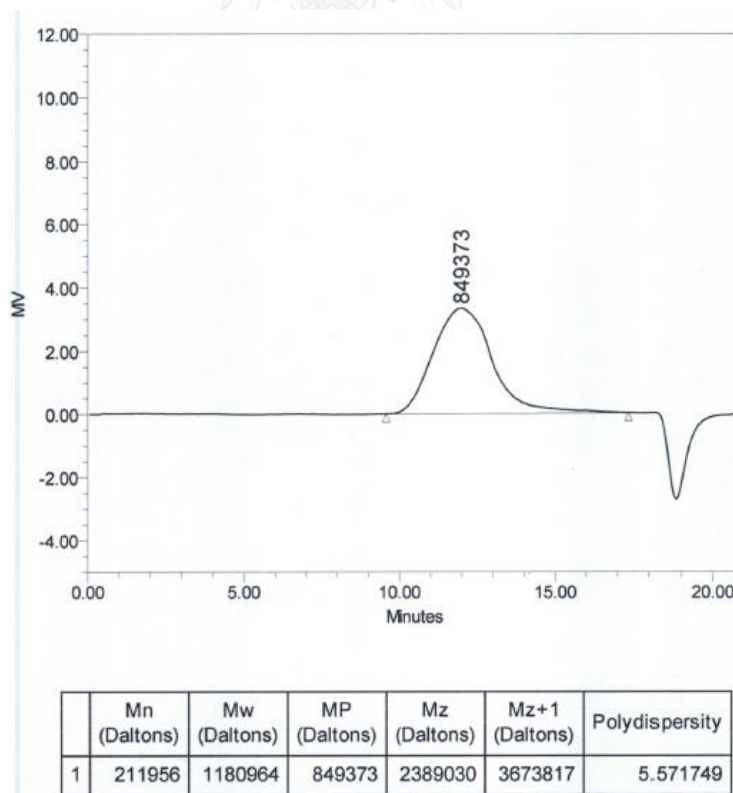
โดยที่ค่า K เท่ากับ 14.0×10^{-5} เดซิลิตรต่อกรัม และค่า a เท่ากับ 0.83

แทนค่าตัวแปรลงในสมการ

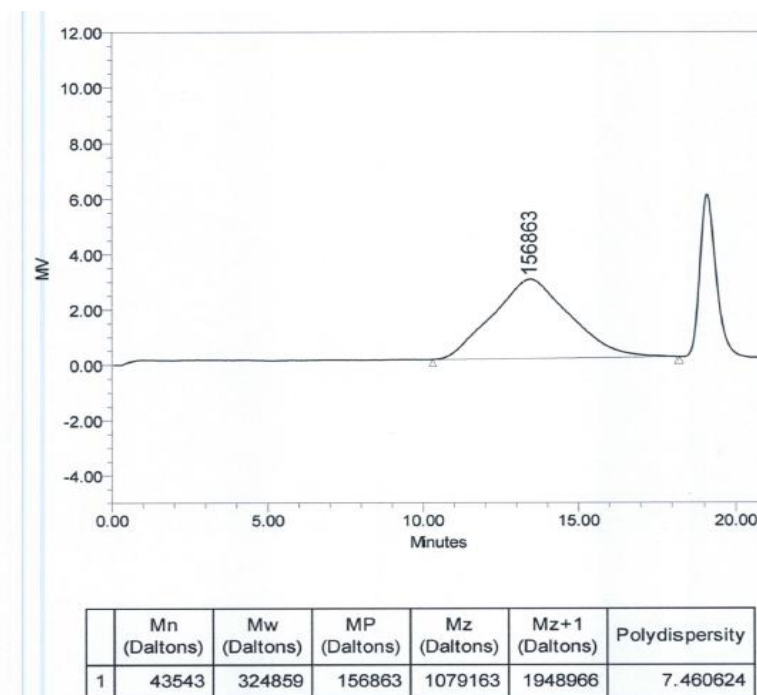
$$11.117 = (14 \times 10^{-5}) \times (M_v)^{0.83}$$

$$M_v = 800,611 \text{ ดาลตัน}$$

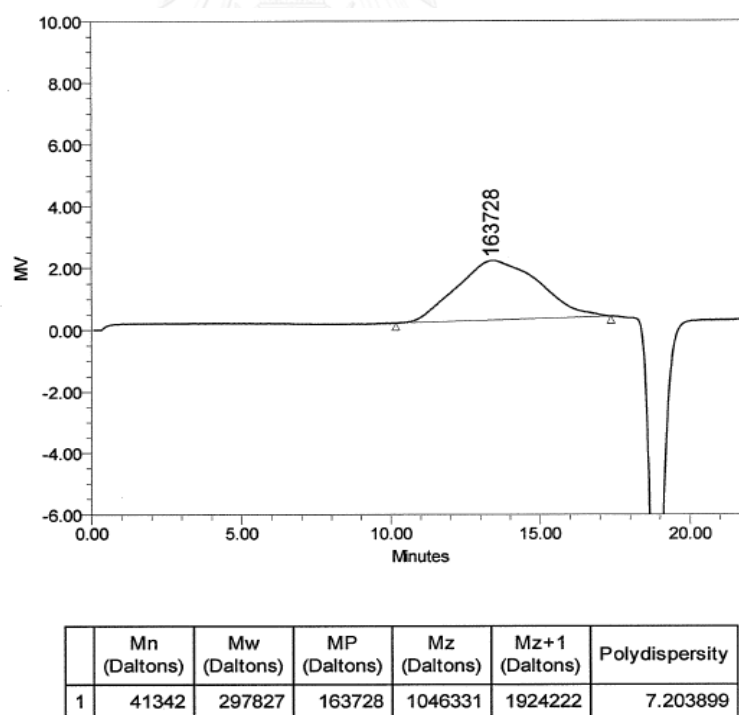
ค.2 ผลการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิคเจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี (Gel permeation chromatography; GPC)



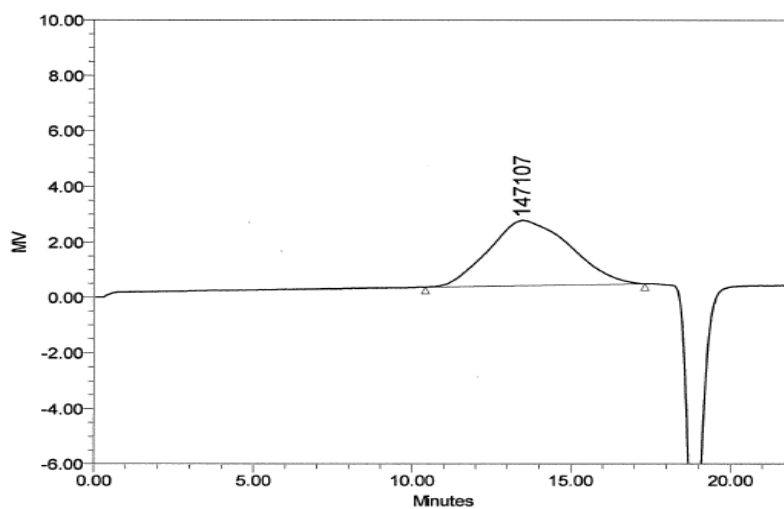
รูปที่ ค. 2 กราฟพีพีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตนานของโคโตนานเริ่มต้นสูตร A0



รูปที่ ค. 3 กราฟจีพีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตนของโคโตนเริ่มต้นสูตร B0

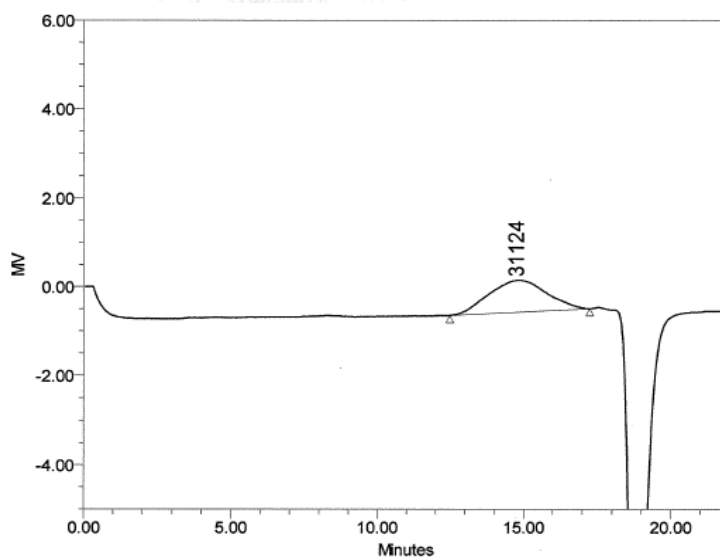


รูปที่ ค. 4 กราฟจีพีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตนของโคโตนเริ่มต้นสูตร B1 (ส่วนตะกอนที่ตกลงมาหลังจากสะเทินกลับทันที)



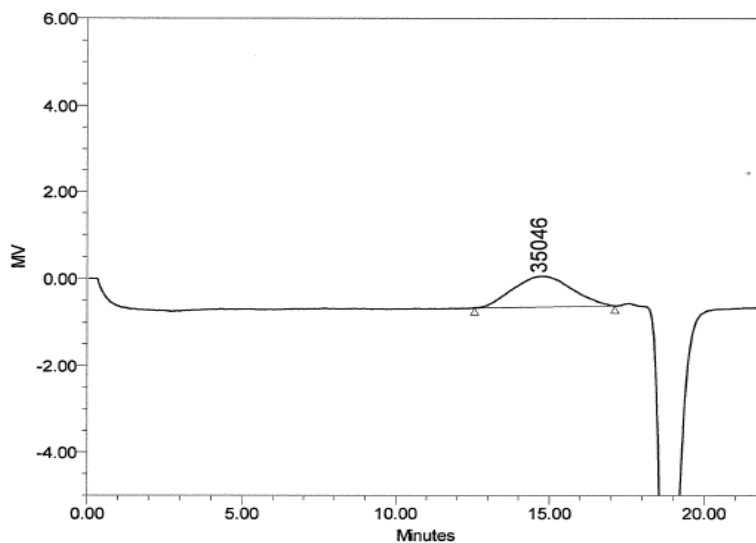
	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	40964	236273	147107	770799	1438980	5.767825

รูปที่ ค. 5 กราฟจีพีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B1 (ส่วนตะกอนที่อยู่ในสารละลายหลังจากสะเทิน และแยกโดยการเติมเอทานอล)



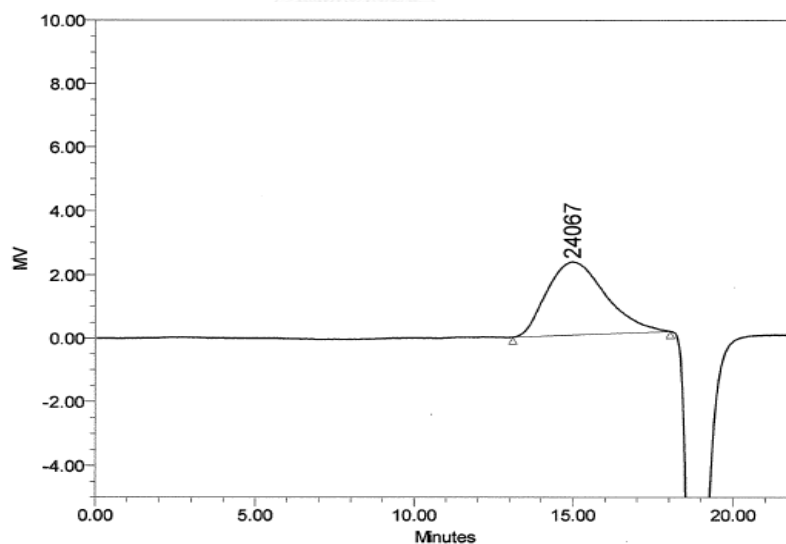
	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	17508	47626	31124	101224	158333	2.720159

รูปที่ ค. 6 กราฟจีพีซีของน้ำหนักโมเลกุลโคโตซานของโคโตซานเริ่มต้นสูตร B4 (ส่วนตะกอนที่ตกลงมาหลังจากสะเทินกลับทันที)



	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	18353	46403	35046	93249	141470	2.528412

รูปที่ ค. 7 กราฟพีพีซีของน้ำหนักรวมโมเลกุลโคโตะซานของโคโตะซานเริ่มต้นสูตร B4 (ส่วนตะกอนที่อยู่ในสารละลายหลังจากสะเทิน และแยกโดยการเติมเอทานอล)



	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	10514	28682	24067	53427	77457	2.727920

รูปที่ ค. 8 กราฟพีพีซีของน้ำหนักรวมโมเลกุลโคโตะซานของโคโตะซานน้ำหนักรวมโมเลกุลของโคโตะซาน

ภาคผนวก ง.

การทดสอบสมบัติการละลาย (Solubility Test) ของโคโตซาน

ตารางที่ ง. 1 ความสามารถในการละลายของโคโตซานที่ค่าพีเอช 6.5 และ 7.0 ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0

สูตร	การละลายของโคโตซานในกรดอะซิติก (ร้อยละโดยมวล)		
	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.0
A0	45.00 ± 1.00	13.70 ± 2.35	6.15 ± 0.62
A1	93.03 ± 0.43*	30.13 ± 0.81*	22.91 ± 3.84*
A2	91.55 ± 1.41*	40.98 ± 1.04*	20.95 ± 0.48*
A3	98.19 ± 0.45*	41.56 ± 0.38*	20.70 ± 8.95*
A4	98.96 ± 0.45*	41.90 ± 1.73*	27.19 ± 2.08*
B0	54.13 ± 0.79	16.39 ± 1.09	8.22 ± 0.60
B1	95.18 ± 2.00*	29.61 ± 1.07*	28.43 ± 1.76*
B2	95.07 ± 2.58*	32.07 ± 2.76*	29.43 ± 3.67*
B3	98.70 ± 0.59*	42.89 ± 2.27*	27.71 ± 3.40*
B4	99.04 ± 0.03*	43.18 ± 2.16*	30.78 ± 6.67*
C1	93.03 ± 0.43*	30.13 ± 0.81*	8.80 ± 1.70
C2	91.55 ± 1.41*	40.98 ± 1.04*	11.30 ± 1.20*
C3	98.19 ± 0.45*	41.56 ± 0.38*	14.40 ± 1.60*
C4	98.96 ± 0.45*	41.90 ± 1.73*	15.40 ± 0.50*
D1	99.01 ± 0.99*	32.70 ± 4.69*	10.84 ± 1.52*
D2	99.38 ± 0.18*	44.59 ± 2.20*	16.34 ± 1.14*
D3	99.35 ± 0.19*	44.90 ± 5.94*	16.83 ± 0.71*
D4	100.00 ± 0.00*	46.95 ± 1.39*	19.46 ± 1.33*

หมายเหตุ; * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับค่าสูตรเริ่มต้น A0 และ B0 ที่ค่าความเป็นกรดต่าง คือ 5.0, 5.5 และ 6.0

ตารางที่ ง. 2 ความสามารถในการละลายของโคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0

น้ำหนักโมเลกุล ของโคโตซาน ($\times 10^4$ ดาลตัน)	การละลายของโคโตซานในกรดอะซิติก (ร้อยละโดยมวล)		
	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.0
2.8	99.0 ± 0.03	43.2 ± 2.16	30.78 ± 6.67
4.6	98.7 ± 0.59	43.5 ± 3.97	25.6 ± 2.30



ภาคผนวก จ.

การคำนวณหาร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation , DD)

การวิเคราะห์ร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติก โดยการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) โดยโหมด KBr ในช่วงความยาวคลื่น 400 – 4000 เซนติเมตร⁻¹ จากนั้นคำนวณหาร้อยละการกำจัดของการกำจัดหมู่อะซิติกจากสูตร (จ.1) และ (จ.2)

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133DA \quad (\text{จ.1})$$

$$\%DD = 100 - \%DA \quad (\text{จ.2})$$

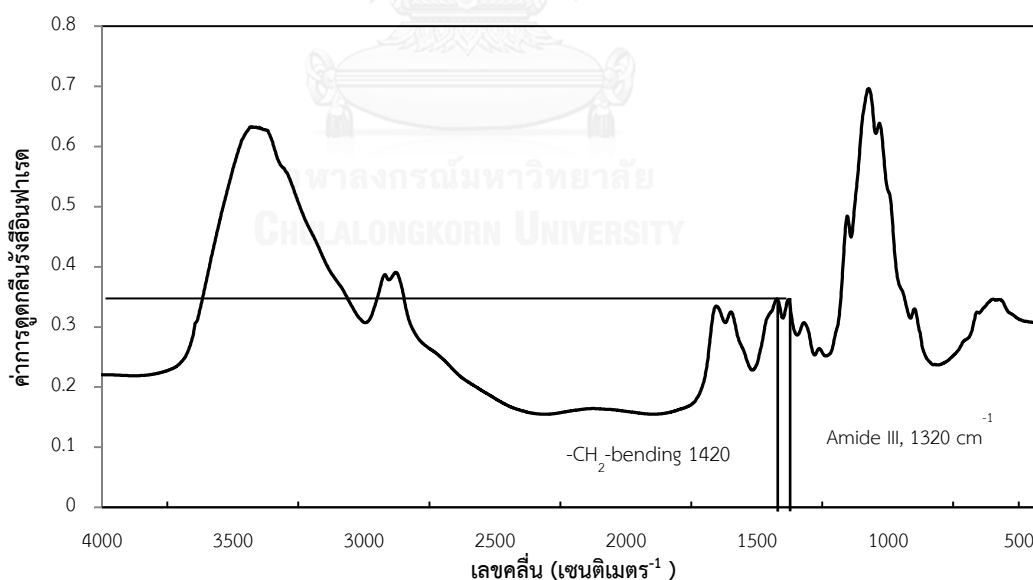
โดยที่

%DA คือ ร้อยละของการมีอยู่ของหมู่อะซิติก (degree of acetylation) ในโครงสร้างของไคโตซาน

%DD คือ ร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) ในโครงสร้างของไคโตซาน

A_{1320} คือ ตำแหน่งของการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1320 เซนติเมตร⁻¹ ของ Amide-III

A_{1420} คือ ตำแหน่งของการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1420 เซนติเมตร⁻¹ ของ CH_2 bending



รูปที่ จ. 1 ค่าการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันหลักของไคโตซาน

ตัวอย่างการคำนวณ

ของโคโตซานเริ่มต้นที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.25×10^5 ดาลตัน

ค่าการดูดกลืน ที่ A_{1320} เท่ากับ 0.32654

ค่าการดูดกลืน ที่ A_{1420} เท่ากับ 0.338848

จากนั้นเมื่อทำการ แทนในสมการที่ จ.1 จะได้

$$0.32654/0.338848 = 0.3822 + 0.03133DA$$

$$\text{ดังนั้น} \quad DA = 18.55974877$$

จากนั้นแทน % DA ลงในสมการที่ จ.2

$$\text{จะได้} \quad DD = 100 - 18.55974877$$

$$= 81.44 \%$$

ดังนั้นร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลของโคโตซานที่ค่าเท่ากับ 81.44



ภาคผนวก ฉ.

การวัดค่าศักย์เซต้า (Zeta Potential)

ศักย์เซต้า (Zeta Potential)

ค่าศักย์เซต้าคือ ค่าแตกต่างของค่าศักย์ไฟฟ้าระหว่างบริเวณพื้นผิวของอนุภาคกับชั้นของสารละลาย ซึ่งค่าศักย์เซต้า สามารถบ่งบอกได้ถึงการกระจายตัวของอนุภาคในสารละลายนั้นๆ โดยถ้าค่าศักย์เซต้าเป็นบวกหรือลบมาก แสดงถึงเกิดการกระจายตัวได้ดีของอนุภาค เนื่องจากเกิดการหักล้างของประจุทางไฟฟ้าส่งผลให้เกิดความเสถียรภาพของการกระจายตัว หากค่าศักย์เซต้าเป็นบวกหรือลบน้อย แสดงถึงการไม่มีเสถียรภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมตัวของอนุภาค และสามารถบ่งบอกชนิดประจุของอนุภาคเมื่ออยู่ในสารละลาย

หลักการทำงานของเครื่องวัดค่าศักย์เซต้า

การวัดค่าศักย์เซต้า เป็นการวัดอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคเมื่อที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยใช้เลเซอร์ทรอปเปอร์เวโลซิเมตรี (Laser Doppler Velocimetry (LDV)) โดยเครื่องวัดค่าศักย์เซต้า แสดงดังรูปที่ ฉ.1 ซึ่งตัวอย่างที่ใช้วัด อาทิเช่น สารแขวนลอย, ตัวอย่างพอลิเมอร์, ตัวอย่างยาและเครื่องสำอาง, และสี เป็นต้น โดยตัวอย่างต้องเจือจางอยู่ในของเหลว แล้วบรรจุลงใส่ในภาชนะบรรจุตัวอย่าง ดังรูปที่ ฉ.2 ปิดฝาให้สนิทก่อนนำมาใส่ในเครื่องวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้า

ผลการวิเคราะห์

สารละลายเมื่อมีพีเอชเป็นกรด ค่าศักย์เซต้าจะมีค่าเป็นบวก เนื่องจากในสารละลายมีอนุภาคที่แตกตัวให้ประจุบวกอยู่มากกว่าประจุลบ แต่หากค่าพีเอชเป็นด่าง จะให้ผลลัพธ์ในทางตรงกันข้าม และเมื่อค่าศักย์เซต้าเป็นศูนย์ แสดงถึงการเกิดสมดุลระหว่างประจุบวกและลบในสารละลาย



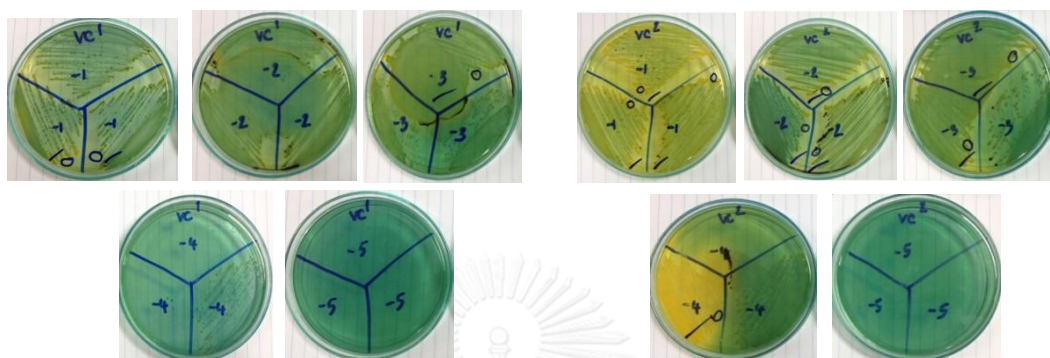
รูปที่ ๑. 1 เครื่องวัดค่าศักย์เซต้า



รูปที่ ๑. 2 ภาพขณะบรรจุตัวอย่างสำหรับวัดค่าศักย์เซต้า

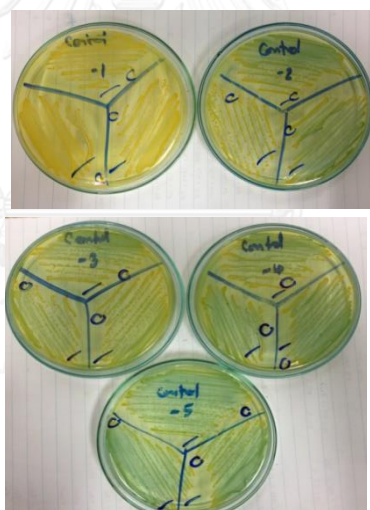
ภาคผนวก ข.
การทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholera*)

รูปของเชื้อไวรัส คอเลราในการเพาะเชื้อในกึ่งสตรเริ่มต้น



Vibrio cholerae 10 cfu/ml, 0 week

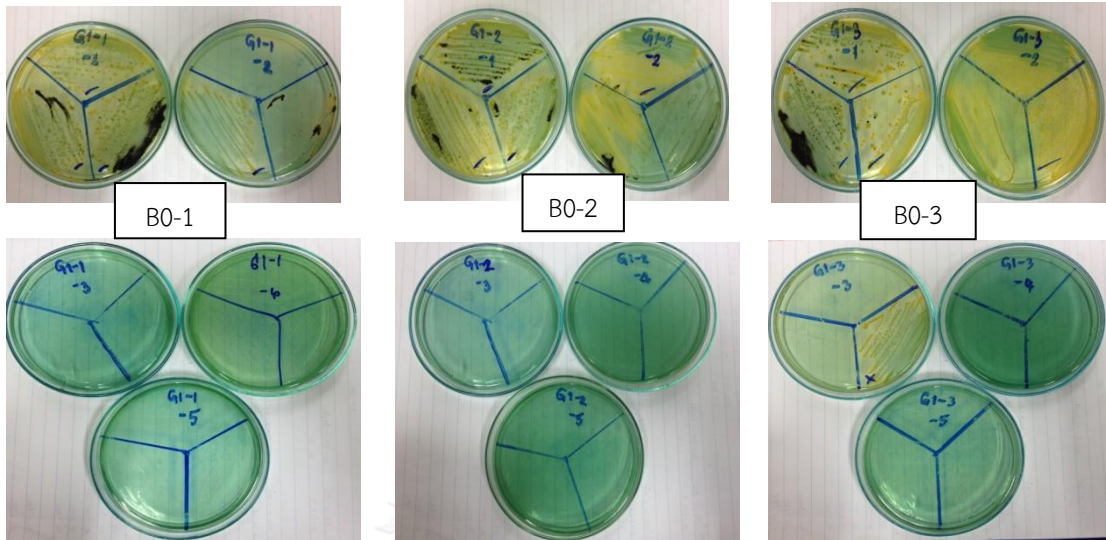
Vibrio cholerae 10² cfu/ml, 0 week



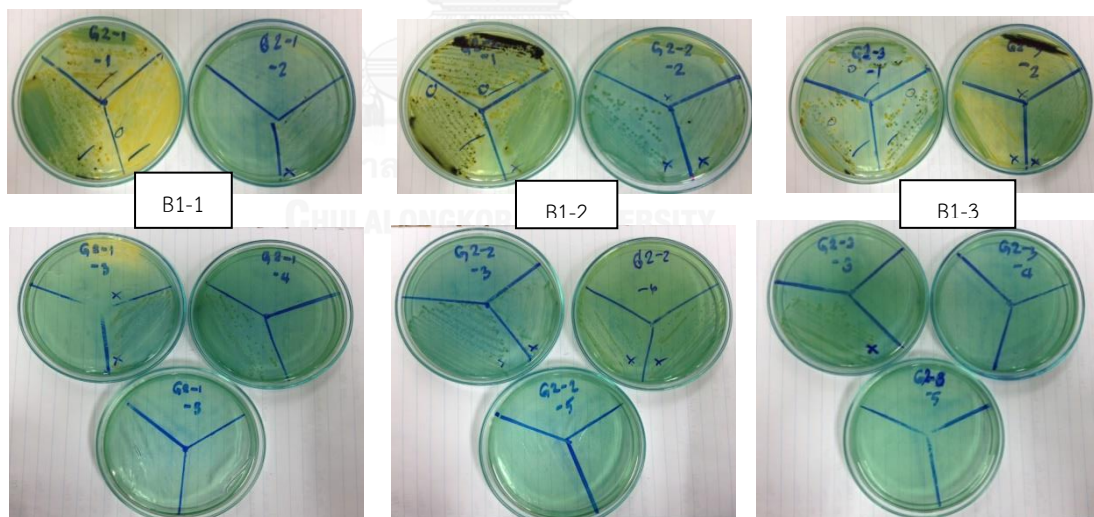
Vibrio cholerae 10² cfu/ml, 1 week

รูปที่ ข. 1 โคโลนิของเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholerae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10 และ 10² ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ที่ 0 สัปดาห์ และที่ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้น 10² ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาแช่แข็ง 1 สัปดาห์

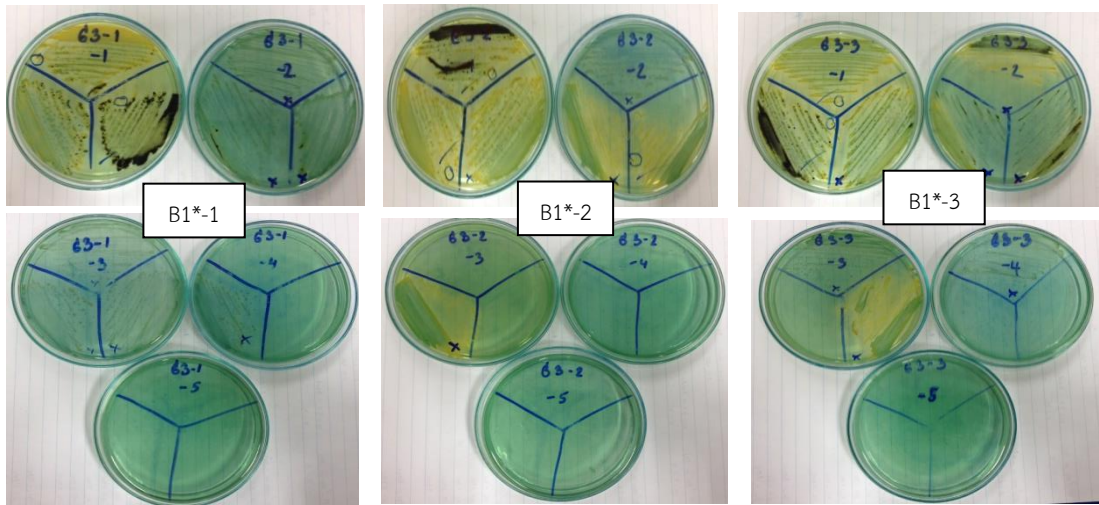
รูปของเชื้อไวรัส คอเลราหลังจากผ่านการทดสอบยับยั้งเชื้อด้วยสารละลายโคโตซาน



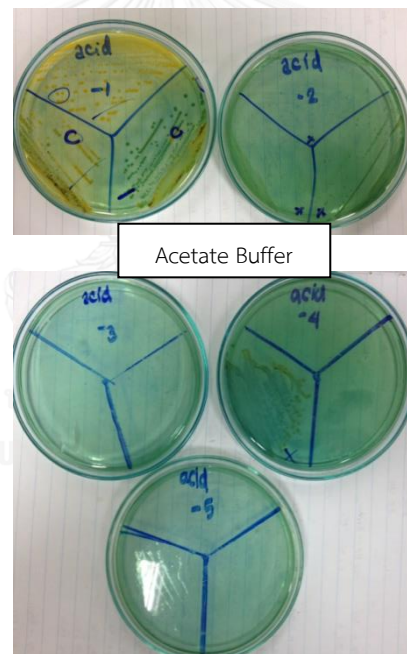
รูปที่ ข. 2 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholerae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่านการยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B0-1 ถึง B0-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 1 สัปดาห์



รูปที่ ข. 3 โคโลนีของเชื้อไวรัส คอเลรา (*vibrio cholerae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่านการยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B1-1 ถึง B1-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ ข. 4 โคลนิจของเชื้อไวรัส คอลเลรา (*vibrio cholerae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่านการยับยั้งในสารละลายโคโตซานสูตร B1*-1 ถึง B1*-3 ที่แช่แข็งเป็น ระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ ข. 5 โคลนิจของเชื้อไวรัส คอลเลรา (*vibrio cholerae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA หลังผ่านการยับยั้งในสารละลายอะซิเตรท

ตารางที่ ข. 1 ปริมาณของเชื้อหลังจากการทำยับยั้งเชื้อด้วยสารละลายไคโตซานในห้องปฏิบัติการ

น้ำหนัก โมเลกุลของไค โตซาน (M _w)	ปริมาณเชื้อที่ปรากฏหลังจากการยับยั้งเชื้อด้วยสารละลายไคโตซานที่ความ เข้มข้นต่างๆ (x 10 ⁵ cfu/ml)			
	0 ppm	1,250 ppm	2,500 ppm	5,000 ppm
3.25 x 10 ⁵	-	4.73 ± 0.51	4.97 ± 0.37	3.33 ± 0.49
2.98 x 10 ⁵	-	-	0.67 ± 0.12*	-
2.36 x 10 ⁵	-	-	0.55 ± 0.07*	-
4.8 x 10 ⁴	-	6.97 ± 2.01	5.10 ± 0.44	0.67 ± 0.23*
4.6 x 10 ⁴	-	7.00 ± 1.00	4.77 ± 0.67	4.73 ± 0.12
2.8 x 10 ⁴	-	5.70 ± 0.92	5.30 ± 1.08	4.07 ± 0.57
Acetate buffer	9.27 ± 0.87	-	-	-
No-chitosan	9.93 ± 1.15	-	-	-

หมายเหตุ ; - แทน ไม่ได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นนั้นๆ

* แทนค่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≥ 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่
ความเข้มข้นเท่ากัน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกรกต ศุภนคร เกิดเมื่อวันที่ 4 มิถุนายน พ.ศ. 2533 ที่อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสิงห์บุรี จังหวัดสิงห์บุรี ในปีการศึกษา 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมวัสดุ สาขาวิชาปิโตรเคมีและวัสดุพอลิเมอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555

การเผยแพร่วิทยานิพนธ์ทางสื่อสิ่งพิมพ์และอิเล็กทรอนิกส์

- Goragot Supanakorn and Sorada Kanokpanont, “ Physical-chemical characteristics of chitosan-carboxymethyl cellulose edible films”, The Pure and Applied Chemistry International Conference 2014, (PACCON2014), Khon Kaen, 8 – 10 January 2014

- Goragot Supanakorn and Sorada Kanokpanont, “The effect of heat treatment on molecular weight and physical-chemical characteristics of chitosan”, The international Bioscience Conference and The 5th joint International PSU-UNS Bioscience Conference 2014, (IBSC2014), Phuket , 29 – 30 September 2014

รางวัลที่ได้รับ

- รางวัล Outstanding oral presentation ผลงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The international Bioscience Conference and The 5th joint International PSU-UNS Bioscience Conference 2014” จังหวัดภูเก็ต

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

- ทุนโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-พวอ. ระดับปริญญาโท สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับบริษัท มารีน ไบโอ รีซอสเซส จำกัด หมายเลขทุน MSD5610009 พ.ศ. 2556 ระยะเวลาทุน 1 ปี ภายใต้หัวข้อโครงการ " ผลของการลดน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่มีผลต่อการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในกุ้งสด"