

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวัสดุจากอาหารแช่แข็งจำพวกเปลือกกุ้ง เปลือกปู
สำหรับเป็นวัสดุธรรมชาติที่ปลอดภัยเพื่อเติมแต่งคุณค่าและรักษาคุณภาพอาหาร
Development of solid waste materials from shrimp shells and crab shells
for using as non-toxic natural materials for food: Nutrient additive and preservation

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. สุวบุญ จิรชาญชัย

(วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: หัวหน้าโครงการ)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักรอง ยกสำน

(ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: ผู้ร่วมโครงการ)

รองศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย สติรกุล

(ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: ผู้ร่วมโครงการ)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐ พิษณุางกูร

(ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: ผู้ร่วมโครงการ)

อาจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารษาเวก

(ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: ผู้ร่วมโครงการ)

ดร. วรณนพ วิเศษสงวน

(ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ: ผู้ร่วมโครงการ)

วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทสรุปผู้บริหาร

Executive Summary

รายงานฉบับสมบูรณ์นี้ประกอบด้วยเนื้อหาทั้งหมด 9 บท บทที่ 1 เป็นบทนำที่กล่าวถึงที่มาของโครงการฯ การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง กรอบแนวคิด วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการวิจัย สำหรับบทที่ 2-9 เป็นส่วนของผลงานวิจัย ที่หัวหน้าคณะวิจัยได้ประมวลผลการวิจัยจากผู้ร่วมวิจัยแต่ละท่าน ทั้งนี้ เพื่อให้สะดวกและเข้าใจง่ายต่อพื้นฐานขององค์ความรู้ในแต่ละส่วน จึงได้จัดให้แต่ละบทเป็นส่วนของการวิจัยในแต่ละเรื่องซึ่งครอบคลุมตั้งแต่บทนำ วิธีการทดลอง ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการทดลอง และเอกสารอ้างอิง

ทั้งนี้ บทที่ 2 กล่าวถึงการเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในรูปแบบต่างๆ ในการเป็นสารเติมแต่งอาหาร พร้อมทั้งการพิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมี กายภาพ และสมบัติจำเพาะต่างๆ บทที่ 3 กล่าวถึงการทดสอบความปลอดภัยของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้ในสัตว์ทดลอง เพื่อจะเป็นข้อมูลว่าอนุพันธ์ที่เตรียมได้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค บทที่ 4 กล่าวถึงความปลอดภัยของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในเซลล์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลในระดับเซลล์ของมนุษย์ว่ามีความปลอดภัยระดับใด บทที่ 5 กล่าวถึงคุณสมบัติด้านการต้านจุลชีพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน ที่จะนำไปสู่การศึกษาอย่างเป็นรูปธรรมในการยับยั้งจุลชีพในอาหาร บทที่ 6-9 เป็นตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้จากโครงการวิจัยฯ ในรูปของสารเติมแต่งในอาหาร ซึ่งเป็นรูปธรรมของการสร้างคุณค่าและมูลค่าเพิ่มของไคติน-ไคโตซานในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งเป็นเป้าหมายสูงสุดของโครงการฯ

กิตติกรรมประกาศ

Acknowledgements

คณะวิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551 โครงการวิจัยเสนอสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วว.) ที่ได้สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย และขอบคุณส่วนส่งเสริมและพัฒนาวิจัย สำนักบริหารวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการประสานงานเพื่อให้โครงการวิจัยดำเนินได้อย่างราบรื่น

ในโอกาสนี้ ผู้วิจัยในคณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานต้นสังกัดของตนที่อำนวยความสะดวกในการทดลอง ทั้งในเรื่องสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ผู้ประสานงานระดับต่างๆ

หัวหน้าคณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณวิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี ในทุกๆด้านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยดำเนินได้ตามเป้าหมาย และใคร่ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความสำคัญของโครงการวิจัยนี้อย่างเสมอมา

คำนำ

Preface

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาวัสดุจากอาหารแช่แข็งจำพวกเปลือกกุ้ง เปลือกปู สำหรับเป็นวัสดุธรรมชาติที่ปลอดภัยเพื่อเติมแต่งคุณค่าและรักษาคุณภาพอาหาร (Development of solid waste materials from shrimp shells and crab shells for using as non-toxic natural materials for food: Nutrient additive and preservation) ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551 โครงการวิจัยเสนอสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วว) โดยเนื้อหาของวิจัยประกอบด้วยเนื้อหาทั้งหมด 9 บท บทที่ 1 เป็นบทนำที่กล่าวถึงที่มาของโครงการฯ การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง กรอบแนวคิด วัตถุประสงค์และขอบเขตของโครงการวิจัย สำหรับบทที่ 2-9 เป็นส่วนของผลงานวิจัย ที่หัวหน้าคณะวิจัยได้ประมวลผลการวิจัยจากผู้ร่วมวิจัยแต่ละท่าน ทั้งนี้ เพื่อให้สะดวกและเข้าใจง่ายต่อพื้นฐานขององค์ความรู้ในแต่ละส่วน จึงได้จัดให้แต่ละบทเป็นส่วนของการวิจัยในแต่ละเรื่องซึ่งครอบคลุมตั้งแต่บทนำ วิธีการทดลอง ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการทดลอง และเอกสารอ้างอิง

ทั้งนี้ บทที่ 2 กล่าวถึงการเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในรูปแบบต่างๆ ในการเป็นสารเติมแต่งอาหาร พร้อมทั้งการพิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมี กายภาพ และสมบัติจำเพาะต่างๆ บทที่ 3 กล่าวถึงการทดสอบความปลอดภัยของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้ในสัตว์ทดลอง เพื่อจะเป็นข้อมูลว่าอนุพันธ์ที่เตรียมได้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค บทที่ 4 กล่าวถึงความปลอดภัยของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในเซลล์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลในระดับเซลล์ของมนุษย์ว่ามีความปลอดภัยระดับใด บทที่ 5 กล่าวถึงคุณสมบัติด้านการต้านจุลชีพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน ที่จะนำไปสู่การศึกษาอย่างเป็นรูปธรรมในการยับยั้งจุลชีพในอาหาร บทที่ 6-9 เป็นตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้จากโครงการวิจัยฯ ในรูปของสารเติมแต่งในอาหาร ซึ่งเป็นรูปธรรมของการสร้างคุณค่าและมูลค่าเพิ่มของไคติน-ไคโตซานในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งเป็นเป้าหมายสูงสุดของโครงการฯ

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้สนใจวัสดุไคติน-ไคโตซาน และหากรายงานมีข้อผิดพลาดประการใด ต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
บทสรุปผู้บริหาร	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
คำนำ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญแผนภาพ	xi
สารบัญรูปภาพ	xii
สารบัญตาราง	xix
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.1.1 ไคติน-ไคโตซาน	
1.1.2 การใช้ไคติน-ไคโตซานเพื่อการถนอมอาหาร	
1.1.3 การใช้ไคติน-ไคโตซานเพื่อผลิตอาหารควบคุมน้ำหนัก และลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด	
1.1.4 การใช้ไคโตซานเป็นสารเติมแต่ง	
1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	
1.5 เอกสารอ้างอิง	
บทที่ 2 การเตรียมและการวิเคราะห์ตรวจสอบอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน	9
2.1 บทนำ	
2.2 วิธีการทดลอง	
2.2.1 การเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน	
2.2.1.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)	
2.2.1.2 ไคตินวิสเกอร์ (chitin whisker)	
2.2.1.3 ไคโตซานวิสเกอร์ (chitosan whisker)	
2.2.1.4 ออลิโกไคโตซาน (oligochitosan)	
2.2.2 การวิเคราะห์และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน	
2.2.3 การตรวจสอบองค์ประกอบของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน	

- 2.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น
- 2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า
- 2.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
- 2.2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
- 2.2.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

2.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

- 2.3.1 การเตรียม การวิเคราะห์ และการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซาน
 - 2.3.1.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)
 - 2.3.1.2 ไคตินวิสเกอร์
 - 2.3.1.3 ไคโตซานวิสเกอร์
 - 2.3.1.4 ออลิโกไคโตซาน
- 2.3.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซาน
- 2.3.3 การกำหนดคุณลักษณะเฉพาะ (specification) ของสารตัวอย่างไคโตซาน
 - 2.3.3.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)
 - 2.3.3.2 ไคตินวิสเกอร์ (chitin whisker)
 - 2.3.3.3 ไคโตซานวิสเกอร์ (chitosan whisker)
 - 2.3.3.4 ออลิโกไคโตซาน (oligochitosan)

2.4 บทสรุป

2.5 เอกสารอ้างอิง

บทที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลอง ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน 39

3.1 บทนำ

3.2 วิธีการทดลอง

- 3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง
- 3.2.2 การเตรียมสารตัวอย่างและการป้อนสารตัวอย่างกำหนดทดลองผ่านทางปาก (administration)
- 3.2.3 การสังเกต
 - 3.2.3.1 น้ำหนักตัวหนูทดลอง
 - 3.2.3.2 การตรวจสอบชิ้นเนื้อ

3.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.4	สรุปผลการทดลอง	
3.5	เอกสารอ้างอิง	
บทที่ 4	การทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซานในเซลล์ที่ทดลองจากเนื้อเยื่อ	48
	ประสาน	
4.1	บทนำ	
4.2	วิธีการทดลอง	
4.2.1	การเพาะเลี้ยงเซลล์	
4.2.2	การวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Chorionic derived Stem Cells (CSCs cell cytotoxicity)	
4.2.3	การวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Periosteal derived Stem Cells (POCs cell cytotoxicity)	
4.3	ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
4.3.1	ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Chorionic derived Stem Cells (CSCs cell cytotoxicity)	
4.3.2	ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Periosteal derived Stem Cells (POCs cell cytotoxicity)	
4.4	สรุปผลการทดลอง	
4.5	เอกสารอ้างอิง	
บทที่ 5	การทดสอบกิจกรรมการต้านจุลชีพของอนุพันธ์ไคติน-ไกลโคซาน	59
5.1	บทนำ	
5.2	วิธีการทดลอง	
5.2.1	การทดสอบกิจกรรมการต้านแบคทีเรียและยีสต์	
5.2.2	การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา	
5.2.2.1	การเตรียมเชื้อรา	
5.2.2.2	การเตรียมสารละลายสปอร์	
5.2.2.3	การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา	
5.2.2.4	วิธีการทดสอบ	
5.3	ผลการทดลองและอภิปราย	
5.3.1	การทดสอบกิจกรรมการต้านแบคทีเรียและยีสต์	
5.3.2	การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา	
5.4	สรุปผลการทดลอง	

5.5 เอกสารอ้างอิง

บทที่ 6 การศึกษาเบื้องต้นของการประยุกต์ใช้โคโคซานวิสเกอร์ในขนมสาเล่	72
6.1 บทนำ	
6.2 วิธีการทดลอง	
6.2.1 การเตรียมขนมสาเล่	
6.2.2 การตรวจสอบสมบัติและลักษณะทางกายภาพของขนมสาเล่	
6.2.2.1 การตรวจสอบค่า water activity	
6.2.2.2 การตรวจสอบค่าสี	
6.2.3 การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัส	
6.2.4 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา	
6.2.4.1 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด	
6.2.4.2 การตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา	
6.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
6.3.1 ลักษณะทางกายภาพของขนมสาเล่	
6.3.2 ค่า water activity ของขนมสาเล่	
6.3.3 สีของขนมสาเล่	
6.3.4. คุณลักษณะเนื้อสัมผัส	
6.3.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา	
6.4 สรุปผลการทดลอง	
6.5 เอกสารอ้างอิง	
บทที่ 7 การศึกษาเบื้องต้นของการประยุกต์ใช้อนุพันธ์ไคติน-โคโคซานในถั่วกวน	88
7.1 บทนำ	
7.2 วิธีการทดลอง	
7.2.1 การเตรียมตัวอย่าง	
7.2.2 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา	
7.2.2.1 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด	
7.2.2.2 การตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา	
7.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
7.4 สรุปการทดลอง	
7.5 เอกสารอ้างอิง	

บทที่ 8 การประยุกต์ใช้นาโนไคโตซานวิสเกอร์ระบบน้ำในอาหาร: กรณีศึกษาเพื่อเพิ่มคุณภาพของกุ้งทะเล

95

8.1 บทนำ

8.2 วิธีการทดลอง

8.2.1 การทรีทตัวอย่างกุ้งขาวด้วยสารไคติน-ไคโตซานในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำ

8.2.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของกุ้งที่ผ่านการทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซาน

8.2.3 การติดตามการแพร่ผ่านของไคโตซานวิสเกอร์ภายในโครงสร้างกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้ง

8.2.4 การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้งที่ผ่านการทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซาน

8.2.5 การตรวจสอบเสถียรภาพทางความร้อนของกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้งที่ผ่าน

การทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซาน

8.2.6 การตรวจสอบสีของกุ้งที่ผ่านการทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซานและผ่านความร้อน

8.2.7 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน

8.2.8 การวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค (microstructure) ของตัวอย่างกุ้ง

8.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

8.3.1 ผลของชนิดสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำต่อคุณภาพของกุ้ง

8.3.2 ผลของความเข้มข้นของไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (w/v) ต่อคุณภาพของกุ้ง

8.3.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตและค่าพีเอชของระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ ต่อคุณภาพของกุ้ง

8.3.4 ผลของศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างโซเดียมไบคาร์บอเนตและค่าพีเอชที่มีต่อคุณภาพต่อคุณภาพของกุ้ง

8.4 สรุปผลการทดลอง

8.5 เอกสารอ้างอิง

**บทที่ 9 การประยุกต์ใช้นิวคลีโอไทด์ในกระบวนการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และ
ยีสต์อายุ การเก็บรักษา : กรณีต้นแบบศึกษาของหมูปด**

123

9.1 บทนำ

9.2 วิธีการทดลอง

9.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

9.2.2 การตรวจสอบศักย์ซีต้า (Zeta-potential)

9.2.3 การตรวจสอบพื้นที่ผิวของสาร ไคติน-ไคโตซาน โดยใช้เทคนิคบลูเนอร์-
เอลเมท-เทลเลอร์ (Brunauer-Emmett-Teller, BET)

9.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

9.2.5 การวิเคราะห์ไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic Amine)

9.2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไขมัน โดยใช้เทคนิค
thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

9.2.7 การวิเคราะห์ออกซิเดชันของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE of
myofibrillar proteins

9.2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

9.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

9.3.1 การต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อหมูปด ของสารไคโตซานรูปแบบต่างๆ

9.3.2 ค่าศักย์ซีต้าของสารไคโตซานรูปแบบต่างๆ

9.3.3 ลักษณะทางกายภาพและพื้นที่ผิวของสารไคโตซานรูปแบบต่างๆ

9.3.4 ปริมาณไบโอเจนิคเอมีนในเนื้อหมูปดที่ผ่านการทรีทด้วยสารไคโตซาน
รูปแบบต่างๆ

9.3.5 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไขมันในเนื้อหมูปดที่ผ่านการทรีทด้วยสาร
ไคโตซานรูปแบบต่างๆ

9.3.6 การวิเคราะห์ออกซิเดชันของโปรตีนในเนื้อหมูปด โดยใช้เทคนิค SDS-
PAGE of myofibrillar proteins

9.4 สรุปผลการทดลอง

9.5 เอกสารอ้างอิง

สารบัญแผนภาพ

	หน้าที่
แผนภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงความสำคัญ และปัญหาที่นำไปสู่การวิจัย	3
แผนภาพที่ 2.1 การเตรียม Phcts, mPEG-COOH และ Phcts-g-mPEG	10
แผนภาพที่ 2.2 การเตรียมโพลีไดนิวิสเกอร์	12
แผนภาพที่ 2.3 การเตรียมโพลีโตซานวิสเกอร์	13
แผนภาพที่ 2.4 การก่อตัวของอนุภาคกลมนาโนโพลีโตซาน (Phcts-g-mPEG)	20

สารบัญรูปลูกภาพ

	หน้าที่
รูปที่ 2.1 สเปกตรัม FTIR ของ (a) mPEG (b) mPEG-COOH (c) chitosan (d) Phcts และ (e) Phcts-g-mPEG	17
รูปที่ 2.2 สเปกตรัม ¹ H NMR ของ (a) mPEG (b) mPEG-COOH (c) chitosan (d) Phcts และ (e) Phcts-g-mPEG	18
รูปที่ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของ (a) ไคโตซานในน้ำ (b) Phcts-g-mPEG ในน้ำ และ (c) Phcts-g-mPEG ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1%	19
รูปที่ 2.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ 25 กิโลโวลต์ของ (a) ไคโตซาน (15,000×) (b) Phcts-g-mPEG (50,000×) และ (c) Phcts-g-mPEG (20,000×)	20
รูปที่ 2.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ Phcts-g-mPEG	20
รูปที่ 2.6 ดิฟแฟรคโตแกรม XRD ของ Phcts-g-mPEG	21
รูปที่ 2.7 เทอร์โมแกรม TGA ของ (a) ไคโตซาน (b) Phcts และ (c) Phcts-g-mPEG	22
รูปที่ 2.8 เทอร์โมแกรม DSC ของ Phcts-g-mPEG เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 150 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 3 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min	22
รูปที่ 2.9 ลักษณะทางกายภาพของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์ในน้ำ	23
รูปที่ 2.10 สเปกตรัม FTIR ของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์	23
รูปที่ 2.11 ดิฟแฟรคโตแกรม XRD ของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์	24
รูปที่ 2.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์	24
รูปที่ 2.13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไคตินวิสเกอร์	24
รูปที่ 2.14 เทอร์โมแกรม DSC ของไคตินวิสเกอร์ เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 150 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 3 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min	25
รูปที่ 2.15 สเปกตรัม FTIR ของ (a) ไคติน (b) ไคตินวิสเกอร์ (c) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (d) ไคโตซาน (95%DD)	26
รูปที่ 2.16 สเปกตรัม ¹ H NMR ของไคโตซานวิสเกอร์	26
รูปที่ 2.17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไคโตซานวิสเกอร์	27

รูปที่ 2.18	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไคโตซานวิสเกอร์	27
รูปที่ 2.19	ดิฟแฟรกโตแกรม XRD ของไคโตซานวิสเกอร์	28
รูปที่ 2.20	เทอร์โมแกรม DSC ของไคโตซานวิสเกอร์ เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min	28
รูปที่ 2.21	ลักษณะทางกายภาพของออลิโกไคโตซาน	29
รูปที่ 2.22	สเปกตรัม FTIR ของออลิโกไคโตซาน	29
รูปที่ 2.23	สเปกตรัม ¹ H NMR ของออลิโกไคโตซาน	30
รูปที่ 2.24	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของออลิโกไคโตซาน	30
รูปที่ 2.25	ดิฟแฟรกโตแกรม XRD ของออลิโกไคโตซาน	31
รูปที่ 2.26	เทอร์โมแกรม TGA ของออลิโกไคโตซาน	31
รูปที่ 2.27	การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min	32
รูปที่ 4.1	ผลของออลิโกไคโตซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	51
รูปที่ 4.2	ผลของไคตินวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	52
รูปที่ 4.3	ผลของไคโตซานวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	53
รูปที่ 4.4	ผลของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	53
รูปที่ 4.5	ผลของออลิโกไคโตซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	54
รูปที่ 4.6	ผลของไคตินวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10 ⁵ เซลล์/หลุม	55

รูปที่ 4.7 ผลของไคโตซานวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^7 เซลล์/หลุม	56
รูปที่ 4.8 ผลของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^7 เซลล์/หลุม	57
รูปที่ 5.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคตินวิสเกอร์	66
รูปที่ 5.2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคโตซานวิสเกอร์	67
รูปที่ 5.3 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคโตซานนาโนสเฟียร์	68
รูปที่ 5.4 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของออลิโกไคโตซาน	69
รูปที่ 5.5 ผลการยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ ของ (A) ไคตินวิสเกอร์ (B) ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (C) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (D) ออลิโกไคโตซาน	70
รูปที่ 6.1 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของขนมสาเก้ชูดควบคุมและขนมสาเก้ชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ (0.3, 0.6 และ 1.5 %w/w) เมื่อมีการผันแปรเวลาในการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกใสพอลิสไตรีน ที่อุณหภูมิห้อง	82
รูปที่ 6.2 ยีสต์และราที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ของขนมสาเก้ชูดควบคุมและขนมสาเก้ชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ (0.3, 0.6 และ 1.5 %w/w) เมื่อมีการผันแปรเวลาในการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกใสพอลิสไตรีน ที่อุณหภูมิห้อง	84
รูปที่ 6.3 ลักษณะทางกายภาพของของขนมสาเก้ชูดภายหลังจากเก็บรักษาในกล่องพลาสติกใสพอลิสไตรีน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (ไม่นับวันที่ผลิต) (a) ขนมสาเก้ชูดควบคุม และ (b)-(d) ขนมสาเก้ชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ; (b) 0.3, (c) 0.6 และ (d) 1.5 %w/w	85
รูปที่ 7.1 Total Viable Bacterial counts (log CFU/g) ของตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ: ■:2 วัน และ □:3 วัน	91
รูปที่ 7.2 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างถั่วกวนชูดควบคุมและชูดที่มีการเติมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ	92

- รูปที่ 7.3** ยีสต์และราที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างถั่วกวนหุคควบคุมและชุดที่มีการเติมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ 93
- รูปที่ 7.4** ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ 93
- รูปที่ 8.1** ลักษณะทางกายภาพของสารแขวนลอย (a) ไคโตซานเกรด, (b) ไคตินวิสเกอร์, (c) ไคโตซานวิสเกอร์, และ (d) ออลิโกไคโตซาน 97
- รูปที่ 8.2** (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% (w/v) ในระบบที่ไม่มี (□) และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (☒) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ 101
- รูปที่ 8.3** ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกึ่งที่แช่สารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์, ไคโตซานวิสเกอร์, และออลิโกไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05 % (w/v) ในระบบที่มี (□) และไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5% NaCl (☒) หลังการเก็บรักษา 24 ชั่วโมง ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ ค่าของการเบี่ยงเบน ($n=5$) 103
- รูปที่ 8.4** ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% (w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ. 4. องศาเซลเซียส นาน 0-48 ชั่วโมง □:0 ชั่วโมง ☒:24 ชั่วโมง และ ☒:48 ชั่วโมง ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ 104
- รูปที่ 8.5** เทอร์โมแกรม TGA ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคติน-ไคโตซาน ในระบบที่มีและไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์: — ชุดควบคุม —: CTWK เข้มข้น 0.05% - -: CSWK เข้มข้น 0.05%: OligoCS เข้มข้น 0.05% —: CTWK เข้มข้น 0.05% ที่มีการเติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% - -: CSWK เข้มข้น 0.05% ที่มีการเติมเกลือโซเดียม 106

- รูปที่ 8.6** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM-EDX) แสดงการกระจายตัวของคอปเปอร์ในตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ของ (a) ชูดควบคุม (b) CSWK- CuSO_4 และ (c) CSWK- CuSO_4 ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 107
- รูปที่ 8.7** (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกึ่งชูดควบคุม ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของสารละลายฟอสเฟต (3.5% w/v) และเกลือ (2.5% w/v) และตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) 109
- รูปที่ 8.8** ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกึ่งชูดควบคุม ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของสารละลายฟอสเฟต (3.5% w/v) และเกลือ (2.5% w/v) และตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) 111
- รูปที่ 8.9** (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการผันแปรพีเอชของระบบ: □:pH 6 ▣:pH 7 และ ▤:pH 8 ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ 112
- รูปที่ 8.10** ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการผันแปรพีเอชของระบบ: □:pH 6 ▣:pH 7 และ ▤:pH 8 ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ 114
- รูปที่ 8.11** (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกึ่งที่ 115

- ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)
- รูปที่ 8.12** ค่าแรงเหวี่ยงของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) 117
- รูปที่ 8.13** เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนในสารแช่ตัวอย่างกึ่งชนิดต่างๆ: M: Standard marker แถบที่1: โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% แถบที่2: โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ที่มีการปรับพีเอช = 8 แถบที่3: กลีเซอโรล โซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และสารละลายฟอสเฟตผสม (3.5% w/v) และแถบที่4: สารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ (0.25 % w/v) ที่มีกลีเซอโรล โซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% และมีการปรับพีเอช = 8 118
- รูปที่ 8.14** ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวอย่างกล้ามเนื้อกึ่งในทิศทางตามยาวของกึ่งที่ผ่านการให้ความร้อน โดยตัวอย่างที่นำมาส่องกล้องได้ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ: (a) ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่สาร (b) ตัวอย่างที่ผ่านการแช่กลีเซอโรล โซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และสารละลายฟอสเฟตผสม (3.5% w/v) และ (c) ตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) และ โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ที่มีการปรับพีเอช = 8 (S = Sarcomere, Z = Z line) 120
- รูปที่ 9.1** Total Viable Bacteria counts (log CFU/g) ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมสารตัวอย่างโคโคซานชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้น 0.25% (w/w) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C: ■: ตัวอย่างควบคุม □: โคโคซานน้ำหนักโมเลกุลสูง ▨: โคโคซานวิสเกอร์ และ ▩: ออลิโกโคโคซาน 128
- รูปที่ 9.2** จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในเนื้อหมูปด ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างเนื้อหมูปดชุดควบคุมและชุดที่มีการเติมสารตัวอย่างโคโคซานชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.25% (w/w) ภายใต้อากาศที่มีก๊าซออกซิเจน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C : (a) ตัวอย่างควบคุม (b) โคโคซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (c) ออลิโกโคโคซาน และ (d) โคโคซานวิสเกอร์ 129
- รูปที่ 9.3** Total Viable Bacteria Counts (log CFU/g) ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมสารตัวอย่างโคโคซานที่มีการผันแปรชนิดและความเข้มข้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C: ■: ตัวอย่างควบคุม ●: ออลิโกโคโคซานเข้มข้น 0.1% ▲: ออลิโกโคโคซานเข้มข้น 0.2% ▼: ออลิโกโคโคซานเข้มข้น 0.4% ○: โคโคซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.1% △: โคโคซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.2% และ ▽: โคโคซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.4% 130
- รูปที่ 9.4** Microbial counts (log CFU/g) ชนิดต่างๆ: (a) Lactic acid bacteria (b) total *Staphylococcus* counts (c) total *Enterobacteriaceae* counts และ (d) total XLD counts ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมออลิโกโคโคซานที่มีความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่ 132

- อุณหภูมิ 4 °C : ■: ตัวอย่างควบคุม ▲: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ ▼: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4%
- รูปที่ 9.5** Microbial counts (log CFU/g) ชนิดต่างๆ: (a) Lactic acid bacteria (b) total *Staphylococcus* counts (c) total *Enterobacteriaceae* counts และ (d) total XLD counts ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ 0.4% (w/w) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C : (1) ตัวอย่างควบคุม (2): ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ (3): ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4% 134
- รูปที่ 9.6** ศักย์ซี้ด้าของสารตัวอย่างไคโตซานชนิดต่างๆ: ○: ไคโตซานวิสเกอร์ และ ■: ออลิโกไคโตซาน ในสารตัวกลางที่มีการผันแปรค่าพีเอช 137
- รูปที่ 9.7** ลักษณะทางกายภาพของสารตัวอย่างไคโตซานชนิดต่างๆ: (a) ไคโตซานน้ำหนักริมเลกุลสูง (b) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (c) ออลิโกไคโตซาน 138
- รูปที่ 9.8** พื้นที่ผิวของสารตัวอย่างไคโตซานชนิดต่างๆ: (a) ไคโตซานน้ำหนักริมเลกุลสูง (b) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (c) ออลิโกไคโตซาน 138
- รูปที่ 9.9** BAI ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมสารตัวอย่างไคโตซานที่มีการผันแปรชนิดและความเข้มข้น และผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ: ■: 0 วัน □: 1 วัน ▣: 2 วัน ▤: 3 วัน และ ▥: 7 วัน 138
- รูปที่ 9.10** TBARS ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมออลิโกไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ และผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ■: control ▲: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ ▼: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4% 141
- รูปที่ 9.11** SDS-PAGE patterns ของโปรตีนที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อหมูปดในระหว่างการเก็บรักษา (a) ภายใต้สภาวะที่ไม่มี β -mercaptoethanol (b) ภายใต้สภาวะที่มี β -mercaptoethanol: แถบที่ 0: protein marker; แถบที่ 1-3: ตัวอย่างควบคุม; แถบที่ 4-6: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 3 และ 7 วัน; แถบ 7-9: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4% ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 3 และ 7 วัน; MHC: myosin heavy chain 143

สารบัญตาราง

	หน้าที่
ตารางที่ 1.1 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่โคโคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต	5
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบและปริมาณขององค์ประกอบ ของอนุพันธ์โคโคติน-โคโคซาน	33
ตารางที่ 3.1 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นโคโคตินวิสเกอร์	43
ตารางที่ 3.2 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นโคโคซานวิสเกอร์	44
ตารางที่ 3.3 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นโคโคซานนาโนสเฟียร์	45
ตารางที่ 3.4 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นออลิโกโคโคซาน	46
ตารางที่ 5.1 สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ	61
ตารางที่ 5.2 สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ	64
ตารางที่ 6.1 ค่า water activity (a_w) ของขนมสาหร่ายที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ	76
ตารางที่ 6.2 ค่า L^* a^* และ b^* ของขนมสาหร่ายที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ	78
ตารางที่ 6.3 ค่าความแข็ง การเกาะรวมตัวกันของเจล การคืนตัวกลับ ความยากง่ายในการเคี้ยว และพลังงานในการเคี้ยวของขนมสาหร่ายที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ	80
ตารางที่ 6.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราของขนมสาหร่ายที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ	81
ตารางที่ 8.1 ค่า L^* a^* b^* และ ΔE ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยโคโคติน-โคโคซาน ระหว่างการเก็บรักษา 48 ชั่วโมง	105

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความหลากหลาย และอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรทางธรรมชาติ ที่เอื้อต่อการนำมาแปรรูปเป็นอาหาร ในบางฤดูกาลทรัพยากรดังกล่าวมีมากเกินไปจนเกินความต้องการ จึงจำเป็นต้องมีการแปรรูปเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา นอกจากนี้การปรับปรุงคุณภาพอาหารเพื่อประโยชน์และความปลอดภัยต่อสุขภาพเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นการใช้วัสดุธรรมชาติที่ปลอดภัย อาทิเช่น วัสดุไคติน-ไคโตซาน เพื่อเป็นสารเติมแต่งคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหารแทนสารเติมแต่งสังเคราะห์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ต้องให้ความสำคัญ ทั้งนี้วัสดุไคติน-ไคโตซานเป็นสารที่มีคุณค่าที่ได้มาจากการสกัดเปลือกกุ้ง เปลือกปู อันเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งและอาหารทะเลแปรรูป ซึ่งประเทศไทยมีอุตสาหกรรมดังกล่าวมาก เมื่อคำนึงถึงวัตถุดิบจากเปลือกกุ้ง ปู หรือแกนปลาหมึกที่ประเทศไทยมีข้อนี้อาจเปรียบแล้ว การนำสารไคติน-ไคโตซาน มาใช้ประโยชน์ หรือสร้างมูลค่าเพิ่มต่อประเทศ ทั้งระดับชาติและนานาชาติ จึงเป็นโจทย์วิจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการบูรณาการองค์ความรู้นี้ให้เป็นประโยชน์ต่อสังคมอย่างมากที่สุด

ในอดีตที่ผ่านมา ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำไคโตซานในรูปของสารละลายมาประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งและรักษาคุณภาพอาหารในด้านต่างๆ อาทิเช่น ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเต้าหู้ ใช้เป็นสารเพิ่มความใสในน้ำผลไม้ เนื่องจากไคโตซานชาติเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากที่สุดในโลก รองจากเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งมีสมบัติพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility)² ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (Non toxicity)³ เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity)⁴ สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากระบบได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง (Biodegradability)⁵ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเกี่ยวกับการละลาย และปัญหาด้านความหนืดที่สูงของไคโตซานมวลโมเลกุลสูงได้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต นอกจากนี้ในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายสายโซ่ไคติน-ไคโตซาน โดยตรง จึงทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายไคโตซานมวลโมเลกุลสูงและดูดซึมต่อไปได้

งานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นความสำคัญของการปรับปรุงวัสดุไคติน-ไคโตซานให้มีมวลโมเลกุลลดลง หรือให้เป็นอนุพันธ์ในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถละลายน้ำได้ (ออลิโกไคติน/ไคโตซาน) หรือสามารถแขวนลอยและกระจายตัวในน้ำได้ (นาโนไคติน/ไคโตซานในรูปแบบผงละเอียด และเส้นใยวิสเกอร์) ทั้งนี้ เพื่อเป็นการแก้ปัญหาของไคโตซานที่กล่าวไว้ข้างต้น และได้คำนึงถึงแนวทางการนำไคโตซานมาใช้ประโยชน์ในการบริโภคด้วยวิธีการใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหาร หรือสารถนอมอาหาร เนื่องจากไคโตซานจัดเป็นพอลิแซคคาไรด์จำพวกมิโน ซึ่งมีสมบัติพื้นฐานในเชิงการแพทย์ด้านการย่อยสลายในร่างกายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลต่ำจำพวกอะมิโนแซคคาไรด์ที่จำเป็น

บทที่ 2

การเตรียมและการวิเคราะห์ตรวจสอบอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

Preparation and characterization of chitin-chitosan derivatives

2.1 บทนำ

ไคติน-ไคโตซานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายโซ่ตรงที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคซามีน (D-glucosamine) และเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-กลูโคซิดิก (1,4-glycosidic bond) โดยทั่วไปไคตินและไคโตซานอยู่ในรูปโพลิเมอร์ของหน่วยย่อยสองชนิดดังกล่าว โพลิเมอร์จะถูกเรียกว่าไคติน เมื่อจำนวนหน่วยย่อยเอ็น-อะเซทิลกลูโคซามีนในโครงสร้างมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และเรียกว่าไคโตซาน เมื่อจำนวนหน่วยย่อยกลูโคซามีนมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล (degree of deacetylation, DD) ของโมเลกุลไคโตซานมากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายทั่วไปได้ ในขณะที่ไคโตซานสามารถละลายได้ในตัวทำละลายกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งเป็นผลมาจากการรับโปรตอนหรือการถูกโปรโตเนทของหมู่เอมิโน ($-NH_2$) เกิดเป็นเกลือแอมโมเนียม ($-NH_3^+$) ซึ่งไปขัดขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อความแรงของพันธะดังกล่าวลดลง การละลายของไคโตซานจึงดีขึ้น ถึงแม้ว่าไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ แต่การประยุกต์หรือการใช้ประโยชน์ของสารละลายไคโตซานในกรดอินทรีย์สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ยา และคอสมेटิกสันั้นยังมีข้อจำกัด ทั้งในเรื่องของกลิ่น รสชาติ และอาการแพ้ เป็นต้น นอกจากนี้สารละลายไคโตซานในตัวทำละลายกรดอินทรีย์เจือจางยังมีความหนืดสูงอีกด้วย จึงส่งผลต่อการใช้งาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ต้องการใช้สารละลายไคโตซานที่มีความเข้มข้นสูงในกระบวนการผลิต ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย เนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสายโซ่ไคติน-ไคโตซานได้โดยตรง จึงทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมสารดังกล่าวได้

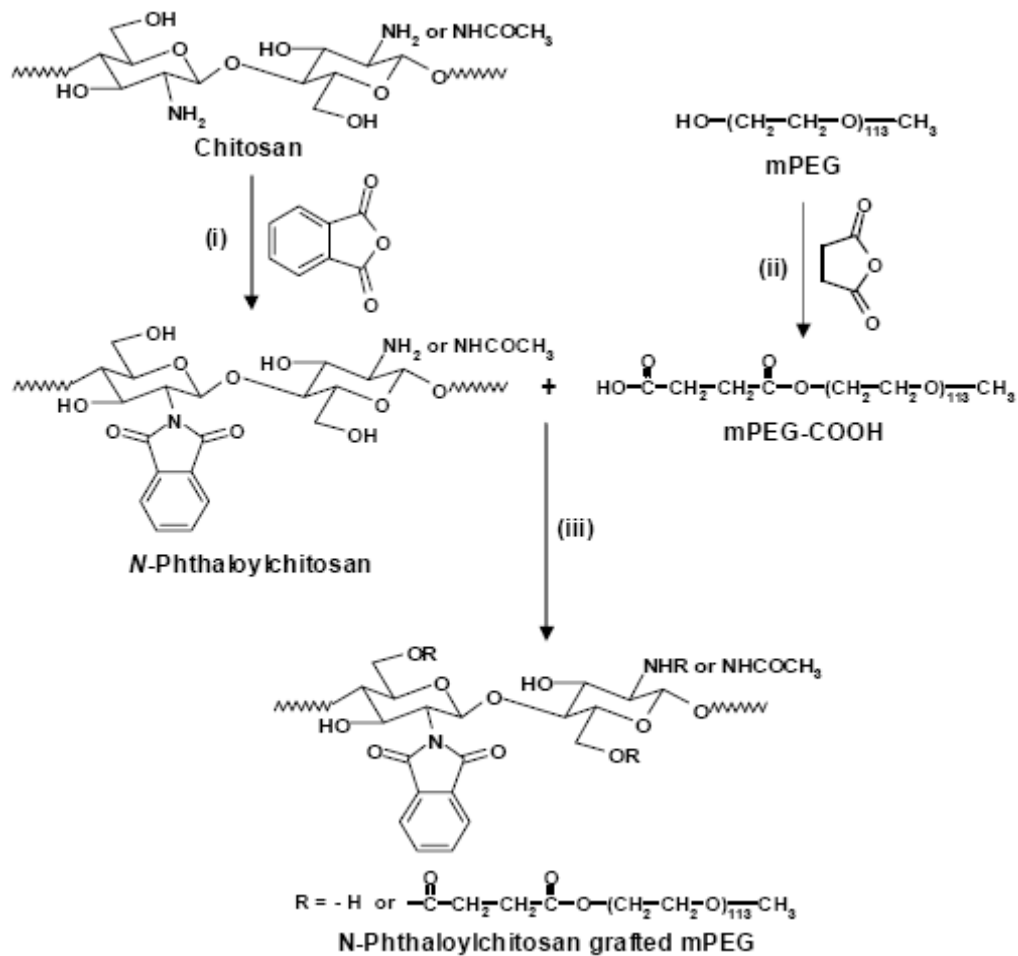
งานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นความสำคัญของการลดมวลโมเลกุลของไคติน-ไคโตซานหรือการเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในรูปแบบต่างๆ ให้เป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ หรือแขวนลอยกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ทั้งนี้เพื่อแก้ปัญหของไคติน-ไคโตซานที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยเนื้องานในบทนี้จะกล่าวถึงการเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน และการพิสูจน์เอกลักษณ์ ตลอดจนการตรวจสอบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้ อนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้จากโครงการวิจัยนี้มีจำนวน 4 ชนิด คือ ออลิโกไคโตซาน ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ ซึ่งมีลักษณะและสมบัติแตกต่างกัน

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเตรียมอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

2.2.1.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)²

การเตรียมไคโตซานนาโนสเฟียร์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (แผนภาพที่ 2.1) ดังต่อไปนี้ (i) การเตรียมพทาโลอิลไคโตซาน (Phcts) (ii) การเตรียมพอลิเอทิลีนไกลคอลเมทิลเอเทอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลตรงปลายสายโซ่ (mPEG-COOH) และ (iii) การกราฟท์ (grafting) mPEG-COOH บนโมเลกุล Phcts-g-mPEG



แผนภาพที่ 2.1 การเตรียม Phcts, mPEG-COOH และ Phcts-g-mPEG

พทาโลอิลไคโตซาน (Phcts) เตรียมโดยการกวนไคโตซาน (1 กรัม) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมพทาลิกแอนไฮไดรด์ (4.48 กรัม หรือ 5 โมลสมมูลของวงไพราโนส) ลงไป แล้วกวนต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส และกวนสารผสมภายใต้สภาวะไนโตรเจน เป็น

เวลา 18 ชั่วโมง ตกตะกอนสารผสมด้วยน้ำ จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำ เมทานอล และทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน

Phcts: EA $(C_{14}H_{13}O_6N)_{0.8}(C_6H_{11}O_4N)_{0.1}(C_8H_{13}O_5N)_{0.1}$, Anal. Calcd. (%) C, 56.17; H, 4.75; and N, 5.20, Found (%) C, 56.18; H, 4.45; and N, 4.35: FT IR (KBr, cm^{-1}) 3472 (OH), 1776 and 1714 (C=O anhydride), and 721 (aromatic ring): ^{13}C CP/MAS NMR (δ , ppm) 23.3 (CH_3), 57.0 (C-2), 64.7 (C-6), 73.2 (C-3, C-5), 80.5 (C-4), 100.4 (C-1), 131.1 (C_6H_5), and 169.1 (C=O in acetamide and anhydride): 1H NMR (DMSO- d_6 , $25^\circ C$) (δ , ppm) 1.7 (CH_3 in acetamide), 3.4-5.0 (pyranose ring), and 7.6-7.7 (C_6H_5)

พอลิเอทิลีนไกลคอลเมทิลอีเทอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลตรงปลายสายโซ่ (mPEG-COOH) เตรียมโดยการละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลเมทิลอีเทอร์ (3 กรัม หรือ 6×10^{-4} โมล) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (2 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมซัคซินิคแอนไฮไดรด์ (0.06 กรัม หรือ 1 โมลสมมูลของพอลิเอทิลีนไกลคอลเมทิลอีเทอร์) และไพริดีน (2-3 หยด) แล้วกวนสารผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตกตะกอนสารผสมด้วยไดเอทิลอีเทอร์ แล้วนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว

mPEG-COOH: FT IR (KBr, cm^{-1}) 3472 (OH), 2875 (C-H stretching), 1736 (C=O), and 1105 (C-O-C): 1H NMR (D_2O , $25^\circ C$) (δ , ppm) 2.4 (CH_2 in succinic anhydride), 3.2 (O- CH_3), and 3.5 (CH_2 in PEG)

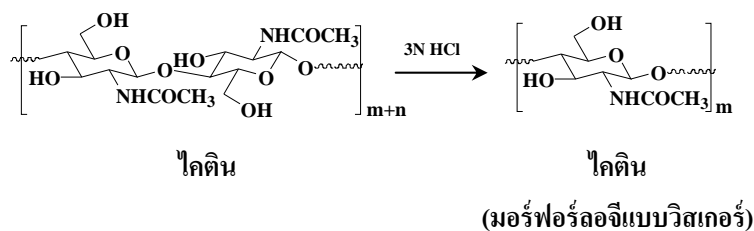
การเตรียม Phcts ที่ถูกกราฟด้วย mPEG-COOH (Phcts-g-mPEG) ทำได้โดยการละลาย Phcts (1 กรัม หรือ 3.71×10^{-3} โมล) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (20 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม mPEG-COOH (7.58 กรัม หรือ 0.40 โมลสมมูลของ Phcts) HOBt (0.68 กรัม หรือ 3 โมลสมมูลของ mPEG-COOH) และ WSCI (0.85 กรัม หรือ 3 โมลสมมูลของ mPEG-COOH) ลงไปตามลำดับ กวนสารผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปโคอะไลส์ในน้ำเพื่อกำจัดสารที่ไม่ทำปฏิกิริยา และเพื่อให้อนุภาคนาโนโคโคซานก่อตัว เก็บอนุภาคที่ได้ และล้างด้วยน้ำและเมทานอล จากนั้นนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว

Phcts-g-mPEG: A $(C_{14}H_{13}O_6N)_{0.509}(C_{245}H_{471}O_{122}N)_{0.291}(C_6H_{11}O_4N)_{0.027}(C_{468}H_{927}O_{236}N)_{0.073}(C_8H_{13}O_5N)_{0.064}(C_{239}H_{471}O_{12}N)_{0.036}$, Anal. Calcd. (%) C, 55.47; H, 6.51; and N, 3.05, Found (%) C, 56.22; H, 4.82; and N, 6.82: FT IR (KBr, cm^{-1}) 3464 (OH), 2882 (C-H stretching), 1776 and 1714 (C=O anhydride), 1714 (C=O ester), and 721 (aromatic ring): ^{13}C CP/MAS NMR (δ , ppm) 23.5 (CH_3 in acetamide and mPEG), 57.2 (C-2), 64.8 (C-6), 72.7 (C-3, C-5), 80.3 (C-4), 100.0 (C-1), 132.2 (C_6H_5), and 171.5 (C=O in acetamide, anhydride, and ester): 1H NMR (DMSO- d_6 , $25^\circ C$) (δ , ppm) 2.4 (CH_2 in succinic anhydride), 3.2 (O- CH_3), 3.5 (CH_2 in PEG), 2.8-4.7 (pyranose ring), and 7.6-7.8 (C_6H_5)

2.2.1.2 ไคตินวิสเกอร์ (chitin whisker)³

การเตรียมไคตินวิสเกอร์ทำได้โดยการกวนไคติน (3 กรัม) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 N (300 มิลลิลิตร) (แผนภาพที่ 2.2) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากสารละลายโดยการปั่นเหวี่ยง นำของแข็งที่ได้ไปกวนในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 N (300 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ จนกระทั่งได้สารแขวนลอยที่มีลักษณะคอลลอยด์ จากนั้นแยกส่วนที่เป็นของแข็งออก และล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการไดอะไลซิส

FT IR (KBr, cm^{-1}) 3200-3500 (OH), 1658 และ 1624 (amide I), 1559 (amide II)



แผนภาพที่ 2.2 การเตรียมไคตินวิสเกอร์

2.2.1.3 ไคโตซานวิสเกอร์ (chitosan whisker)⁴

ไคโตซานวิสเกอร์เตรียมได้จากการนำไคตินวิสเกอร์มาผ่านกระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) (แผนภาพที่ 2.3) โดยการแช่ไคตินวิสเกอร์ในสารละลายเบสเข้มข้น (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50%) โดยมีการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกจากสารละลายเบสโดยการเซ็นทริฟิวส์ ทำซ้ำโดยวิธีการเดียวกันกับข้างต้นอีก 2 ครั้ง แล้วนำของแข็งที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการไดอะไลซิส

FT IR (KBr, cm^{-1}) 3200-3500 (OH), 1660 (amide I), 1590 (amide II). ^1H NMR (2% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$, 25°C) (δ , ppm) 2.3 ($-\text{CH}_3$), 3.4 (H2 ของ pyranose ring), 4.0-4.4 (H3-H6 ของ pyranose ring), 5.1 ppm (H1 ของ pyranose ring)

2.2.2.5 นำหนักโมเลกุลตรวจสอบโดยเทคนิค GPC

2.2.3 การตรวจสอบองค์ประกอบของอนุพันธ์ไคติน-โกลิตซาน

2.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่างปริมาณ 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ในถ้วยอะลูมิเนียมที่มีฝาปิดซึ่งผ่านการอบที่อุณหภูมิ 102 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ก่อนนำไปชั่งเพื่อให้ทราบน้ำหนักถ้วยที่แน่นอน จากนั้นอบตัวอย่างในถ้วยอะลูมิเนียมให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 102 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิดฝาแล้วนำภาชนะออกจากตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีก ครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ กล่าวคือผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ 2 ครั้งติดต่อกัน ควรต่างกั น้อยกว่า 1 มิลลิกรัม

การคำนวณปริมาณความชื้นในตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณความชื้นร้อยละของตัวอย่าง} = 100w/W$$

เมื่อ w คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่หายไป (กรัม)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

เผาครุชชีเบิล (crucible) ในเตาเผา (Carbolite ELF/11/14/201, England) ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักครุชชีเบิลที่แน่นอนไว้ หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 4 - 5 กรัม ใส่ลงในครุชชีเบิล แล้วนำไปเผาในเตา ที่อุณหภูมิ 550 - 600 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้เถ้าเป็นสีขาวหรือสีเทานำครุชชีเบิลออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องในเดซิเคเตอร์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การคำนวณปริมาณเถ้าในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละปริมาณเถ้า} = [(w_2 - w_0) / w_1] \times 100$$

เมื่อ w_0 คือ น้ำหนักครุชชีเบิล (กรัม)

w_1 คือ น้ำหนักหนักตัวอย่าง (กรัม)

w_2 คือ น้ำหนักหนักของครุชชีเบิล และตัวอย่างหลังจากเผา (กรัม)

2.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ลงในกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีสารตัวอย่างใส่ใน thimble ก่อนนำไปเข้าเครื่อง SOXTEC (Model HT 220, Sweeden) นำด้วยสำหรับสกัด (extraction cup) ซึ่งผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 - 60 นาที และทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ก่อนที่จะชั่งน้ำหนัก มาเติมสารปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ใช้เป็นตัว

ทำละลายในการสกัดประมาณ 50-75 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต่อเข้ากับเครื่อง Soxhlet ทำการสกัดเป็นเวลา 15 –20 นาที ล้าง (rinsing) เป็นเวลา 45-60 นาที และระเหยตัวทำละลายเป็นเวลา 15-30 นาที นำด้วยสำหรับสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในเคซิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก

การคำนวณปริมาณไขมันในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละของปริมาณไขมัน} = (W_3 - W_2) \times 100 / W_1$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักถ้วยสำหรับสกัด (กรัม)

W_3 คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังการสกัดพร้อมถ้วยสำหรับสกัด (กรัม)

2.2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธีเคดาห์ล (Kjeldahl method) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ในกระดวยกรอง Whatman No.1 จากนั้นนำกระดวยกรองพร้อมตัวอย่างใส่ในหลอดย่อยเติมคอปเปอร์ซัลเฟตปริมาณ 0.8 กรัม โปแทสเซียมซัลเฟตปริมาณ 7 กรัม glass bead จำนวน 2-3 เม็ด และกรดซัลฟูริกปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำการย่อยโดยเครื่องย่อย (2006 Digester, Itector, Sweden) ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 – 60 นาที รอให้อุณหภูมิคงที่ ทิ้งให้เย็น นำไปเติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกลั่น ของเหลวที่ได้จากการกลั่นจะตกลงไปในขวดรูปชมพู่ซึ่งมีกรดบอริกเข้มข้น 4 % ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และสารอินดิเคเตอร์ผสม 2-3 หยด กลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 125 มิลลิลิตร จากนั้นนำของเหลวที่ได้ในขวดรูปชมพู่ไปไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้และนำไปคำนวณ

การคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = (T-B) \times 14.007 \times 100 \times N / \text{weight of sample (mg)}$$

$$\text{ร้อยละของปริมาณโปรตีน} = \% \text{ Nitrogen} \times 5.95$$

เมื่อ T คือ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรตแบลนค์ (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)

2.2.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

อบด้วยครุชีเบิล (crucible, ROBU GLASSFILTER GERÄTE, 30 ml) ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 102 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในเคซิคเคเตอร์ จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่าง (ประมาณ 0.5 – 1 กรัม) ใส่ในถ้วยครุชีเบิล นำตัวอย่างไปสกัดไขมันออกด้วยเครื่อง Fibertec (system M 1021 Cold extractor, Sweden) โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์เป็นตัวทำละลาย นำ

ด้วยครุชชีเบลพร้อมตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันไปใส่ในเครื่อง Fibertec (system M 1020 Hot extractor, Sweden) เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.255 นอร์มัล ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการต้มเดือดบน hot plate (system M 1022 hot plate, Sweden) ต้มจนสารผสมเดือดนาน 5-10 นาที จากนั้นปล่อยสารละลายกรดซัลฟิวริกทิ้ง ล้างตัวอย่างที่เหลือด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.313 นอร์มัล ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการต้มเดือด ต้มจนสารผสมเดือดนาน 5-10 นาที จากนั้นปล่อยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทิ้ง ล้างตัวอย่างที่เหลือด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด จำนวน 3 ครั้ง และตามด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำด้วยครุชชีเบลพร้อมตัวอย่างไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 102 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในแชลลอคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปเผาในเตาเผา Carbolite furnace (Carbolite ELF/11/14/201, England) ทิ้งให้เย็นในแชลลอคเคเตอร์จนถึงอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน การทดลองทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การคำนวณปริมาณเส้นใยในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละปริมาณเส้นใย} = [(w_2 - w_1) / w_0] \times 100$$

เมื่อ w_0 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

w_1 คือ น้ำหนักของด้วยครุชชีเบลและตัวอย่างหลังจากอบแห้ง (กรัม)

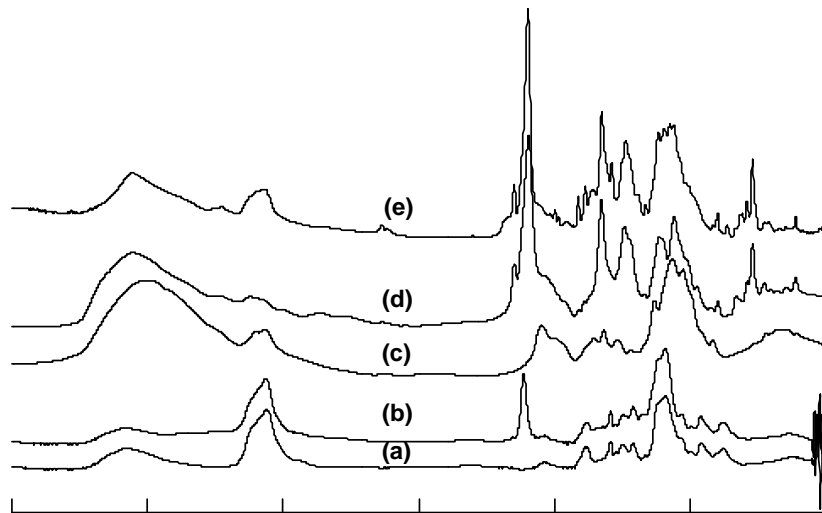
w_2 คือ น้ำหนักของด้วยครุชชีเบลและตัวอย่างหลังจากเผา (กรัม)

2.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

2.3.1 การเตรียม การวิเคราะห์ และการศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซาน

2.3.1.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)

การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้ (i) การเตรียมพทาโลอิลไคโตซาน (phcts) (ii) การเตรียมพอลิเอทิลีนไกลคอลดเมทิลเอเทอร์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลตรงปลายสายโซ่ (mPEG-COOH) และ (iii) การเตรียมอนุภาคนาโนพาร์ติเคิล (Phcts-g-mPEG) โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ (i) และ (ii) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากแต่ละขั้นตอนโดยเทคนิค FTIR NMR และ EA แสดงว่าการสังเคราะห์ประสบความสำเร็จ

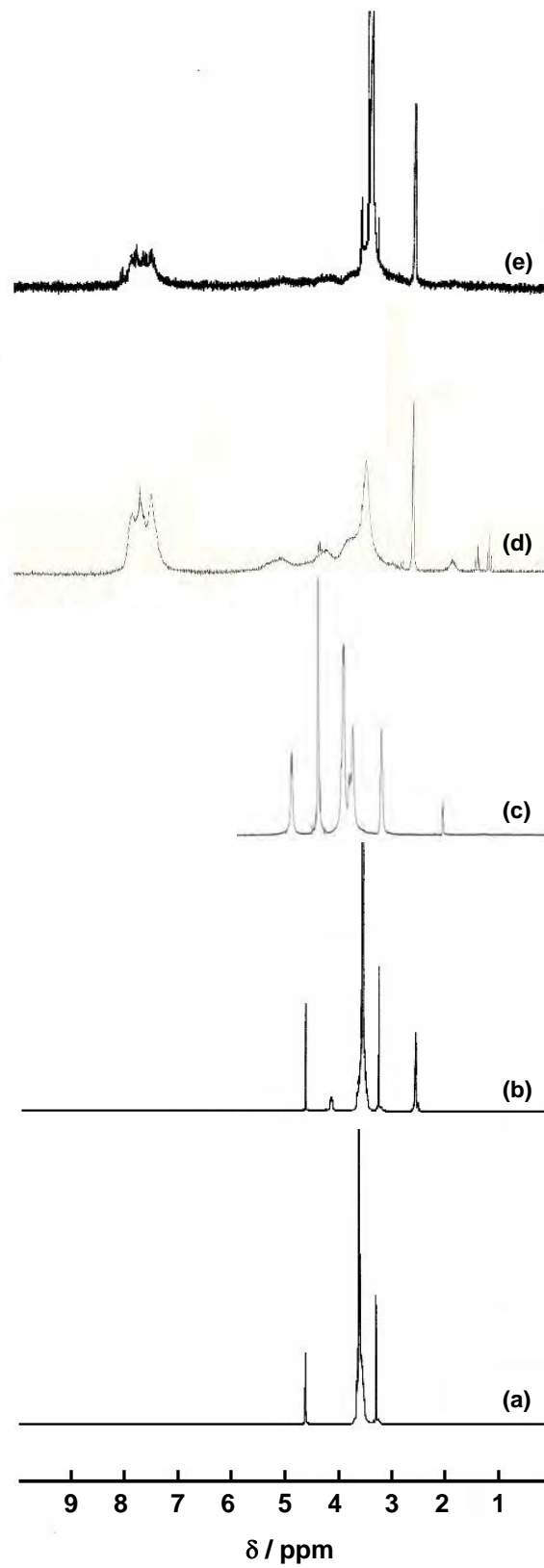


รูปที่ 2.1 สเปกตรัม FTIR ของ (a) mPEG (b) mPEG-COOH (c) chitosan (d) Phcts และ (e) Phcts-g-mPEG

รูปที่ 2.1d และ 2.2d แสดงว่า Phcts แสดงพีกใหม่ที่ตำแหน่ง 1776 และ 1714 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีกของคาร์บอนิลแอนไฮไดรด์ และ 721 cm^{-1} ของวงอโรมาติก นอกจากนี้ยังพบพีกของโปรตอนอโรมาติก (C_6H_5) ที่ตำแหน่ง 7.21 - 7.59 ppm ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าหมู่พทาโลอิลถูกกราฟไปบนโมเลกุลไคโตซาน และระดับของการกราฟหมู่พทาโลอิลบนโมเลกุลไคโตซาน (degree of phthaloylation) เป็น 0.89 (ตรวจสอบจากเทคนิค EA)

สำหรับการเพิ่มความว่องไวของ mPEG สามารถทำได้โดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่จากหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่คาร์บอกซิล ซึ่งผลการทดลองยืนยันว่าการเตรียม mPEG-COOH เป็นผลสำเร็จ ดังจะเห็นได้จากพีกคาร์บอนิลที่ตำแหน่ง 1736 cm^{-1} (รูปที่ 2.1b) และ พีกโปรตอนเมทิลีน (CH_2) ของซัคซีนิกแอนไฮไดรด์ที่ตำแหน่ง 2.48 ppm (รูปที่ 2.2b)

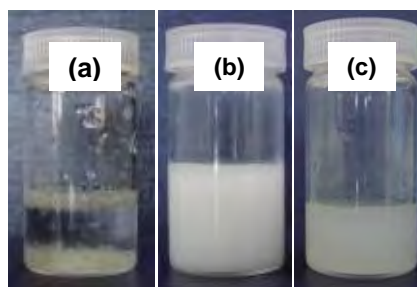
การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานอาศัยหลักการการรวมกลุ่มกันเอง (self-assembly) ของโมเลกุลไคโตซานที่มีการควบคุมความเป็นไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิก ในการทดลองนี้ได้ออกแบบโมเลกุลไคโตซานโดยการกราฟหมู่พทาโลอิลซึ่งเป็นหมู่ไม่มีขั้ว และ mPEG ซึ่งเป็นหมู่มีขั้ว ไปบนโมเลกุลไคโตซาน จากการทดลองพบว่าปฏิกิริยาของ Phcts และ mPEG-COOH เป็นผลสำเร็จ ซึ่งยืนยันได้จากการปรากฏพีกเฉพาะของหมู่พทาโลอิล และ mPEG บน FTIR spectrum (รูปที่ 2.1e) และ NMR pattern (รูปที่ 2.2e) ของ Phcts-g-mPEG และ ผลจาก EA ยืนยันว่าเปอร์เซ็นต์การกราฟ mPEG บนโมเลกุล Phcts เป็น 7.83 (คำนวณจากอัตราส่วน C/N)



รูปที่ 2.2 สเปกตรัม ^1H NMR ของ (a) mPEG (b) mPEG-COOH (c) chitosan (d) Phcts และ (e) Phcts-g-mPEG

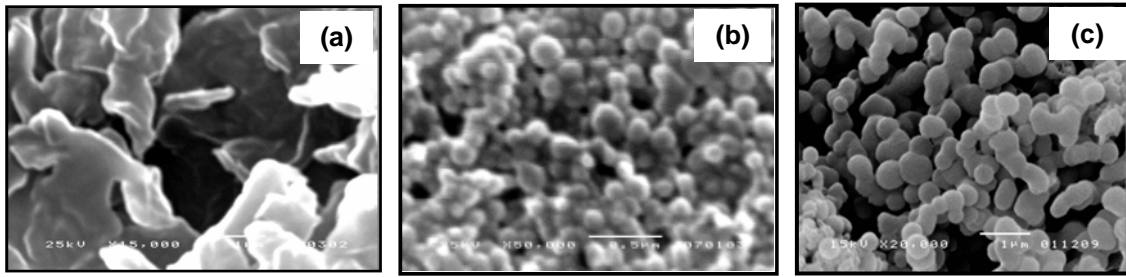
เมื่อพิจารณาสมบัติการละลายของไคโตซาน พบว่าสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์ เจือจางเท่านั้น เช่น กรดฟอร์มิก และ กรดอะซิติก นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานไม่สามารถกระจายตัว ในน้ำเมื่อ pH เป็นกลาง (รูปที่ 2.3a) ส่งผลให้การใช้ประโยชน์ของไคโตซานค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้ไคโตซานเป็นสารควบคุมการปลดปล่อย หรือ สารนำส่งสาร ว่องไว (carrier) เช่น อุตสาหกรรมยา คอสมेटิกส์ อาหาร และ เกษตร เป็นต้น

การปรับโครงสร้างทางเคมีหรือการควบคุมความเป็นขั้วและไม่เป็นขั้วของไคโตซานเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้ได้อนุพันธ์ไคโตซานซึ่งสามารถกระจายตัวได้ดีในสารตัวกลางที่ใช้ทั่วไป เช่น น้ำ และ สารละลายบัฟเฟอร์ ถึงแม้ว่า Phcts-g-mPEG ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถกระจายตัวให้ สารละลายคอลลอยด์ที่มีความเสถียรระดับหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะขุ่นขาว (รูปที่ 2.3b) จุดที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งของ Phcts-g-mPEG คือการอยู่ในรูปของอนุภาคคอลลอยด์ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (รูปที่ 2.3c) ซึ่งแตกต่างจากไคโตซานดั้งเดิมโดยสิ้นเชิง ส่งผลให้อนุภาค Phcts-g-mPEG สามารถนำส่ง สารว่องไวไปยังอวัยวะเป้าหมายในร่างกายได้ เช่น ลำไส้ ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาค Phcts-g-mPEG ไม่ละลายในสภาวะของกระเพาะอาหาร

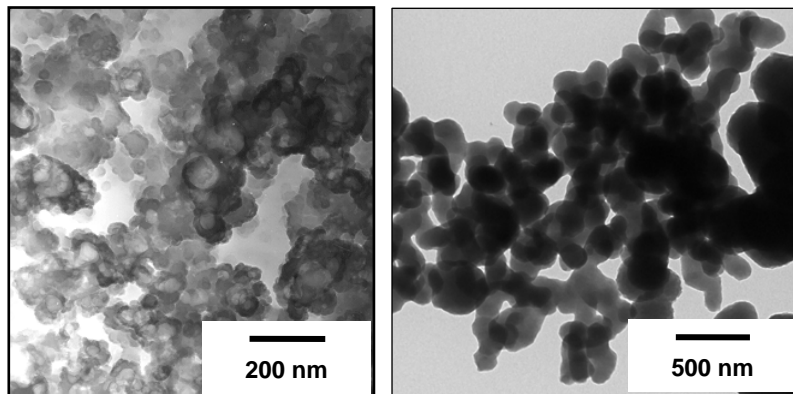


รูปที่ 2.3 ลักษณะทางกายภาพของ (a) ไคโตซานในน้ำ (b) Phcts-g-mPEG ในน้ำ และ (c) Phcts-g-mPEG ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1%

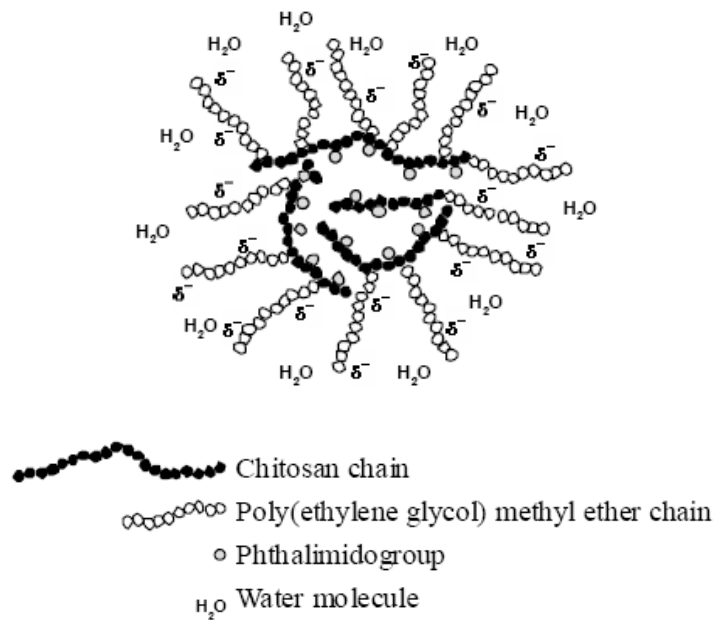
โดยทั่วไปไคโตซานมีลักษณะเป็นเกร็ด (รูปที่ 2.4a) สำหรับ Phcts-g-mPEG พบว่ามีลักษณะเป็นอนุภาคกลม และมีขนาดประมาณ 200-500 nm (รูปที่ 2.4b-c) อนุภาคส่วนใหญ่จะเกาะกันเป็นกลุ่ม เทคนิค TEM ก็ยืนยันว่า Phcts-g-mPEG เป็นอนุภาคกลมที่มีขนาดประมาณ 100-250 nm (รูปที่ 2.5) อย่างไรก็ตามอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมได้แสดงค่าศักย์ซีต้าในช่วง -20 ถึง -40 เมื่อกระจายตัวในน้ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าประจุที่พื้นผิวของอนุภาคเป็นลบ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก mPEG กระจายตัวบนพื้นผิวด้านนอกของอนุภาค ในขณะที่หมู่พทาโลอิลรวมกลุ่มกันอยู่ด้านใน ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ 25 กิโลโวลท์ของ (a) ไคโตซาน (15,000X) (b) Phcts-g-mPEG (50,000X) และ (c) Phcts-g-mPEG (20,000X)

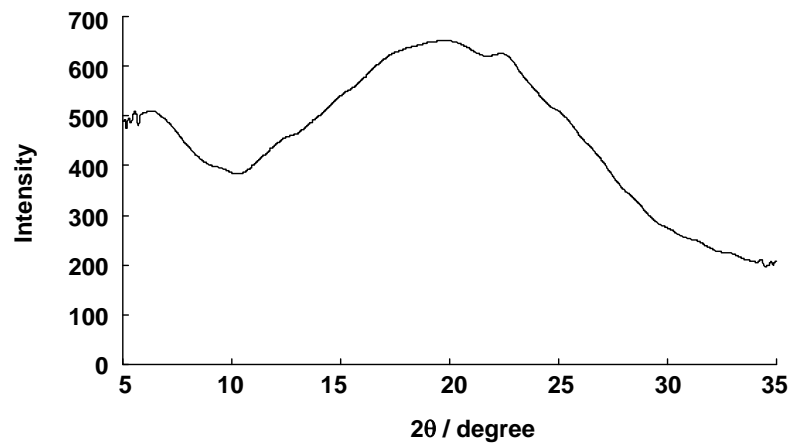


รูปที่ 2.5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ Phcts-g-mPEG



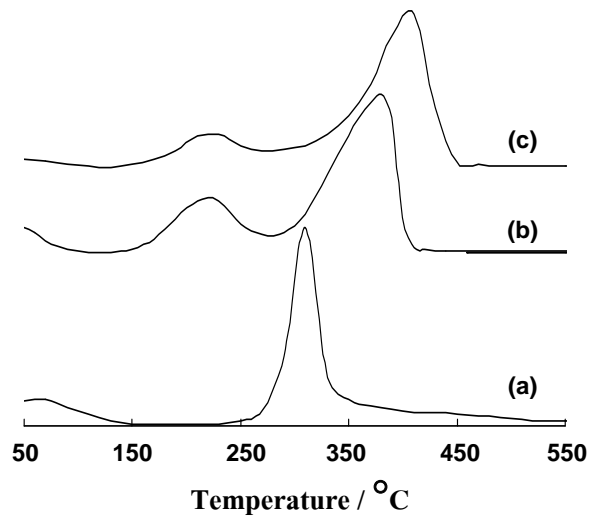
แผนภาพที่ 2.4 การก่อตัวของอนุภาคกลมนาโนไคโตซาน (Phcts-g-mPEG)

ไคโตซานนาโนสเฟียร์ให้พีกที่มีลักษณะกว้างที่ตำแหน่ง $20^\circ 2\theta$ (รูปที่ 2.6) ซึ่งให้เห็นว่าโครงสร้างผลึกของไคโตซานเดิมถูกทำลายเมื่อมีการกราฟท์โมเลกุลพทาโลอิลและ mPEG บนสายโซ่ไคโตซาน

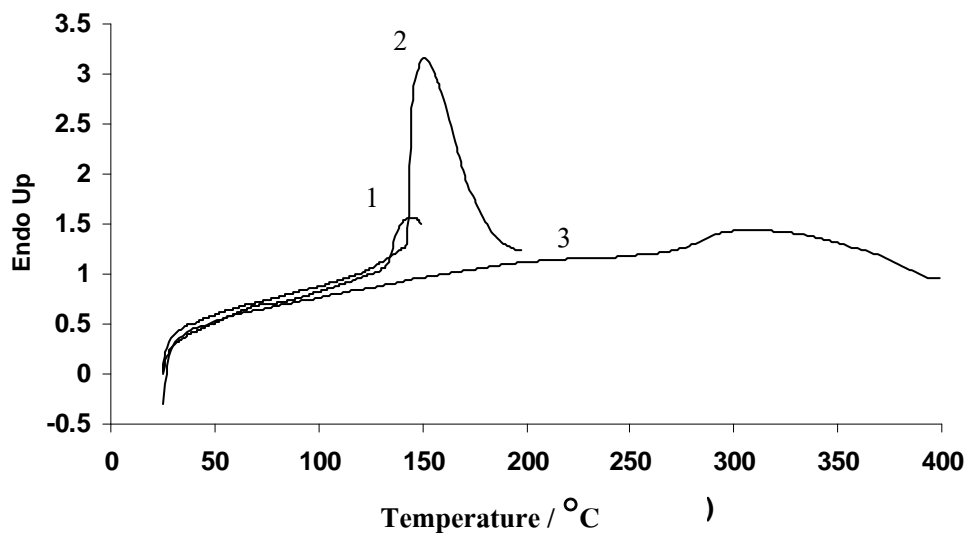


รูปที่ 2.6 คิวแฟร็กโตแกรม XRD ของ Phcts-g-mPEG

รูปที่ 2.7 แสดงว่าไคโตซานแสดงพีกการสลายตัว 2 พีก พีกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นพีกของการสูญเสียความชื้นหรือน้ำ ส่วนพีกที่อุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียสเป็นพีกการสลายตัวของไคโตซาน (T_d) (รูปที่ 2.7a) สำหรับ Phcts พบว่ามีพีกใหม่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการสลายตัวของหมู่พทาโลอิล อย่างไรก็ตามเมื่อกราฟหมู่พทาโลอิลไปบนโมเลกุลไคโตซาน อุณหภูมิการสลายตัวของสารประกอบ Phcts เพิ่มขึ้นจากของไคโตซานเป็น 380 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.7b) Phcts-g-mPEG จะให้พีกที่มีลักษณะคล้ายกับกรณีของ Phcts อุณหภูมิการสลายตัวของหมู่พทาโลอิลยังคงอยู่ในช่วง 220-230 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิของสารประกอบ Phcts-g-mPEG เพิ่มขึ้นเป็น 410 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2.7c) และรูปที่ 2.8 แสดงการศึกษาความเสถียรต่อความร้อน โดยเริ่มต้นสแกนตั้งแต่ 25-150 °C เพื่อขจัดน้ำในสารตัวอย่างออก และจากนั้นได้สแกนตั้งแต่ 25-200 °C ซึ่งพบว่ามีพีกดูดความร้อนที่ 150 °C อันมีนัยบ่งบอกถึงการสลายโครงสร้างบางส่วน และจาก 25-400 °C แสดงถึงไคโตซานนาโนสเฟียร์เริ่มสลายตัวตั้งแต่อุณหภูมิ 280 °C เป็นต้นไป (รูปที่ 2.8)



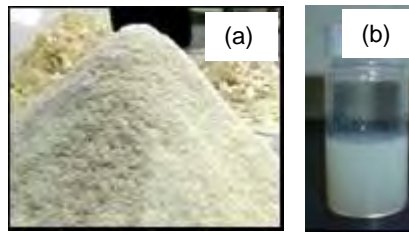
รูปที่ 2.7 เทอร์โมแกรม TGA ของ (a) โพลีไคโตซาน (b) Phcts และ (c) Phcts-g-mPEG



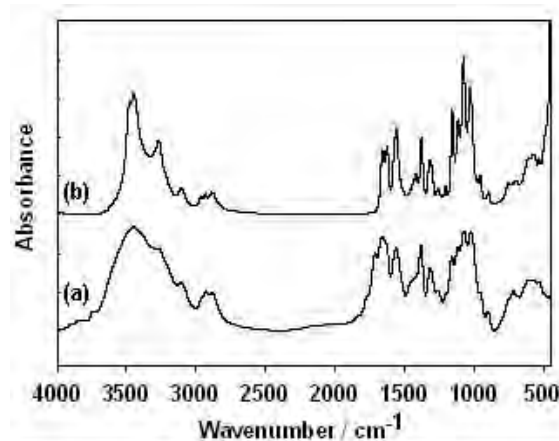
รูปที่ 2.8 เทอร์โมแกรม DSC ของ Phcts-g-mPEG เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 150 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 3 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min

2.3.1.2 ไคตินวิสเกอร์

โดยทั่วไปไคตินมีลักษณะเป็นเกล็ด สีเหลืองอ่อน (รูปที่ 2.9a) และเมื่อนำเกร็ดไคตินไปกวนในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด และผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีลักษณะคอลลอยด์ขาวเมื่อกระจายตัวในน้ำ (รูปที่ 2.9b)



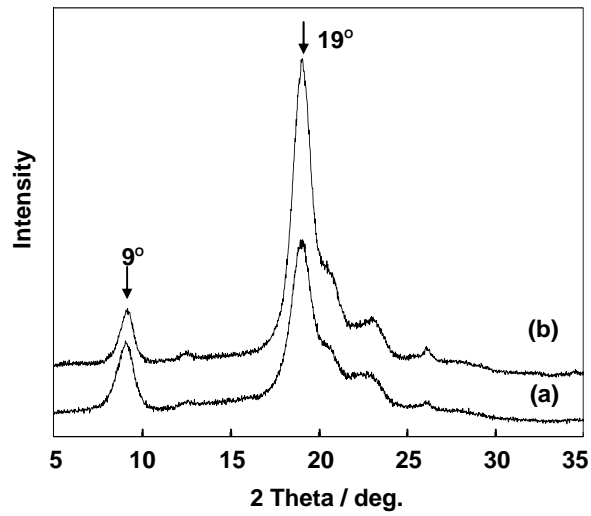
รูปที่ 2.9 ลักษณะทางกายภาพของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์ในน้ำ



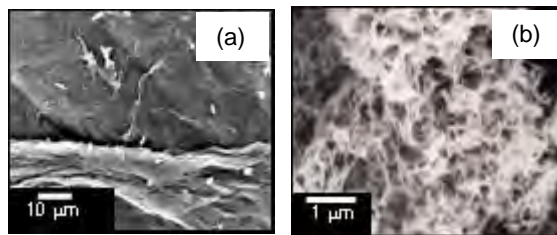
รูปที่ 2.10 สเปกตรัม FTIR ของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์

โครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ถูกตรวจสอบโดยเทคนิค FT IR ซึ่งพบว่าสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 2.10b) ให้พิกที่ตำแหน่งเดียวกับพิกของเกร็ดไคตินตั้งต้น (รูปที่ 2.10a) แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ยังคงเป็นไคติน อย่างไรก็ตามความกว้างของพิกจะลดลง หรือพิกมีลักษณะแหลมขึ้น (sharp) โดยเฉพาะพิกที่ตำแหน่ง 3200-3500 (OH) 1658, 1624 (amide I) และ 1559 cm^{-1} (amide II) ซึ่งให้เห็นว่าโมเลกุลของผลิตภัณฑ์มีขนาดเล็กลง และส่วนที่เป็นอสัณฐานของไคตินถูกทำลาย ส่งผลให้ความเป็นผลึกของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้จากเทคนิค XRD จากรูปที่ 2.11a พบว่าไคตินแสดงพิกที่ตำแหน่ง $9^{\circ} 2\theta$ และ $19^{\circ} 2\theta$ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ก็แสดงพิกที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่ความกว้างของพิกแคบกว่า (รูปที่ 2.11b) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์มีความเป็นผลึกเพิ่มขึ้น

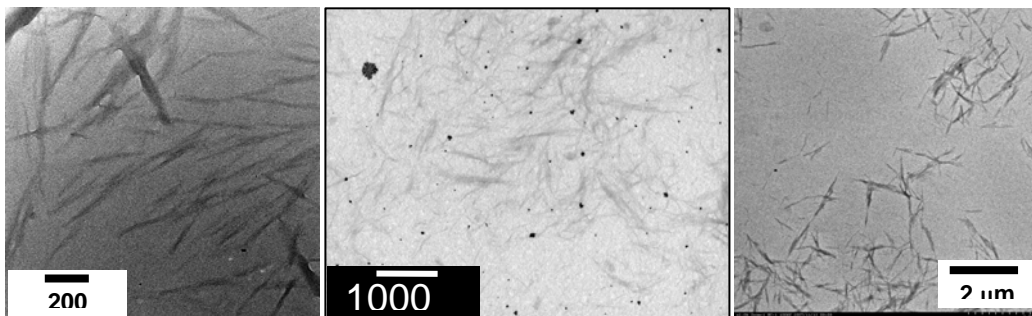
จากรูปที่ 2.12a พบว่าพื้นผิวของเกล็ดไคตินมีลักษณะไม่เรียบ แต่ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการกวนเกร็ดไคตินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมีลักษณะเป็นเส้นใยพันกัน (รูปที่ 2.12b) ซึ่งเมื่อตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าเส้นใยดังกล่าวมีลักษณะคล้ายหลอด/ขนแมวที่มีขนาดเล็กมาก กล่าวคือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\sim 50-100$ นาโนเมตร และความยาว ~ 1000 นาโนเมตร หลอด/ขนแมวดังกล่าวมีลักษณะคล้ายผลึกเดี่ยว (single crystal) ที่ไม่มีส่วนที่เป็นอสัณฐานอยู่ (รูปที่ 2.13) จากการตรวจสอบข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไคตินวิสเกอร์



รูปที่ 2.11 ดิฟแฟรกโตแกรม XRD ของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์

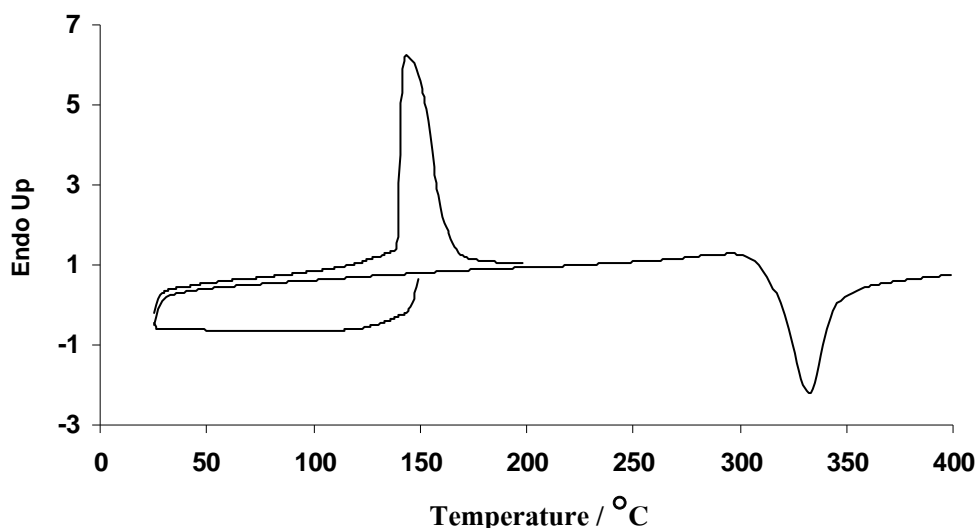


รูปที่ 2.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (a) ไคติน และ (b) ไคตินวิสเกอร์



รูปที่ 2.13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไคตินวิสเกอร์

เมื่อตรวจสอบสมบัติทางความร้อนโดยเทคนิค DSC พบว่าไคตินวิสเกอร์แสดงพีกคายความร้อนที่อุณหภูมิ ~ 335°C (ในช่วง 300-350°C) (รูปที่ 2.14) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวโมเลกุลของไคตินวิสเกอร์อาจมีการก่อตัวเป็นผลึก หรือมีการสร้างพันธะใหม่เกิดขึ้น



รูปที่ 2.14 เทอร์โมแกรม DSC ของไคตินวิสเกอร์ เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 150 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 3 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min

2.3.1.3 ไคโตซานวิสเกอร์⁴

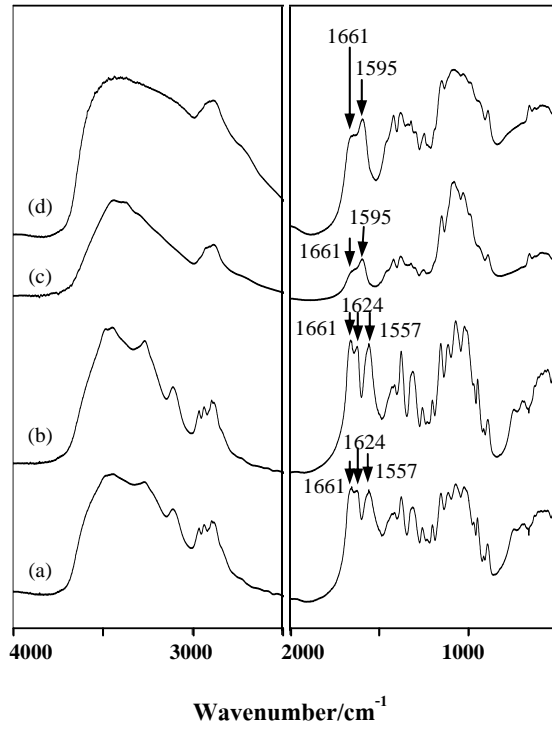
ไคโตซานวิสเกอร์เตรียมโดยการนำไคตินวิสเกอร์ไปผ่านกระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะดังรูปที่ 2.15 ซึ่งเป็นสารคอลลอยด์ขุ่นขาว และเมื่อนำสารดังกล่าวไปทำแห้งและตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิค FTIR พบว่าไคโตซานวิสเกอร์แสดงพีคที่มีลักษณะเฉพาะของไคโตซาน (รูปที่ 2.15d) อย่างไรก็ตามความเข้มพีคที่เลขคลื่น 1661 cm^{-1} ลดลง และมีพีคใหม่เกิดขึ้นที่เลขคลื่น 1595 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$) (รูปที่ 2.15c) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัม FTIR ของไคตินวิสเกอร์ (รูปที่ 2.15b)

^1H NMR (2% $\text{CD}_3\text{COOD}/\text{D}_2\text{O}$, 25°C) (δ , ppm) 2.3 ($-\text{CH}_3$), 3.4 (H2 ของ pyranose ring), 4.0-4.4 (H3-H6 ของ pyranose ring), 5.1 ppm (H1 ของ pyranose ring)

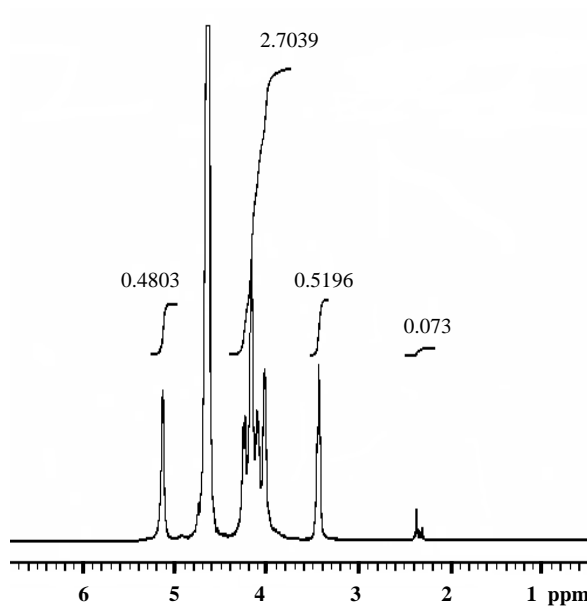
เทคนิค ^1H NMR ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 2.16 เพื่อหาปริมาณหมู่อะมิโนของไคโตซานวิสเกอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชันของไคตินวิสเกอร์ โดยใช้สมการด้านล่าง

$$\text{DD} (\%) = \{1 - [(I_{\text{CH}_3} / 3) / (I_{\text{pyranose ring}} / 6)]\} \times 100$$

จากการคำนวณพบว่าไคโตซานวิสเกอร์มีเปอร์เซ็นต์ DD เท่ากับ 95%

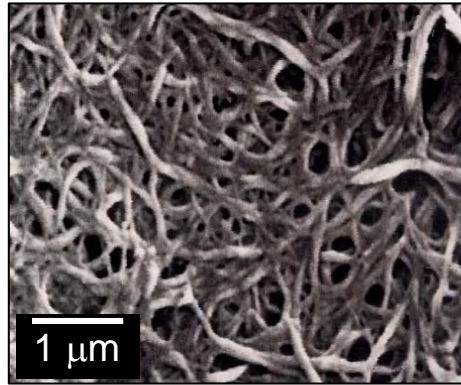


รูปที่ 2.15 สเปกตรัม FTIR ของ (a) ไคติน (b) ไคตินวิสเกอร์ (c) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (d) ไคโตซาน (95%DD)

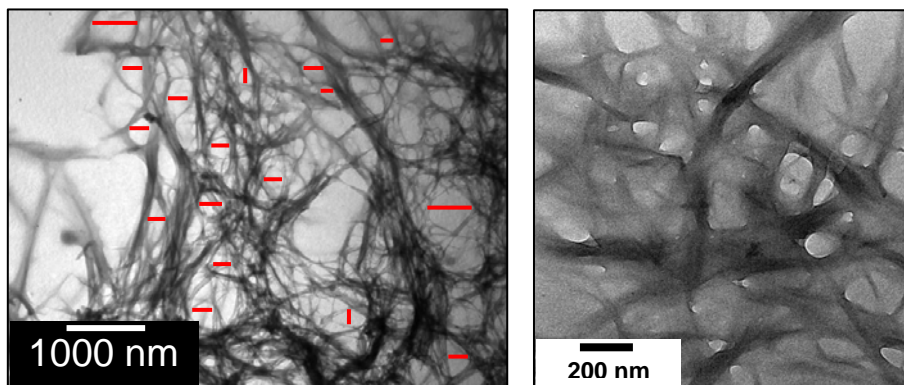


รูปที่ 2.16 สเปกตรัม ¹H NMR ของไคโตซานวิสเกอร์

ภาพถ่ายของกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (SEM) และแบบส่องกราด (TEM) แสดงให้เห็นว่า ไคโตซานวิสเกอร์ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นเส้นเช่นเดียวกับไคตินวิสเกอร์ แต่ต่างกันตรงที่ไคตินวิสเกอร์เป็นเส้นใยที่มีขนาดเล็กและสั้น (รูปที่ 2.13) ในขณะที่ไคโตซานวิสเกอร์เป็นเส้นใยที่มีขนาดยาวและสานกันเป็นโครงสร้างตาข่าย (รูปที่ 2.17 และ 2.18)



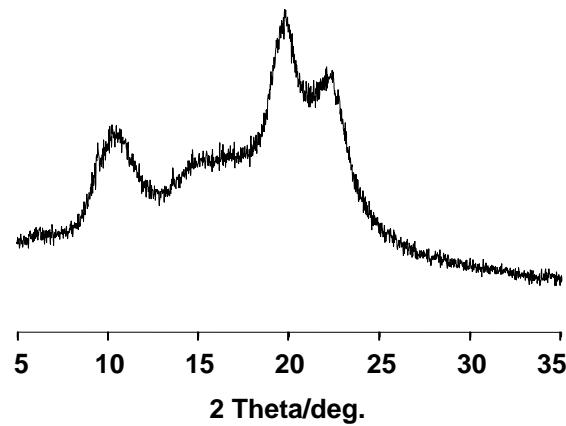
รูปที่ 2.17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไคโตซานวิสเกอร์



รูปที่ 2.18 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของไคโตซานวิสเกอร์

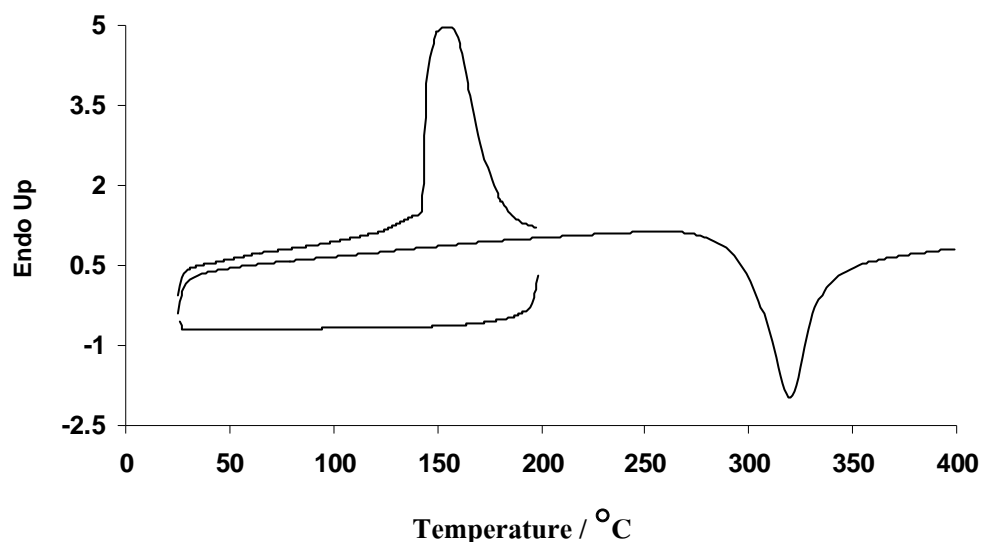
เทคนิค GPC ได้ถูกนำมาใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานวิสเกอร์ โดยใช้ hexafluoro-2-propanol (HFP) เป็นตัวทำละลาย พบว่าไคโตซานวิสเกอร์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 137,262 Dalton

จากรูปที่ 2.19 พบว่าไคโตซานวิสเกอร์แสดงพีกที่ตำแหน่ง $10^\circ 2\theta$, $20^\circ 2\theta$ และ $22^\circ 2\theta$ ซึ่งเหมือนกับกรณีของไคตินวิสเกอร์ (รูปที่ 2.19b) แต่ความเข้มของพีกต่ำกว่า และลักษณะพีกกว้างกว่ากรณีของไคตินวิสเกอร์ ซึ่งให้เห็นว่าไคโตซานวิสเกอร์มีโครงสร้างการจัดเรียงตัวของโมเลกุลหลวมกว่า ส่งผลให้ความเป็นผลึกน้อยกว่ากรณีของไคตินวิสเกอร์



รูปที่ 2.19 ดิฟแฟรคโตแกรม XRD ของไคโตซานวิสเกอร์

เมื่อตรวจสอบสมบัติทางความร้อนโดยเทคนิค DSC พบว่าอุณหภูมิที่ 25-200°C มีพีกดูดความร้อนที่ 170 °C ซึ่งแสดงถึงการสลายโครงสร้างบางส่วน ในขณะที่ไคโตซานวิสเกอร์แสดงพีกคายความร้อนที่อุณหภูมิ ~ 320°C (ในช่วง 280-340°C) (รูปที่ 2.20) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวโมเลกุลของไคโตซานวิสเกอร์อาจมีการก่อตัวเป็นผลึก หรือมีการสร้างพันธะใหม่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสร้างพันธะใหม่หรือในการก่อตัวเป็นผลึกของไคโตซานวิสเกอร์ต่ำกว่ากรณีของไคตินวิสเกอร์ (335°C) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากไคโตซานวิสเกอร์มีลักษณะโครงสร้างที่ยืดหยุ่น (flexible) ในขณะที่ไคตินวิสเกอร์มีลักษณะโครงสร้างที่แข็ง (rigid) และจากการศึกษาอุณหภูมิในการสลายตัว (T_d) ของไคโตซานวิสเกอร์ เปรียบเทียบกับไคโตซานแผ่น พบว่า T_d ของไคโตซานวิสเกอร์มีค่าใกล้เคียงกับ T_d ของไคโตซานแผ่น (308 และ 309°C ตามลำดับ)



รูปที่ 2.20 เทอร์โมแกรม DSC ของไคโตซานวิสเกอร์ เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min

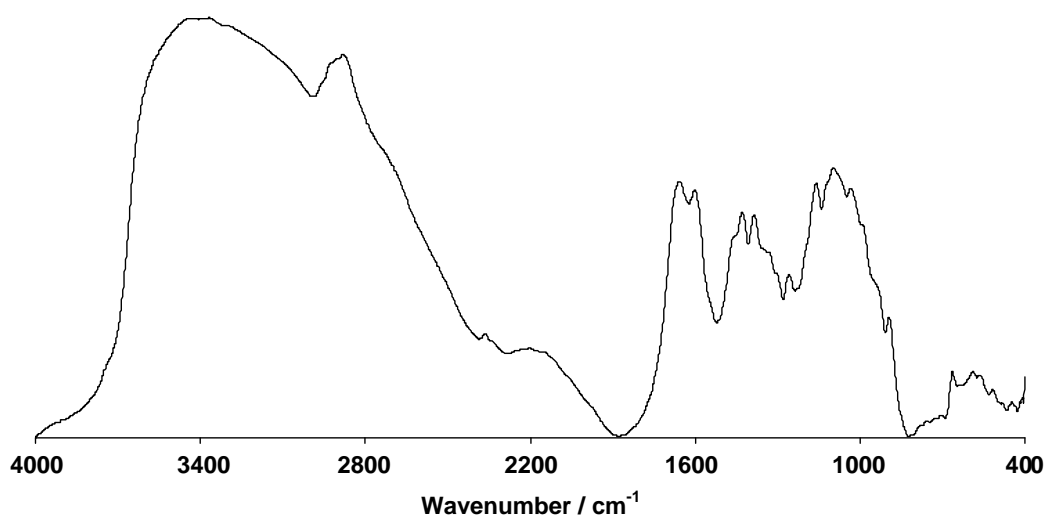
2.3.1.4 ออลิโกไคโตซาน⁵

ออลิโกไคโตซานเตรียมจากการย่อยไคโตซานโดยเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อนดังแสดงในรูปที่ 2.21

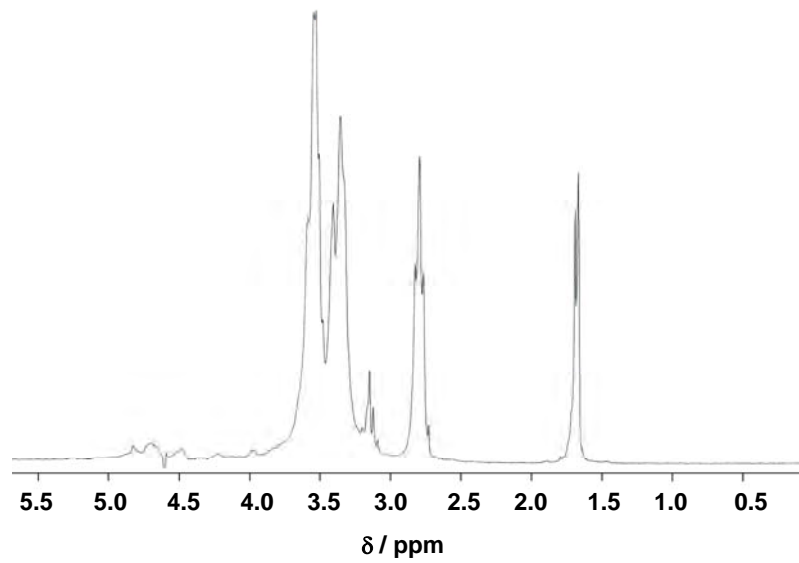


รูปที่ 2.21 ลักษณะทางกายภาพของออลิโกไคโตซาน

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการย่อยไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิค FTIR พบว่าให้พีกเฉพาะที่ตำแหน่งเลขคลื่น 3433 (OH), 2895 (C-H stretching), 1668 (amide I), 1610 (amide II), 1103 (C-O-C) และ 916 (pyranose ring) (รูปที่ 2.22) ซึ่งบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นไคโตซาน นอกจากนี้เทคนิค ¹H NMR ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้แสดงพีกเฉพาะของไคโตซานที่ตำแหน่ง δ 1.87 (CH₃), 3.00 (H2, pyranose ring), 3.57-3.74 (H3-H6, pyranose ring) และ 4.7 (H1, pyranose ring) (รูปที่ 2.23) และจากเทคนิค GPC พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าการเตรียมออลิโกไคโตซานเป็นผลสำเร็จ

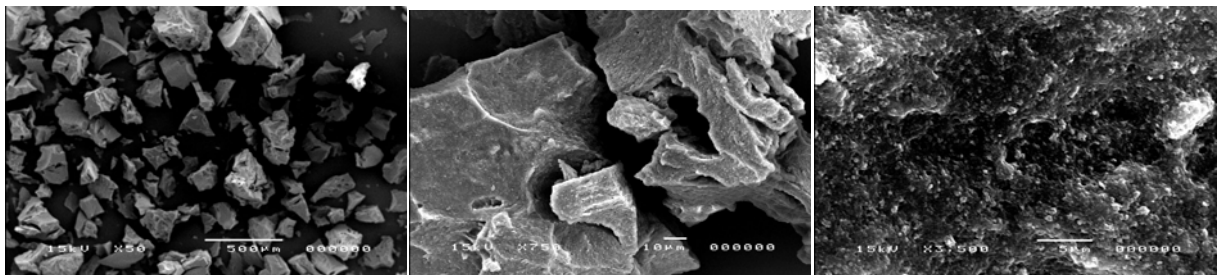


รูปที่ 2.22 สเปกตรัม FTIR ของออลิโกไคโตซาน



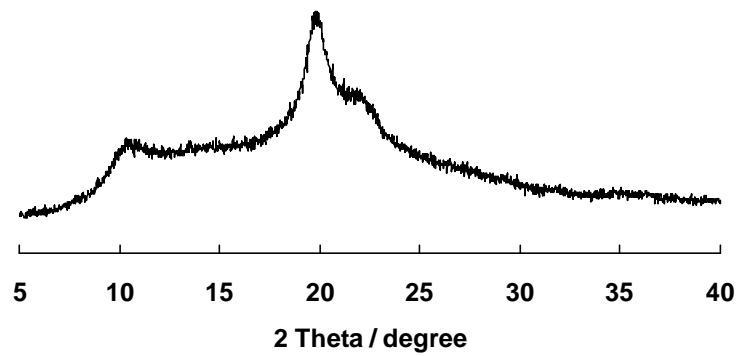
รูปที่ 2.23 สเปกตรัม ¹H NMR ของออลิโกโกลิโคโตนาน

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างพื้นฐานโดยเทคนิค SEM พบว่าออลิโกโกลิโคโตนานเป็นเกล็ดลักษณะเหลี่ยม รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดประมาณ 100-250 μm และมีพื้นผิวขรุขระ (รูปที่ 2.24)



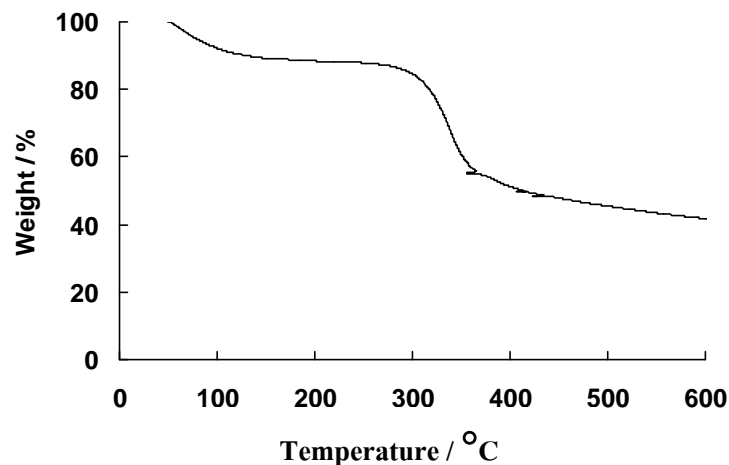
รูปที่ 2.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของออลิโกโกลิโคโตนาน

จากรูปที่ 2.25 พบว่าออลิโกโกลิโคโตนานแสดงพีกที่ตำแหน่ง $10^{\circ} 2\theta$, $20^{\circ} 2\theta$ และ $22^{\circ} 2\theta$ องศา โดยพีกที่ตำแหน่ง $20^{\circ} 2\theta$ มีลักษณะค่อนข้างแหลม แสดงให้เห็นว่าออลิโกโกลิโคโตนานมีลักษณะเป็นสารกึ่งผลึก (semi-crystalline)

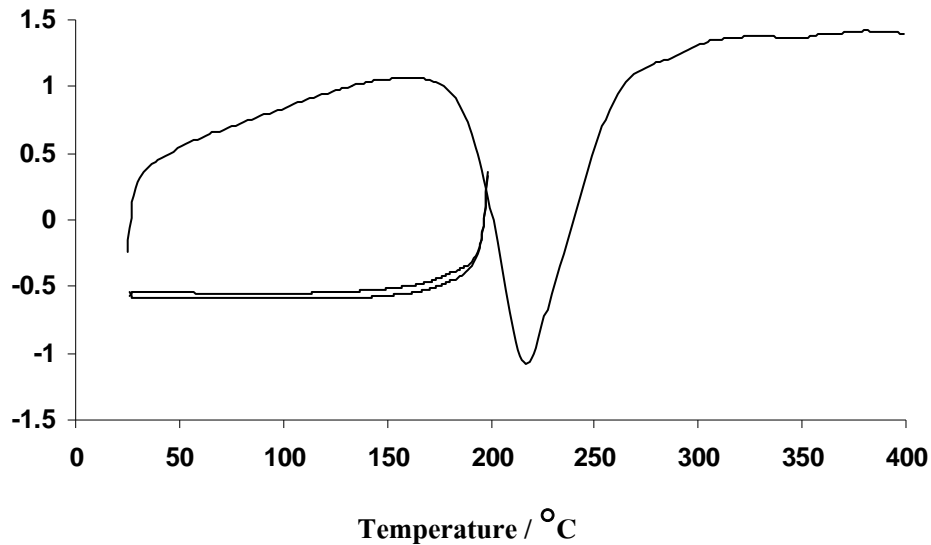


รูปที่ 2.25 ดิฟแฟรคโตแกรม XRD ของออลิโกไคโตซาน

สำหรับสมบัติทางความร้อนของออลิโกไคโตซานตรวจสอบได้โดยเทคนิค TGA และ DSC ซึ่งพบว่าออลิโกไคโตซานสลายตัวโดยความร้อน (degradation temperature, T_d) ที่อุณหภูมิ $\sim 337^\circ\text{C}$ (รูปที่ 2.26) และแสดงพีกคายความร้อนที่อุณหภูมิ $\sim 215^\circ\text{C}$ (ในช่วง $175\text{-}260^\circ\text{C}$) (รูปที่ 2.27) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวโมเลกุลของออลิโกไคโตซานอาจมีการก่อตัวเป็นผลึก หรือมีการสร้างพันธะใหม่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่ใช้ในการสร้างพันธะใหม่หรือในการก่อตัวเป็นผลึกของออลิโกไคโตซานต่ำกว่ากรณีของไคตินวิสเกอร์ (335°C) และไคโตซานวิสเกอร์ (320°C) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากออลิโกไคโตซานมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าวิสเกอร์ (พิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งตรวจสอบโดยเทคนิค GPC)



รูปที่ 2.26 เทอร์โมแกรม TGA ของออลิโกไคโตซาน



รูปที่ 2.27 เทอร์โมแกรม DSC ของออลิโกไคโตซาน เมื่อสภาวะที่ใช้ในการทดลองเป็นดังนี้ การสแกนความร้อนครั้งที่ 1 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 200 °C การสแกนความร้อนครั้งที่ 2 ตั้งแต่อุณหภูมิ 25 °C ถึง 400 °C และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 20 °C/min

2.3.2 การตรวจสอบองค์ประกอบของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซาน

องค์ประกอบของวัสดุ เช่น ความชื้น เถ้า ไหม้น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเส้นใย รวมทั้งปริมาณขององค์ประกอบดังกล่าวเป็นข้อมูลที่เป็นต้องทราบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำวัสดุดังกล่าวไปใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร หรือสารเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

จากการตรวจสอบองค์ประกอบต่างๆ ของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซาน ทั้ง 4 ชนิด พบว่าไคตินวิสเกอร์มีปริมาณความชื้นค่อนข้างต่ำ (3.38) (ตารางที่ 2.1) เมื่อเทียบกับกรณีของไคโตซาน เช่น ไคโตซานวิสเกอร์และออลิโกไคโตซาน (12.24-14.42) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของไคตินค่อนข้างแข็ง (rigid) และมีความเป็นขี้ (hydrophilicity) น้อยกว่ากรณีของไคโตซานซึ่งประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิล ส่งผลให้โมเลกุลไคโตซานดูดความชื้นได้ดีกว่าโมเลกุลของไคติน อย่างไรก็ตามเมื่อนำไคโตซานไปดัดแปรโครงสร้างทางเคมี เช่น โดยการกราฟท์หมู่พทาโลอิลที่ตำแหน่งหมู่อะมิโนและสายโซ่พอลิเอทิลีนไกลคอลที่ตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่มีปริมาณความชื้นใกล้เคียงกับกรณีของไคติน (3.20) ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ขี้อะมิโนและไฮดรอกซิลถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลอื่นที่มีความเป็นขี้้นน้อยกว่า สำหรับปริมาณเถ้าพบว่าจะอยู่ในช่วง 0.05-0.14% โดยไคโตซานวิสเกอร์มีปริมาณเถ้าสูงที่สุด (ตารางที่ 2.1) ซึ่งหมายความว่าไคโตซานวิสเกอร์ประกอบด้วยสารอนินทรีย์ในปริมาณมากที่สุด เมื่อพิจารณาปริมาณลิปิดพบว่าอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้ทั้ง 4 ชนิด จากโครงการวิจัยนี้ไม่มีลิปิดเป็นองค์ประกอบ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างกระทำได้อ่อนข้างลำบาก เนื่องจากการ

คำนวณหรือการวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่มีในระบบ ซึ่งโดยทั่วไปไคติน-ไคโตซานและอนุพันธ์ประกอบด้วยไนโตรเจนในโครงสร้างอยู่แล้ว จึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าปริมาณไนโตรเจนที่วิเคราะห์หรือตรวจสอบได้จากการทดลองเป็นปริมาณไนโตรเจนที่อยู่บนโครงสร้างหลักของไคติน-ไคโตซาน หรือเป็นปริมาณไนโตรเจนที่อยู่บนโครงสร้างของโปรตีน (กรดอะมิโน) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยคาดว่าสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานและอนุพันธ์ทั้ง 4 ชนิด อาจไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากในระหว่างกระบวนการสกัดสารตั้งต้นไคตินได้มีการทรีตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อกำจัดโปรตีนออกแล้ว ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่คำนวณได้จึงน่าจะมาจากไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบบนโครงสร้างหลักของไคติน-ไคโตซาน ซึ่งพบว่ามีในช่วง 3.88-8.03 % โดยปริมาณไนโตรเจนของไคโตซาน (ไคโตซานวิสเกอร์ (7.97) และออลิโกไคซาน (8.03)) มากกว่าปริมาณของไคติน (ไคตินวิสเกอร์ (6.15)) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากหน่วยย่อยของไคโตซานมีขนาดเล็กกว่าของไคติน อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนของไคโตซานนาโนสเฟียร์หรือไคโตซานที่ผ่านการตัดแปรร (3.88) น้อยกว่าปริมาณของไคโตซานที่ไม่ผ่านการตัดแปรร ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่กราฟท์เข้าไปมีขนาดใหญ่และไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เมื่อพิจารณาปริมาณเส้นใย พบว่าไคตินวิสเกอร์มีปริมาณเส้นใยสูงที่สุด ประมาณ 92.69 % ในขณะที่ไคโตซานวิสเกอร์ ออลิโกไคซาน และไคโตซานนาโนสเฟียร์มีปริมาณเส้นใยต่ำ กล่าวคือ อยู่ในช่วง 0.34-0.75 %

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบและปริมาณขององค์ประกอบ ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

Composition (% dry basis)	Composition			
	Chitin whisker	Chitosan whisker	Chitosan nanosphere	Oligochitosan
Moisture	3.38±0.13	12.24±0.11	3.20±0.07	14.42±0.05
Ash	0.06±0.02	0.14±0.03	0.07±0.03	0.05±0.05
Lipid	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Nitrogen	6.15±0.03	7.97±0.03	3.88±0.04	8.03±0.04
Fiber	92.69±0.41	0.34±0.04	0.75±0.20	0.37±0.06

* Reported as mean±SD (n=3)

2.3.3 การกำหนดคุณลักษณะเฉพาะ (specification) ของสารตัวอย่างไคโตซาน

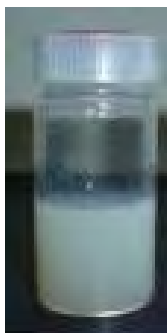
จากการวิเคราะห์ และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของวัสดุนาโนไคติน-ไคโตซานทั้งสี่ชนิด จากการเตรียมสารดังกล่าวหลายๆ ครั้ง (batch) ทำให้สามารถกำหนดคุณลักษณะเฉพาะ (specification) ของสารตัวอย่างได้ดังนี้

2.3.3.1 ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (chitosan nanospheres)



Product Name	Chitosan nanosphere
Chemical Name	<i>N</i> -Phthaloylchitosan grafted with mPEG (Phcts- <i>g</i> -mPEG) Degree of phthaloylation = 0.92±0.04 Grafting percentage of mPEG-COOH = 17.28±1.01
Molecular Formula	C ₁₂₂ H ₂₂₉ NO ₅₇ (per a repeating unit)
Molecular Weight	2612.09 (per a repeating unit)
Storage Temperature	25-30°C
TEST	
Appearance (color)	Faintly yellow
Appearance (form)	Powder
Solubility	DMSO, DMF and KCl/NaOH buffer (pH~12.0)
pH-test	3.91±0.44 (in water)
Carbon content	56.23±0.01
Hydrogen content	4.76±0.08
Nitrogen content	6.66±0.23
DATA	
EA	(C ₁₄ H ₁₃ O ₆ N) _{0.509} (C ₂₄₅ H ₄₇₁ O ₁₂₂ N) _{0.291} (C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _{0.027} (C ₄₆₈ H ₉₂₇ O ₂₃₆ N) _{0.073} (C ₈ H ₁₃ O ₅ N) _{0.064} (C ₂₃₉ H ₄₇₁ O ₁₂ N) _{0.036} ; Anal. Calcd. (%) C, 55.47; H, 6.51; and N, 3.05, Found (%) C, 56.22; H, 4.82; and N, 6.82
FT IR	(KBr, cm ⁻¹) 3464 (OH), 2882 (C-H stretching), 1776 and 1714 (C=O anhydride), 1714 (C=O ester), and 721 (aromatic ring)
¹H NMR	(DMSO-d ₆ , 25°C) (δ, ppm) 2.4 (CH ₂ in succinic anhydride), 3.2 (O-CH ₃), 3.5 (CH ₂ in PEG), 2.8-4.7 (pyranose ring), and 7.6-7.8 (C ₆ H ₅) (DMF-d ₇ , 25°C) (δ, ppm) 2.1 (O-CH ₃), 3.4-4.8 (CH ₂ in PEG), 3.2-5.0 (pyranose ring), and 7.4-8.3 (C ₆ H ₅)
¹³C CP/MAS NMR	(δ, ppm) 23.5 (CH ₃ in acetamide and mPEG), 57.2 (C-2), 64.8 (C-6), 72.7 (C-3, C-5), 80.3 (C-4), 100.0 (C-1), 132.2 (C ₆ H ₅), and 171.5 (C=O in acetamide, anhydride, and ester)
XRD	(2θ, degree) 20
TGA	(T _d , °C) 212-230 (phthalimido group) and 354 (phcts- <i>g</i> -mPEG)
DSC	No peak observed

2.3.3.2 ไคตินวิสเกอร์ (chitin whisker)



Product Name	Chitin whisker
Chemical Name	Chitin
Molecular Formula	$C_{2476}H_{4024}N_{310}O_{1548}$
Molecular Weight	62,838 Dalton
Storage Temperature	5-15°C
TEST	
Appearance (color)	White
Appearance (form)	Colloidal solution in water
Solubility	Refer to chitin
pH-test	5.12±0.27 (in water)
Carbon content	44.34
Hydrogen content	6.77
Nitrogen content	6.58
DATA	
EA	($C_8H_{13}O_5N$) ₃₁₀ , Anal. Calcd. (%) C, 47.29; H, 6.40; and N, 6.90, Found (%) C, 44.34; H, 6.77; and N, 6.58
FT IR	(KBr, cm^{-1}) 3200-3500 (OH), 2800-2900 (C-H stretching), 1658 and 1624 (amide I), and 1559 (amide II)
¹H NMR	-
¹³C CP/MAS NMR	-
XRD	(2θ, degree) 9 and 19
TGA	(T _d , °C) 387
DSC	(T _{exothermic} , °C) 335

2.3.3.3 ไคโตซานวิสเกอร์ (chitosan whisker)



Product Name	Chitosan whisker/ chitosan nanoscaffold
Chemical Name	Chitosan Degree of deacetylation = 0.97
Molecular Formula	$C_{5124}H_{9361}N_{847}O_{3409}$
Molecular Weight	137,262 Dalton
Storage Temperature	5-15°C
TEST	
Appearance (color)	White
Appearance (form)	Colloidal solution in water
Solubility	Acidic aqueous solution (pH ~ 1-4)
pH-test	6.20±0.26
Carbon content	40.41
Hydrogen content	7.34
Nitrogen content	7.74
DATA	
EA	$(C_6H_{11}O_4N)_{827}(C_8H_{13}O_5N)_{20}$, Anal. Calcd. (%) C, 44.80; H, 6.82; and N, 8.64, Found (%) C, 40.41; H, 7.34; and N, 7.74
FT IR	(KBr, cm^{-1}) 3200-3500 (OH), 1660 (amide I), and 1590 (amide II)
1H NMR	(2% CD_3COOD/D_2O-d_2 , 25°C) (δ , ppm) 2.3 (CH_3), 3.4 (H2, pyranose ring), 4.0-4.4 (H3-H6, pyranose ring), and 5.1 (H1, pyranose ring)
^{13}C CP/MAS NMR	-
XRD	(2 θ , degree) 10, 20, and 22
TGA	(T_d , °C) 308
DSC	($T_{exothermic}$, °C) 320

2.3.3.4 ออลิโกไคโตซาน (oligochitosan)



Product Name	Oligochitosan
Chemical Name	Chitosan
	Degree of deacetylation = 0.80
Molecular Formula	$C_{1056}H_{1881}N_{693}O_{165}$
Molecular Weight	$M_n = 11000, M_w = 28000, PDI = 2.6$
Storage Temperature	25-30°C
TEST	
Appearance (color)	Faintly yellow
Appearance (form)	Powder
Solubility	Refer to chitosan
pH-test	6.52±0.04
Carbon content	39.13
Hydrogen content	7.28
Nitrogen content	7.63
DATA	
EA	$(C_6H_{11}O_4N)_{132}(C_8H_{13}O_5N)_{33}$, Anal. Calcd. (%) C, 45.34; H, 6.73; and N, 8.26, Found (%) C, 39.19; H, 7.28; and N, 7.63
FT IR	(KBr, cm^{-1}) 3433 (OH), 2895 (C-H stretching), 1668 (amide I), 1610 (amide II), 1103 (C-O-C), and 916 (pyranose ring)
1H NMR	$(CD_3COOD/D_2O, 20^\circ C)$ (δ , ppm) 1.87 (CH_3), 3.00 (H2, pyranose ring), 3.57-3.74 (H3-H6, pyranose ring), and 4.7 (H1, pyranose ring)
^{13}C CP/MAS NMR	-
XRD	(2θ , degree) 10, 20, and 22
TGA	(T_d , °C) 337
DSC	($T_{exothermic}$, °C) 215

2.4 สรุปผลการทดลอง

ในบทนี้ได้กล่าวถึงการเตรียม การวิเคราะห์ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี สมบัติทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของสารตัวอย่างอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน 4 ชนิด ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ และออลิโกไคโตซาน โดยเทคนิค FTIR, NMR, EA, XRD, SEM, TEM, TGA, DSC และ GPC และยังได้ตรวจสอบปริมาณขององค์ประกอบสำคัญ เช่น ความชื้น เถ้า โปรตีน ลิพิด และเส้นใย เป็นต้น ของสารตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้กล่าวถึงการกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางด้านคุณค่าทางโภชนาการของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน จากการทดลองพบว่า การเตรียมวัสดุไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ และออลิโกไคโตซาน เป็นผลสำเร็จ ออลิโกไคโตซานสามารถละลายน้ำได้ ในขณะที่ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถแขวนลอยกระจายตัวในน้ำได้และให้คอลลอยด์ที่มีความเสถียรระดับหนึ่ง อนุภาคออลิโกไคโตซานที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นเกล็ดหลายเหลี่ยม รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดประมาณ 100-250 μm ไคตินวิสเกอร์มีลักษณะเป็นเส้นใยสั้นๆ คล้ายหลอดแก้ว/ขนแมว ที่มีขนาดเล็กมาก คือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\sim 50-100$ นาโนเมตร และความยาว ~ 1000 นาโนเมตร ไคตินวิสเกอร์มีลักษณะเป็นเส้นใยเช่นกัน แต่มีความยาวและสานกันเป็นโครงสร้างตาข่าย ในขณะที่ไคโตซานนาโนสเฟียร์เป็นอนุภาคที่มีลักษณะกลม และมีขนาดประมาณ 100-250 nm

2.5 เอกสารอ้างอิง

1. Li, J.; Revol, J.F.; and Marchessault, R.H. *Journal of Applied Polymer Science* 1997, 65, 373-380.
2. Yoksan, R.; Matsusaki, M.; Akashi, M.; and Chirachanchai, S. *Colloidal Polymer Science* 2004, 282, 337-342.
3. Nair, K. G.; and Dufresne, A. *Biomacromolecules* 2003, 4, 666-674.
4. Phongying, S.; Aiba, S. I.; and Chirachanchai, S. *Biopolymers* 2006, 83, 280-288
5. Kuttiyawong, K.; Nakapong, S.; and Pichyangkura, R. *Carbohydrate Research* 2008, 343, 2754-2762.

ต่อข้อต่อ กระดูกอ่อน นอกจากนี้ ในเชิงชีวเคมี วัสดุไคติน-ไคโตซาน ยังมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ดังนั้นการพัฒนาวัสดุนี้เพื่อใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารจำพวกอาหารแห้ง เช่น กะปิ ปลา ร้า น้ำปลา หรือ อาหารสดบางประเภทเช่น แหนม เต้าหู้ ลูกชิ้นปลา นอกจากจะเป็นการเพิ่มคุณค่าอาหาร ด้วยอะมิโนแซคคาไรด์แล้ว ยังเป็นการถนอมอาหารที่จะทำให้อาหารดังกล่าวปราศจากการรบกวนของ เชื้อรา และแบคทีเรีย

แผนภาพด้านล่างเป็นการเชื่อมโยงระหว่างที่มาและความสำคัญของปัญหา กับแนวทางการ แก้ไขปัญหาหรือแนวทางที่นำไปสู่การวิจัยของโครงการฯ

แผนผังแสดงความสำคัญ และปัญหาที่นำไปสู่การวิจัย

สถานภาพในปัจจุบัน

วัสดุชีวภาพ

วัสดุไคติน-ไคโต



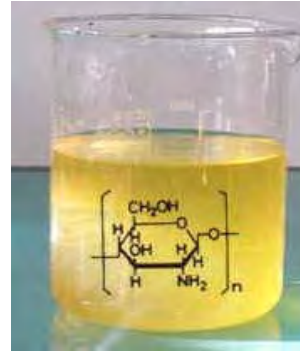
จุดเด่น

- มีมากที่สุดในโลก รองจากเซลลูโลส
- มีสมบัติการเข้ากับสิ่งมีชีวิตได้
- ไม่เป็นพิษหรืออันตราย
- เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ
- สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากระบบได้เอง

ที่มาของปัญหา ซึ่งนำไปสู่การทำวิจัย

ลักษณะทางกายภาพของไคติน-ไคโตซานที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้

- ไคโตซานในรูปสารละลายในกรดเจือจาง
- ไคโตซานในรูปแผ่นและผง (Flake, Powder)



สารละลายไคโตซาน



ผงไคโตซาน

ข้อจำกัด

- ละลายในตัวทำละลายบางชนิด อาทิเช่น สารละลายกรดเจือจาง
- มีมวลโมเลกุลสูง
- มีความหนืดสูง
- ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายสายโซ่ยาว และไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย

แนวทางการวิจัย

ประเด็นหลักของงานวิจัย

(1)

การเตรียมไคติน/ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ละลายน้ำได้ หรือแขวนลอยกระจายตัวในน้ำได้

- ออลิโกออลิโกออลิโกออลิโกออลิโกไคติน/ไคโตซาน (ไคติน/ไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ)

ตัวอย่าง



ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์

คุณสมบัติพิเศษ

- คลุ้งขาวในน้ำและเสถียร
- ไม่เป็นอันตราย
- ไม่ผ่านกรรมวิธีปรับโครงสร้างทาง

ประเด็นหลักของงานวิจัย

(2)

การประยุกต์ใช้สารที่เตรียมได้เพื่อเติมแต่งและรักษาคุณภาพอาหาร

- สารเพิ่มคุณค่าทางอาหารและยา
- สารถนอมอาหาร
- อาหารแห้งหรือสดต้นแบบ
- อาหารแห้งหรือสดเชิง

ผลงานที่คาดว่าจะได้

- สิทธิบัตร
- ผลงานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ
- การเผยแพร่และการตลาดสู่สังคมไทยและสังคม

ความคาดหวังในอนาคต

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

1.1.1 ไคติน-ไคโตซาน

ไคติน-ไคโตซาน เป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีมากที่สุดในโลก รองจากเซลลูโลส (Cellulose) พบได้มากในสัตว์จำพวก กุ้ง ปู และหมีก ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีธาตุไนโตรเจน เกาะอยู่ในโมเลกุล และมีสมบัติพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility)² ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (Non toxicity)³ เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity)⁴ สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากระบบได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง (Biodegradability)⁵ และมีโครงสร้างทางเคมีที่เอื้อต่อการเกิดพันธะต่างๆ ทั้งในรูปแบบพันธะทุติยภูมิ และ พันธะโควาเลนต์ จึงมีการนำไคติน-ไคโตซานรูปแบบต่างๆ มาประยุกต์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท¹ ตัวอย่างเช่น

- อุตสาหกรรมยาและวัสดุการแพทย์: ใช้ผลิตไหมเย็บแผลที่ละลายได้เอง วัสดุซับเลือด ปิดแผล สารตัวกลางที่ควบคุมการปลดปล่อยยาออกมาอย่างช้าๆ
- อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง: ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม ดูแลผิว และดูแลช่องปาก
- อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์: ใช้ผลิตภาชนะที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และฟิล์มถนอมอาหารที่รับประทานได้
- อุตสาหกรรมเส้นใยและสิ่งทอ: ใช้ผลิตผ้าที่สามารถต้านทานแบคทีเรียได้
- อุตสาหกรรมกระดาษ: ใช้เคลือบกระดาษ เพื่อคงสภาพกระดาษไว้ได้นานๆ
- สิ่งแวดล้อม เช่นด้านการบำบัดน้ำเสีย ใช้ในจับคราบไขมัน และบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมต่างๆ
- การเกษตร เช่นการใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ใช้เคลือบเพื่อควบคุมความสุกหรือเน่าเสียของผลิตผลทางการเกษตร
- โภชนาการ เช่นใช้ในการถนอมอาหารเพื่อยืดอายุและป้องกันเชื้อรา ใช้ผลิตอาหารควบคุมน้ำหนักและลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เป็นต้น

1.1.2 การใช้ไคติน-ไคโตซานเพื่อการถนอมอาหาร

ไคติน-ไคโตซานได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 1.1 โดยไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรด ไคโตซานจะมีจำนวนประจุบวกของหมู่อะมิโนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยกลูโคซามีนมากกว่าไคติน Chang et al.⁶ ได้แสดงถึงการนำไคโตซานไปผสมกับเต้าหู้ โดยการเตรียมสารละลายไคโตซานในกรดน้ำส้ม 5% แล้วนำไปผสมกับนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที จากงานวิจัยนี้พบว่า การเติมไคโตซานลงไปในเต้าหู้ สามารถช่วยยืด

อายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากปกติ 5 วัน เป็นนานถึง 7-13 วัน นอกจากนี้ยังรายงานว่าการใช้ไคโตซานที่มี %DD สูง สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าไคโตซานที่มี %DD ต่ำ เนื่องจากไคโตซานที่มี %DD สูงมีจำนวนประจุบวกมากกว่า ซึ่งประจุบวกนี้เองจะทำหน้าที่ไปจับกับประจุลบของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อีกมากมาย เช่น Roller and Corvill รายงานถึงการผสมไคโตซานลงไปใต้น้ำสลัดมายองเนส⁷ และน้ำแอปเปิ้ล⁸ เป็นต้น

ตารางที่ 1.1 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต¹⁴

แบคทีเรีย		รา
Gram positive	Gram negative	
- Staphylococcus aureus	- Escherichia coli	- Botrytis cinerea
- Listeria monocytogenes	- Vibrio parahaemolyticus	- Rhizopus stolonifer
- Bacillus cereus	- Pseudomonas aeruginosa	- Aspergillus niger
	- Shigella dysenteriae	- Aspergillus parasiticus
	- Vibrio cholerae	
	- Aeromonas hydrophila YMI	
	- Aeromonas hydrophila CCRC 13881	
	- Salmonella typhimurium	

ถึงแม้ว่าไคตินและไคโตซานจะมีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม มวลโมเลกุลที่สูงและความหนืดที่สูงของพอลิเมอร์อาจจำกัดการใช้งานบางประเภท ตัวอย่างเช่น Young et al.⁹ ได้รายงานถึงการเติมไคโตซานมวลโมเลกุล 30,000 ถึง 120,000 ลงไปในไส้กรอก เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถต่อต้านการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเท่ากับการเติม NaNO_2 ลงไปในไส้กรอก แต่มีปัญหาด้านความหนืดที่สูงของไคโตซานส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในลำไส้ของสัตว์ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์จำพวก ไคตินเนสและไคโตซานเนส ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคตินและไคโตซานโดยตรง ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายไคซานมวลโมเลกุลสูงและดูดซึมต่อไปได้¹⁰ ดังนั้น การใช้ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ออลิโกไคโตซาน (มวลโมเลกุลระดับ $10^3 \sim 10^4$ Dalton) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง Jo et al.¹¹ รายงานถึงการใส่ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 5,000 ผสมลงในไส้กรอก แล้วนำไปเปรียบเทียบกับไส้กรอกที่ผลิตด้วยกรรมวิธีปกติ ผลการทดลองพบว่าการ

เติมโคโคซานมวโมเลกุลต่ำไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของไส้กรอก ซึ่งได้แก่ สี สัน รสชาติ และความเหนียวของไส้กรอก

1.1.3 การใช้โคติน-โคซานเพื่อผลิตอาหารควบคุมน้ำหนัก และลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด

โคติน-โคโคซานเป็นอาหารเสริมที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากในร่างกายคนไม่มีเอนไซม์ช่วยย่อยโคติน-โคโคซาน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้โคโคซานยังมีคุณสมบัติในการจับคอเลสเตอรอลในอาหาร โดยในระบบทางเดินอาหาร โคโคซานจะไปจับกับคอเลสเตอรอลแล้วสร้างรูปร่างเป็นไมเซล ส่งผลให้การดูดซึมของคอเลสเตอรอลในระบบทางเดินอาหารลดลง¹² ดังนั้นโคโคซานจึงสามารถช่วยรักษาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และยังช่วยป้องกันหรือลดความเสี่ยงของการเป็นโรคหัวใจ ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการผลิตอาหารที่มีโคโคซานเป็นส่วนผสมหลายชนิด เช่น คุกกี้ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เส้นก๋วยเตี๋ยว และน้ำส้มสายชู เป็นต้น¹³

1.1.4 การใช้โคโคซานเป็นสารเติมแต่ง

สารเติมแต่งคือ สารใดๆก็ตามที่ถูกเติมลงไปในการอาหาร โดยมีจุดประสงค์หลากหลาย เช่น เพื่อรักษารสชาติ หรือสี สัน ให้กับอาหาร สำหรับโคโคซาน ในปี ค.ศ. 1983 โคโคซานได้รับการยอมรับจาก USFDA (The United States Food and Drug Administration) ให้เป็นสารเติมแต่งอาหาร¹ จึงได้มีการนำโคโคซานมาใช้เพื่อรักษาสีของอาหารให้คงทน เนื่องจากโคโคซานมีคุณสมบัติในการดูดซับสีได้ดี นอกจากนี้ยังมีการใช้โคโคซานเพื่อคงรูปอาหารหรือเพื่อเพิ่มความเหนียวให้กับอาหาร¹⁴

1.2 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องด้วยคุณสมบัติหลายอย่างของโคติน-โคโคซานที่เหมาะสมสำหรับนำมาเป็นสารเติมแต่งอาหาร เช่น คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บของอาหาร คุณสมบัติในการเป็นเส้นใยหรือไฟเบอร์จากสัตว์ที่ไม่มีรสหวาน ไม่ละลายน้ำ ไม่ย่อยในกระเพาะอาหารของคน ไม่ให้พลังงาน แต่มีประโยชน์ต่อระบบขับถ่ายและสามารถใช้เป็นอาหารควบคุมน้ำหนัก คุณสมบัติในการจับไขมันและคอเลสเตอรอลที่ช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ โรคอ้วน โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด คุณสมบัติในการดูดซับสีเพื่อรักษาสี สัน ของอาหารให้คงทน และคุณสมบัติในการป้องกันการแพทย์ว่าสามารถย่อยสลายในร่างกายเป็นน้ำตาลโมเลกุลต่ำจำพวกอะมิโนแซคคาไรด์ที่จำเป็นต่อข้อต่อกระดูกอ่อน อีกทั้ง ในปัจจุบันยังมีการเลือกใช้วิธีการถนอมอาหารที่ผิดวิธี เช่น การใช้สารโซเดียมเบนโซเอท โซเดียมไนเตรท หรือการใช้สารประเภท ซัลไฟท์ เพื่อให้สีผลไม้ไม่เปลี่ยนและรักษาความกรอบ ทำให้ผู้บริโภคบางกลุ่มเกิดการแพ้อาหารได้ ดังนั้นโคติน-โคโคซานจึงมีความ

เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารเติมแต่งอาหารจำพวกอาหารแห้ง เช่น กะปิ ปลา ร้า น้ำปลา หรืออาหารสดบางประเภท เช่น แหนม เต้าหู้ ลูกชิ้นปลา เพื่อเพิ่มคุณค่าของอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา และเพิ่มมูลค่าของเปลือกกุ้ง เปลือกปู หรือแกนปลาหมึก ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ที่ไม่มีประโยชน์แล้ว

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 เพื่อพัฒนาวัสดุจากอาหารแห้งแข็งจำพวกเปลือกกุ้ง เปลือกปู สำหรับเป็นวัสดุธรรมชาติที่ปลอดภัย เพื่อเติมแต่งคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหาร

1.3.2 เพื่อเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาที่คณะวิจัยมีอยู่แล้ว เกี่ยวกับการผลิตสารไคติน-ไคโตซานมวลดโมเลกุลต่ำไปประยุกต์ให้เกิดเป็นเทคโนโลยีของประเทศ โดยใช้จุดเด่นของประเทศไทยด้านความอุดมสมบูรณ์ด้านอาหาร

1.3.3 เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ และนวัตกรรม ไปสู่เทคโนโลยีระดับสูง

1.3.4 เพื่อสร้างบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้ เป็นโครงการบูรณาการที่รวมตั้งแต่กระบวนการผลิต จนถึงการสร้างผลิตภัณฑ์และการยกระดับสู่การผลิตในอุตสาหกรรม ตลอดจนการศึกษาแนวทางการพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ระดับนานาชาติ

1.4.1 ผลิตอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานมวลดโมเลกุลต่ำ หรือ ออลิโกไคโตซาน ทั้งแบบผงและแบบเส้นใยในระดับนาโน ด้วยกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ

1.4.2 ศึกษาสมบัติออลิโกไคโตซานในการเร่งการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อน

1.4.3 ศึกษาการเติมแต่งอาหารทั้งรูปแบบของอาหารแห้งและอาหารสด รวมทั้งผลของการถนอมอาหาร

1.4.4 ศึกษาคุณค่าด้านโภชนาการ ความปลอดภัย ตลอดจนรสชาติ สี สัน

1.4.5 ศึกษาแนวทางการปรับปรุงผลิตภัณฑ์เพื่อความเหมาะสมด้านการบริโภค

1.4.6 ศึกษาการพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรม

1.5 เอกสารอ้างอิง

1. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; and Jeon, Y. Trends in Food Science & Technology 1999, 10, 37-51.
2. a) Richardson, S.C.; Kolbe, H. V.; and Duncan, R. *Int. J. Pharm.* 1999, 178 (2), 231. b) Pruden, J. F.; Miegel, P.; Friedlich, L.; and Balassa, L. *American Journal of Surger* 1970, 119, 5, 560-564.

3. a) Yamamoto, H. and Amaike, M.; *Macromolecules* 1997, 30, 3936-3937. b) Tomihata, K. and Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18, 567-575.
4. a) Uragami, T.; Mori, H.; Noishiki, Y.; and Jinko Zoki. 1988, 17, 2,511-514. b) Matsuhashi, S. and Kume, T. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 237-241. c) Dumitriu, S.; Popa, M. I.; Cringiu, A.; and Stratone, A. *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 595-599.
5. Amano, K. and Ito, E. *European Journal of Biochemistry* 1978, 85, 1, 97-104.
6. Chang, K.L.B.; Lin, Y.-S.; and Chen, R.H. *Journal of Food Engineering* 2003, 57, 315-319.
7. Roller, S. and Corvill, N. *Journal of Food Protection* 2000, 63, 202-209.
8. Roller, S. and Corvill, N. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 47, 67-77.
9. Youn, S.K.; Park, S. M.; Kim, Y.J.; and Ahn, D.H. *Journal of Chitin and Chitosan* 1999, 4, 189-195.
10. Fukamizo, T. and Brzezinski, R. *Biochemical Cell Biology* 1997, 75, 687-696.
11. Jo, C.; Lee, J.W.; Lee, K.H.; and Byun, M.W. *Meat Science* 2001, 59, 369-375.
12. Muzzarelli, R.A.A. *Carbohydrate Polymers* 1996, 29, 309-316.
13. Hirano, S. In *Chitin and Chitosan*; Elsevier Applied Science:London, 1989; pp. 51-69.
14. Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; and Jeon, Y.-J. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 10, 37-51.

บทที่ 3

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลอง ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

Study on acute oral toxicity of chitin-chitosan derivatives

3.1 บทนำ

ไคติน-ไคโตซานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติ รองจากเซลลูโลส วัสดุดังกล่าวสกัดได้จากเปลือกและแกนของสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง ปู และปลาหมึก เป็นต้น ซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแปรรูปและอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง ที่มีปริมาณมากในประเทศไทย ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีสมบัติพื้นฐาน คือ เข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility)¹ ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (non toxicity)² เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity)³ สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากระบบได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง (biodegradability)⁴

ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการรายงานเกี่ยวกับการนำไคโตซานในรูปของสารละลายมาประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งและรักษาคุณภาพอาหารในด้านต่างๆ อาทิเช่น ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเต้าหู้ ใช้เป็นสารเพิ่มความใสในน้ำผลไม้⁵ อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์อย่างจริงจังของไคติน-ไคโตซานในอุตสาหกรรมอาหารยังคงมีจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุดังกล่าวยังไม่ผ่านการรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา (อย.) ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลองของวัสดุไคติน-ไคโตซานและอนุพันธ์ที่เตรียมได้จากโครงการฯ นี้จึงมีความสำคัญและจำเป็น ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงปริมาณสูงสุดของสารไคติน-ไคโตซานและอนุพันธ์ที่สามารถบริโภคได้ โดยไม่เป็นอันตราย หรือ ค่า LD₅₀ นั่นเอง หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งเพื่อยืนยันความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้อนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในระบบสิ่งมีชีวิต (bio-system) ก่อนที่จะศึกษาถึงการนำวัสดุดังกล่าวไปใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหาร หรือสารถนอมอาหารต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางสำหรับการขึ้นทะเบียนรับรองความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา เพื่อเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้บริโภค

3.2 วิธีการทดลอง

ความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลอง (acute oral toxicity) ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซาน ทดสอบตาม Guideline No. 423 : Acute oral toxicity-Acute toxic class method of the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) Guidelines for Testing of Chemicals (2001) ซึ่งมีการดัดแปรโดยการให้สารตัวอย่าง (dose) กำหนดทดลองในปริมาณที่มากขึ้น

3.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในการทดลองจะใช้หนูวิสตัดาร์ (Wistar rat) เป็นสัตว์ทดลองจำนวน 20 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว (เพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว) และกลุ่มทดลองจำนวน 10 ตัว (เพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 5 ตัว) หนูทดลองทุกตัวถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องทดลอง เพื่อให้เคยชินกับสภาวะอากาศเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนที่จะทำการทดลอง จากนั้นถูกกักบริเวณเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และให้กินเฉพาะน้ำ ก่อนที่จะให้สารตัวอย่างผ่านทางปาก หนูทดลองทุกตัวจะถูกเลือกแบบสุ่ม (random) เพื่อจัดกลุ่ม (กลุ่มทดลองหรือกลุ่มควบคุม) และทำเครื่องหมายไว้ที่หางเพื่อให้ทราบว่าเป็นหนูทดลองในกลุ่มทดลองหรือกลุ่มควบคุม

3.2.2 การเตรียมสารตัวอย่างและการป้อนสารตัวอย่างแก่หนูทดลองผ่านทางปาก (administration)

สารตัวอย่างอนุพันธ์โคติน-โคโคซาน 4 ชนิด (สำหรับสารตั้งต้นโคตินวิสเกอร์และโคโคซาน วิสเกอร์อยู่ในรูปของคิสเพอร์สชันในน้ำที่มีความเข้มข้นเป็น 25.34 ± 1.79 และ 17.685 ± 2.943 mg/ml ตามลำดับ ส่วนสารตั้งต้นโคโคซานนาโนสเฟียร์และออลิโกโคโคซานอยู่ในรูปแห้ง) ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปคิสเพอร์สชันในน้ำกลั่นสำหรับสารตัวอย่างโคตินวิสเกอร์ โคโคซานวิสเกอร์ และโคโคซานนาโนสเฟียร์ และในรูปสารละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1 %v/v สำหรับสารตัวอย่างออลิโกโคโคซาน แล้วให้ผ่านทางปากของหนูทดลองในกลุ่มทดลองด้วยปริมาณ 2,000 และ 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่คำนวณได้ภายหลังการกักบริเวณ สำหรับหนูทดลองในกลุ่มควบคุมจะให้เฉพาะน้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารตัวอย่างที่ให้ในกรณีของหนูทดลองในกลุ่มทดลอง

3.2.3 การสังเกต

หลังจากให้สารตัวอย่างแก่หนูทดลองแล้ว หนูทดลองทั้งสองกลุ่มจะถูกกักบริเวณอีก 3-4 ชั่วโมง โดยให้กินเฉพาะน้ำ แล้วสังเกตลักษณะอาการที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษ (toxic signs) ทันทีเมื่อเวลาผ่านไป 0.5, 1 และ 3 ชั่วโมง และหากหนูทดลองมีอาการผิดปกติภายใน 4 ชั่วโมงแรกภายหลังการให้สารตัวอย่าง ต้องให้การดูแลเป็นพิเศษหรือสังเกตอย่างละเอียด จากนั้นสังเกตทุกวันวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน บันทึกเวลาที่หนูทดลองแสดงอาการซึ่งบ่งชี้ถึงความเป็นพิษและเวลาที่หนูทดลองทุเลาจากอาการดังกล่าว (recover) เพื่อที่จะหาระยะเวลาที่หนูทดลองฟื้นตัว (duration of recovery period)

3.2.3.1 น้ำหนักตัวหนูทดลอง

น้ำหนักตัวของหนูทดลองถูกบันทึกวันที่ 1 (ก่อนให้สารตัวอย่าง) 8 และ 15 (เมื่อสิ้นสุดการทดลอง) หรือภายหลังจากหนูทดลองตายในระหว่างที่ทำการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักถูกบันทึกและคำนวณ สำหรับวันสุดท้ายของการทดลอง หนูทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่ถูกบันทึกน้ำหนัก และฆ่าโดยการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ asphyxiation) คำนวณการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย

(mean body weight gain) ของหนูทดลองในกลุ่มทดลองเพื่อเปรียบเทียบกับกรณีของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม

3.2.3.2 การตรวจสอบชิ้นเนื้อ

หนูทดลองทั้งหมด (ทั้งที่ยังมีชีวิตรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และที่ตายในระหว่างการทดลอง) ถูกนำมาตรวจสอบชิ้นเนื้อ

3.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลองทำโดยใช้หนูวิสตาร์ และทดสอบกับสารตัวอย่างอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน 4 ชนิด ซึ่งสารตัวอย่าง 3 ชนิดอยู่ในรูปดิสเพอร์ชันในน้ำกลั่น ได้แก่ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ สำหรับสารตัวอย่างออลิโกไคโตซานอยู่ในรูปสารละลาย (ในตัวทำละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1 %v/v) เนื่องจากสารดังกล่าวไม่สามารถกระจายตัวในน้ำ)

จากผลการทดลองที่มีการให้สารตัวอย่างไคตินวิสเกอร์ และไคโตซานวิสเกอร์ ผ่านทางปากของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองทุกตัวมีลักษณะปกติและรอดชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังจะเห็นได้จากอัตราการตายเป็นศูนย์ (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) และพบว่าค่าเฉลี่ยของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในกลุ่มทดลองน้อยกว่ากรณีของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด เมื่อให้สารไคตินวิสเกอร์ในปริมาณ 2,000 และ 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ตารางที่ 3.1) สำหรับไคโตซานวิสเกอร์ พบว่าค่าเฉลี่ยของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองเพศผู้ในกลุ่มทดลองน้อยกว่ากรณีของหนูทดลองในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อให้สารไคโตซานวิสเกอร์ในปริมาณ 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (ตารางที่ 3.2) นอกจากนี้จากการตรวจสอบซากหนูที่รอดชีวิตทั้งหมดพบว่ามีไม่มีการฟกช้ำของชิ้นเนื้อ (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปได้สารไคตินวิสเกอร์ และไคโตซานวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) มีค่า LD₅₀ มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หนูวิสตาร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

สำหรับกรณีของไคโตซานนาโนสเฟียร์ พบว่าหนูทดลองมีลักษณะปกติ แต่ในวันที่ 8 ค่าเฉลี่ยของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองเพศผู้ในกลุ่มทดลองน้อยกว่ากรณีของหนูทดลองเพศผู้ในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน และผลดังกล่าวนี้ก็เกิดขึ้นกับหนูทดลองเพศเมียในวันที่ 15 หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งอัตราการเจริญเติบโตของหนูทดลองในกลุ่มทดลองลดลงในวันที่ 8 และ 15 สำหรับหนูทดลองเพศผู้และเพศเมีย ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหนูทดลองทุกตัวมีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง และจากการตรวจสอบซากหนูที่รอดชีวิตทั้งหมดพบว่ามีไม่มีการฟกช้ำของชิ้นเนื้อ ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารไคโตซานนาโนสเฟียร์ (กระจายตัวในน้ำ) มีค่า LD₅₀ มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หนูวิสตาร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ตารางที่ 3.3)

สำหรับกรณีของออลิโกโคโคโตซานพบว่าหนูทดลองทุกตัวมีลักษณะปกติและรอดชีวิตเมื่อสิ้นสุดการทดลองและค่าเฉลี่ยของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียในวันที่ 8 และ 15 แทบไม่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้จากการตรวจสอบซากหนูที่รอดชีวิตทั้งหมดพบว่าไม่มีการฟกช้ำของชิ้นเนื้อ อย่างไรก็ตามปริมาณสูงสุดของสารออลิโกโคโคโตซานที่ใช้ในการทดสอบถูกจำกัดเพียง 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดด้านการละลาย ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าออลิโกโคโคโตซาน (ละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1 %v/v) มีค่า LD₅₀ มากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนูวิสตาร์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นไคตินวิสเกอร์

Treatment/Dose	Sex	Body weight (g)			^b Mean of body weight gain (g)		Gross pathological finding	^d Mortality rate
		^a Day 1	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15		
Control group "Distilled water" at the equivolume as the treatment group	Male	220	278	307	58.40 ± 2.22	90.80 ± 3.10	Normal	0/5
		249	311	348			Normal	
		241	291	322			Normal	
		242	302	335			Normal	
		232	294	326			Normal	
	Female	184	221	242	28.40 ± 5.46	52.00 ± 4.46	Normal	0/5
		195	225	246			Normal	
		188	203	235			Normal	
		200	243	265			Normal	
		199	216	238			Normal	
Treatment group "Chitin whisker (suspension in water)" 2,000 mg/kg body weight	Male	237	291	311	53.00 ± 7.40	^c 76.60 ± 8.10	Normal	0/5
		242	275	291			Normal	
		231	297	317			Normal	
		240	312	338			Normal	
		222	262	298			Normal	
	Female	199	232	245	30.00 ± 1.64	^c 41.00 ± 4.19	Normal	0/5
		179	213	233			Normal	
		188	218	223			Normal	
		195	223	235			Normal	
		185	210	215			Normal	
Treatment group "Chitin whisker (suspension in water)" 15,000 mg/kg body weight	Male	226	311	338	58.00 ± 7.07	^c 78.20 ± 8.98	Normal	0/5
		220	267	287			Normal	
		230	276	290			Normal	
		232	289	310			Normal	
		235	290	309			Normal	
	Female	185	204	224	25.20 ± 2.17	45.20 ± 4.00	Normal	0/5
		182	212	240			Normal	
		191	213	228			Normal	
		195	225	246			Normal	
		190	215	231			Normal	

^a Recorded as initial body weight of rats after 16- hr overnight fasting time.

^b Data shown in the table are mean ± SEM.

^c Statistically significant difference (Student's t-Test) at 95 % confidential level.

^d Number of dead rats/number of rats tested.

ตารางที่ 3.2 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นไคโตซานวิสเกอร์

Treatment/Dose	Sex	Body weight (g)			^b Mean of body weight gain (g)		Gross pathological finding	^d Mortality rate
		^a Day 1	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15		
Control group "Distilled water" at the equivolume as the treatment group	Male	246	310	341	59.80 ± 5.04	88.80 ± 5.59	Normal	0/5
		244	311	342			Normal	
		245	286	312			Normal	
		240	309	334			Normal	
		262	320	352			Normal	
	Female	192	211	234	19.81 ± 2.08	41.60 ± 1.69	Normal	0/5
		209	221	244			Normal	
		184	207	228			Normal	
		182	205	226			Normal	
		204	226	247			Normal	
Treatment group "Chitosan whisker (suspension in water)" 2,000 mg/kg body weight	Male	251	321	344	66.80 ± 1.35	88.20 ± 1.35	Normal	0/5
		241	305	328			Normal	
		244	310	331			Normal	
		257	327	346			Normal	
		240	304	325			Normal	
	Female	189	216	234	25.00 ± 3.77	44.80 ± 3.41	Normal	0/5
		197	211	230			Normal	
		209	244	261			Normal	
		204	223	247			Normal	
		202	232	253			Normal	
Treatment group "Chitosan whisker (suspension in water)" 15,000 mg/kg body weight	Male	246	283	314	^c 46.40 ± 2.44	^c 76.00 ± 2.30	Normal	0/5
		257	306	335			Normal	
		252	303	334			Normal	
		253	301	330			Normal	
		246	293	321			Normal	
	Female	164	185	216	25.00 ± 2.60	46.40 ± 2.58	Normal	0/5
		211	232	251			Normal	
		195	230	248			Normal	
		192	217	236			Normal	
		187	210	230			Normal	

^a Recorded as initial body weight of rats after 16- hr overnight fasting time.

^b Data shown in the table are mean ± SEM.

^c Statistically significant difference (Student's t-Test) at 95 % confidential level.

^d Number of dead rats/number of rats tested.

ตารางที่ 3.3 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นไคโตซานนาโนสเฟียร์

Treatment/Dose	Sex	Body weight (g)			^b Mean of body weight gain (g)		Gross pathological finding	^d Mortality rate
		^a Day 1	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15		
Control group "Distilled water" at the equivolume as the treatment group	Male	262	284	352	23.00 ± 1.34	75.80 ± 3.83	Normal	0/5
		229	257	298			Normal	
		243	265	312			Normal	
		231	254	306			Normal	
		248	268	324			Normal	
	Female	196	215	242	21.20 ± 0.58	52.40 ± 2.58	Normal	0/5
		202	224	261			Normal	
		194	216	243			Normal	
		190	212	240			Normal	
		205	226	263			Normal	
Treatment group "Chitosan nanosphere (suspension in water)" 2,000 mg/kg body weight	Male	245	268	322	^c 20.00 ± 1.41	79.60 ± 3.61	Normal	0/5
		228	247	316			Normal	
		248	269	330			Normal	
		250	272	334			Normal	
		279	294	346			Normal	
	Female	196	215	236	20.00 ± 1.46	^c 43.00 ± 2.55	Normal	0/5
		175	201	228			Normal	
		195	213	237			Normal	
		196	215	237			Normal	
		186	208	225			Normal	
Treatment group "Chitosan nanosphere (suspension in water)" 15,000 mg/kg body weight	Male	234	257	326	^c 20.00 ± 1.34	98.40 ± 2.90	Normal	0/5
		247	268	354			Normal	
		249	269	348			Normal	
		250	271	352			Normal	
		238	253	330			Normal	
	Female	197	216	242	20.80 ± 1.07	^c 48.20 ± 0.97	Normal	0/5
		196	217	244			Normal	
		213	231	262			Normal	
		180	202	231			Normal	
		194	218	242			Normal	

^a Recorded as initial body weight of rats after 16- hr overnight fasting time.

^b Data shown in the table are mean ± SEM.

^c Statistically significant difference (Student's t-Test) at 95 % confidential level.

^d Number of dead rats/number of rats tested.

ตารางที่ 3.4 น้ำหนักตัวในระหว่างการทดลอง การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ย การตรวจสอบชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และอัตราการตายของหนูทดลองในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง เมื่อสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นออลิโกไคโตซาน

Treatment/Dose	Sex	Body weight (g)			^b Mean of body weight gain (g)		Gross pathological finding	^c Mortality rate
		^a Day 1	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15		
Control group "1% v/v acetic acid in water" at the equivolume as the treatment group	Male	249	265	331	20.20 ± 1.74	82.60 ± 6.93	Normal	0/5
		244	262	314			Normal	
		261	287	352			Normal	
		250	272	354			Normal	
		244	263	310			Normal	
	Female	194	216	230	18.00 ± 1.92	34.80 ± 2.51	Normal	0/5
		190	210	229			Normal	
		218	229	243			Normal	
		198	215	234			Normal	
		188	208	226			Normal	
Treatment group "Oligochitosan (in 1% v/v acetic acid in water)" 2,000 mg/kg body weight	Male	230	253	331	23.00 ± 0.55	87.80 ± 4.32	Normal	0/5
		230	254	317			Normal	
		252	273	328			Normal	
		245	268	338			Normal	
		242	266	324			Normal	
	Female	195	214	235	19.40 ± 0.98	38.80 ± 1.20	Normal	0/5
		190	210	230			Normal	
		191	213	231			Normal	
		218	234	252			Normal	
		201	221	241			Normal	
Treatment group "Oligochitosan (in 1% v/v acetic acid in water)" 15,000 mg/kg body weight	No test due to the solubility limitation							

^a Recorded as initial body weight of rats after 16- hr overnight fasting time.

^b Data shown in the table are mean ± SEM.

^c Number of dead rats/number of rats tested.

3.4 สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันผ่านทางปากในสัตว์ทดลอง (หนูวิสตาร์) ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด พบว่าไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ แสดงค่า LD₅₀ สูงกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู สำหรับออลิโกไคโตซานแสดงค่า LD₅₀ สูงกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวหนู และไม่พบหนูตายในระหว่างการทดลอง รวมทั้งความผิดปกติของชิ้นเนื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งให้เห็นว่าสารตัวอย่างอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิดมีความปลอดภัย สามารถบริโภคได้ และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้

3.5 เอกสารอ้างอิง

1. Richardson, S.C.; Kolbe, H. V.; and Duncan, R. *Int. J. Pharm.* 1999, 178 (2), 231. b) Pruden, J. F.; Miegel, P.; Friedlich, L.; and Balassa, L. *American Journal of Surger* 1970, 119, 5, 560-564.
2. a) Yamamoto, H. and Amaike, M.; *Macromolecules* 1997, 30, 3936-3937. b) Tomihata, K. and Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18, 567-575.
3. a) Uragami, T.; Mori, H.; Noishiki, Y.; and Jinko Zoki. 1988, 17, 2,511-514. b) Matsuhashi, S. and Kume, T. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 237-241. c) Dumitriu, S.; Popa, M. I.; Cringu, A.; and Stratone, A. *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 595-599.
4. Amano, K. and Ito, E. *European Journal of Biochemistry* 1978, 85, 1, 97-104.
5. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; and Jeon, Y. *Trends in Food Science & Technology* 1999, 10, 37-51.

บทที่ 4

การทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในเซลล์ทดลองจากเนื้อเยื่อประสาน

Cytotoxicity test of chitin-chitosan derivatives in Mesenchymal cells

4.1 บทนำ

ไคติน-ไคโตซานเป็นสารที่พบได้ในสัตว์จำพวก กุ้ง ปู และหมีก ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีธาตุไนโตรเจนเกาะอยู่ในโมเลกุล และมีสมบัติพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility)¹ ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (low toxicity)² เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity)³ สารไคตินและไคโตซานสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม อาหารและเครื่องสำอาง เครื่องสำอางตลอดจนนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับยา และเภสัชกรรม ทางการแพทย์มีการนำสารไคติน-ไคโตซานมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพ⁴ สารช่วยสมานแผลในการใช้ทำเป็นวัสดุปิดแผล⁴ รวมทั้งเป็นอาหารเสริมบางชนิด⁵ เมื่อนำไคตินและไคโตซานมาพัฒนาโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและทางกายภาพ ทำให้ได้อนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานหลายชนิด เช่น ออลิโกไคโตซาน ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ ซึ่งอาจมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี รวมทั้งทางชีวภาพที่แตกต่างกัน จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาพบว่า การรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานดังกล่าว มีน้อยมาก และไม่เพียงพอสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนนำมาใช้ในมนุษย์ ด้วยเหตุผลดังกล่าว คณะวิจัยจึงได้ศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานในการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อให้ทราบถึงปริมาณหรือความเข้มข้นของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่สามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษหรืออันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และจำเป็นต้องมีการศึกษาในเซลล์ทดลองของมนุษย์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ออลิโกไคโตซาน (ละลายในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์นั้น สามารถทำได้โดยการนำอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานไปลงในเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อประสาน 2 ชนิด คือ human chorionic derived stem cells (CSCs) และ human periosteum derived stem cells (POCs) จากนั้นตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay (2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นการย้อมเซลล์ด้วย tetrazolium dyes เซลล์ที่มีชีวิตรอดจะติดสี tetrazolium dyes บริเวณไมโทคอนเดรีย หลังจากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ได้รับสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารดังกล่าว แล้วคำนวณเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด (% cell viability)

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ human Chorionic derived Stem Cells (CSCs) และเซลล์ human Periosteal derived Stem Cells (POCs) มาเพาะเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ชนิด alpha minimum essential medium (α -MEM) ซึ่งประกอบด้วย L-Glutamine, ribonucleoside, deoxyribonucleoside, Penicillin (100 unit/mL) และ Streptomycin (100 μ g/mL) ที่ผสมกับ Fetal Bovine Serum (FBS, 10%) การเลี้ยงทำในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5%

4.2.2 การวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-ไลโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Chorionic derived Stem Cells (CSCs cell cytotoxicity)

การทดสอบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ไคติน-ไลโคซานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ออลิโกไลโคซาน (ละลายในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ไคตินวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ไคโคซานวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) และไลโคซานนาโนสเฟียร์ (กระจายตัวในน้ำ) ทำโดยนำสารตัวอย่างในรูปของสารละลายหรือดิสเพอร์ชันมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ CSCs ซึ่งเพาะเลี้ยงอยู่ใน tissue culture flask ที่มีน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่ผสมกับ FBS (10%) การทดลองเริ่มจากการลอกเซลล์ (trypsinization) CSCs ออกจากพื้น flask โดยใช้ Trypsin (0.25%)/EDTA (10 mM) แล้วปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน (centrifugation) จากนั้นดูดเอาน้ำเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วใส่น้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม (6 well plate) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์หลุมละ 1×10^5 เซลล์ แล้วนำสารละลายหรือดิสเพอร์ชันของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบความเป็นพิษโดยใส่ลงไปเซลล์ CSCs ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 4, 20, 100, 250 และ 500 μ g/mL และใช้เซลล์ CSCs ที่ไม่ได้เติมสารตัวอย่างข้างต้น (untreated) เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารละลายหรือดิสเพอร์ชันของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยดูดน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วย้อมเซลล์ด้วย MTT solution ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/mL แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อับจำนวนเซลล์ที่ติดสี โดยใช้กำลังขยาย 4X จำนวน 10 Power Field และคำนวณหา % cell viability ดังสูตร

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ได้รับสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง}}$$

4.2.3 การวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-โคโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Periosteal derived Stem Cells (POCs cell cytotoxicity)

การทดสอบระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ไคติน-โคโคซานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ออลิโกโคโคซาน (ละลายในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ไคตินวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ไคโคซานวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) และโคโคซานนาโนสเฟียร์ (กระจายตัวในน้ำ) ทำโดยนำสารตัวอย่างในรูปแบบของสารละลายหรือคิสเพอร์ชันมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ POCs ซึ่งเพาะเลี้ยงอยู่ใน tissue culture flask ที่มีน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด α -MEM ที่ผสมกับ FBS (10%) การทดลองเริ่มจากการลอกเซลล์ (trypsinization) POCs ออกจากพื้น flask โดยใช้ Trypsin (0.25%)/EDTA (10 mM) แล้วปั่นเพื่อให้เซลล์ตกตะกอน (centrifugation) จากนั้นดูดเอาน้ำเลี้ยงเซลล์เก่าออก แล้วใส่น้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม (6 well plate) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์หลุมละ 1×10^5 เซลล์ แล้วนำสารละลายหรือคิสเพอร์ชันของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิดมาทดสอบความเป็นพิษโดยใส่ลงไปในเซลล์ POCs ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และใช้เซลล์ POCs ที่ไม่ได้เติมสารตัวอย่างข้างต้น (untreated) เป็นกลุ่มควบคุมสำหรับเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับสารละลายหรือคิสเพอร์ชันของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยดูดน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วย้อมเซลล์ด้วย MTT solution ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/mL แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ที่ติดสี โดยใช้กำลังขยาย 4X จำนวน 10 Power Field และคำนวณหา % cell viability ดังสูตร

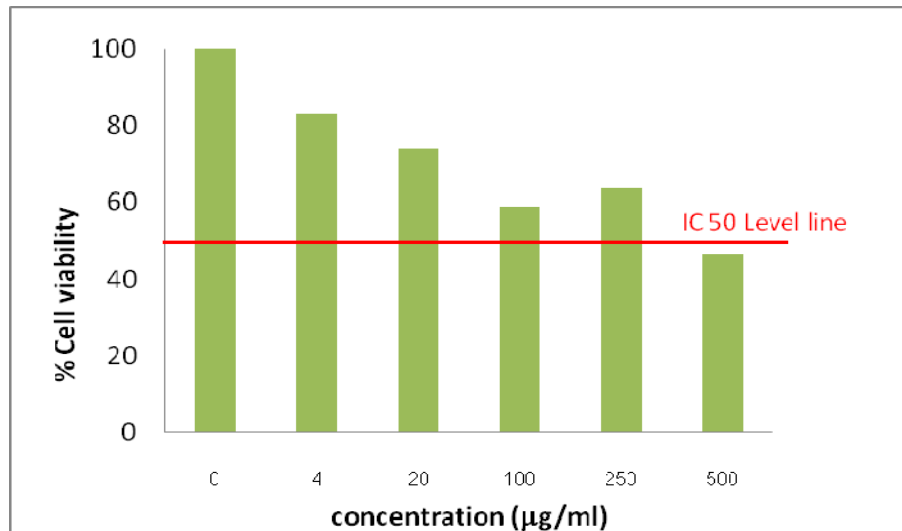
$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ได้รับสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ได้รับสารตัวอย่าง}}$$

4.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.3.1 ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-โคโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Chorionic derived Stem Cells (CSCs cell cytotoxicity)

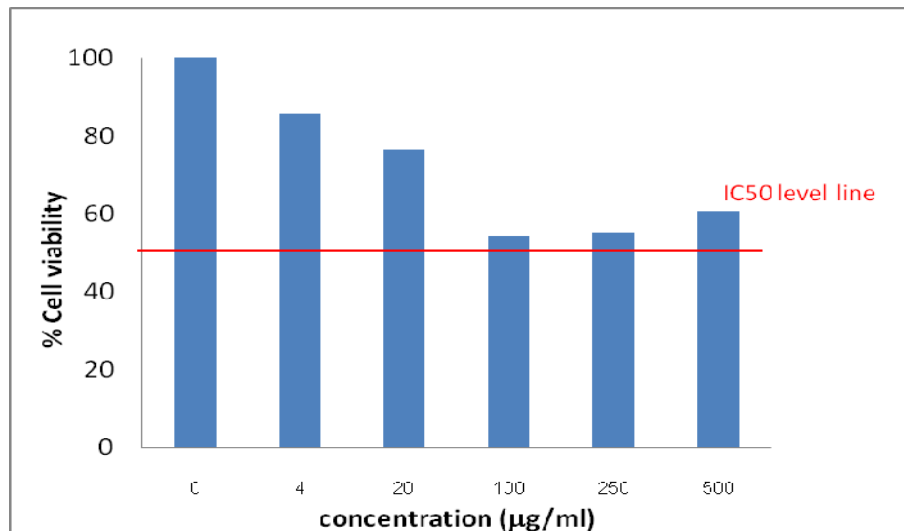
ในการทดลองนี้ เซลล์ CSCs ได้รับสารละลายออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จึงทำการย้อมเซลล์ด้วยวิธี MTT และนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีผ่านกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 10 Power Field จากผลการทดลองพบว่าสารออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ CSCs ได้ ดังจะเห็นได้จากการลดลงอย่างชัดเจนของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดเมื่อความเข้มข้นของสารละลายออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) เพิ่มขึ้น ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นลักษณะ Dose-Dependent Response นอกจากนี้ยังพบว่า % cell viability

ของเซลล์ CSCs ที่ได้รับสารละลายออลิโกโคโคโตซานที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่ได้จากการคำนวณเท่ากับ 82.96%, 74.10%, 58.73%, 63.58% และ 46.55% ตามลำดับ และค่า IC_{50} ของสารละลายออลิโกโคโคโตซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) อยู่ที่ความเข้มข้นประมาณ ตั้งแต่ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เป็นต้นไป (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลของออลิโกโคโคโตซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

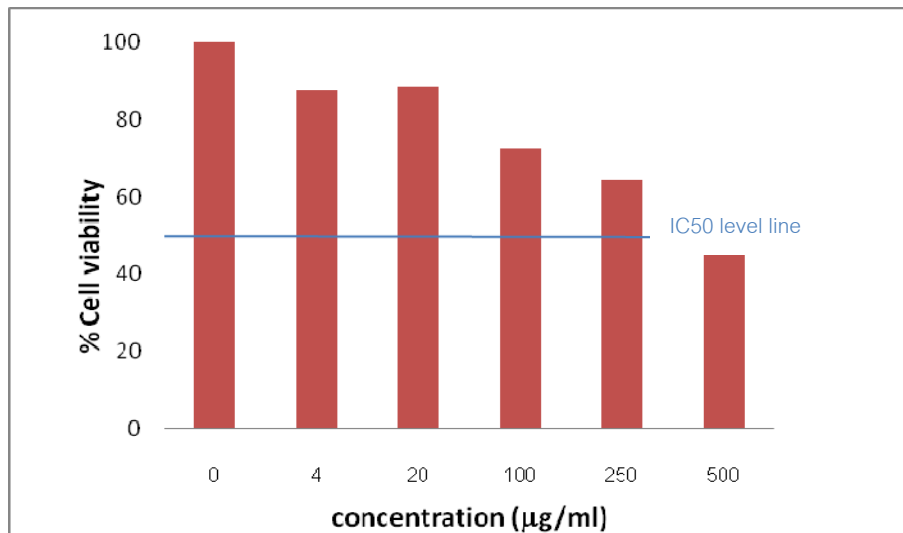
ในการทดสอบระดับ Cytotoxicity ของไคตินวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ CSCs ได้ใช้ความเข้มข้นของดิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีจำนวนลดลงตามความเข้มข้นของไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในลักษณะ Dose-Dependent Response ซึ่งให้เห็นว่าไคตินวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ CSCs ได้ % cell viability ของเซลล์ CSCs ที่ได้รับดิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีค่าเท่ากับ 85.58%, 76.23%, 53.99%, 54.80% และ 60.57% ตามลำดับ โดยเซลล์ CSCs ที่ได้รับดิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุด (รูปที่ 4.2)



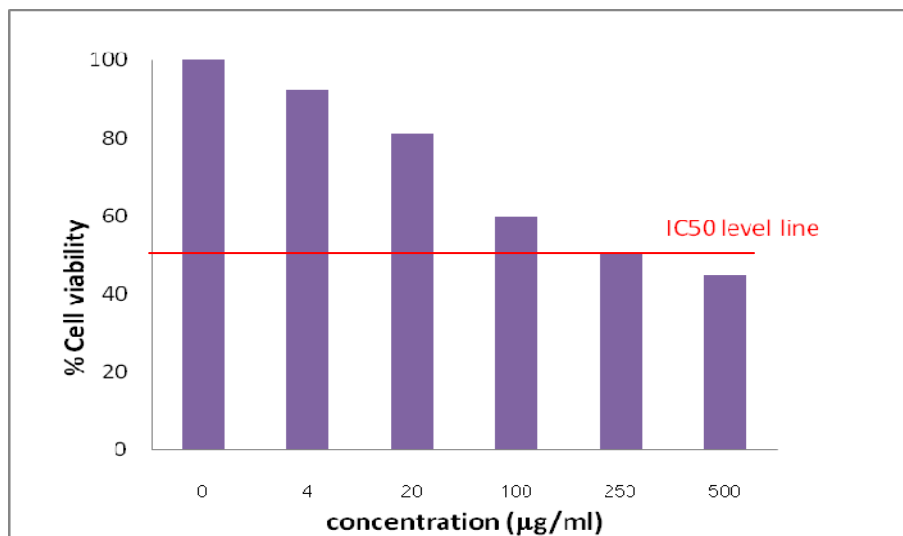
รูปที่ 4.2 ผลของโคตินวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

สำหรับการทดสอบระดับ Cytotoxicity ของโคโตซานวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ CSCs ก็ใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง $500 \mu\text{g/mL}$ จากการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตภายหลังการเพาะเลี้ยงกับดิสเพอร์ชันของโคโตซานวิสเกอร์นาน 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของดิสเพอร์ชันของโคโตซานวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะ Dose-Dependent Response แสดงให้เห็นว่าโคโตซานวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ CSCs ได้ ค่า % cell viability ของเซลล์ CSCs ที่ได้รับดิสเพอร์ชันของโคโตซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ $500 \mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 87.42%, 88.49%, 72.69%, 64.29% และ 46.62% ตามลำดับ และยังพบว่า IC_{50} ของดิสเพอร์ชันของโคโตซานวิสเกอร์มีค่าประมาณตั้งแต่ $500 \mu\text{g/mL}$ เป็นต้นไป (รูปที่ 4.3)

ระดับ Cytotoxicity ของโคโตซานนาโนสเฟียร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ CSCs ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง $500 \mu\text{g/mL}$ จากผลการนับจำนวนเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วย MTT solution โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโคโตซานนาโนสเฟียร์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ CSCs ได้ ดังจะเห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีจำนวนลดลงตามความเข้มข้นของโคโตซานนาโนสเฟียร์ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในลักษณะ Dose-Dependent Response ค่า % cell viability ของเซลล์ CSCs ที่ได้รับดิสเพอร์ชันของโคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ $500 \mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 92.17%, 81.23%, 59.87%, 50.12% และ 44.70% ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของโคโตซานนาโนสเฟียร์อยู่ที่ความเข้มข้นประมาณตั้งแต่ $250 \mu\text{g/mL}$ เป็นต้นไป โดยที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ $500 \mu\text{g/mL}$ ให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุด (รูปที่ 4.4)



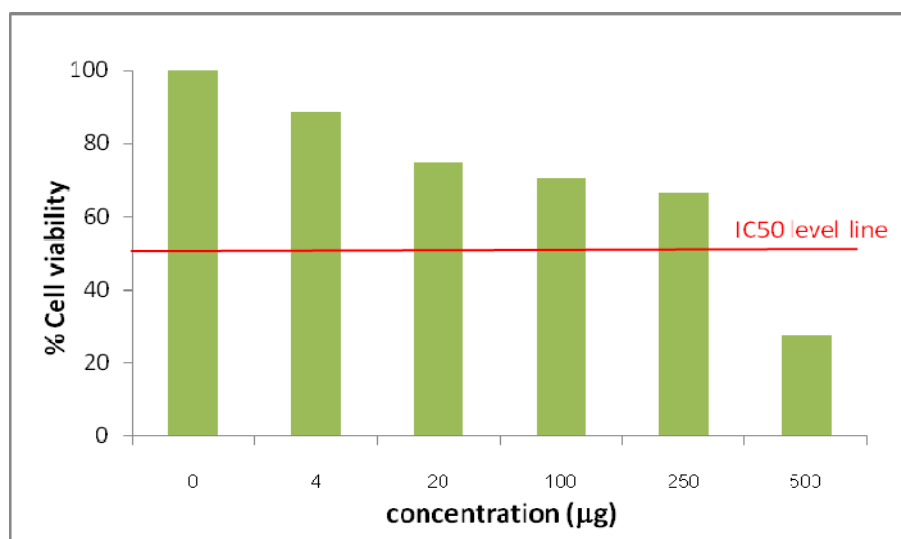
รูปที่ 4.3 ผลของไคโตซานวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม



รูปที่ 4.4 ผลของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ CSCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

4.3.2 ระดับความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคติน-โคโคซานชนิดต่างๆ ต่อเซลล์ Periosteal derived Stem Cells (POCs cell cytotoxicity)

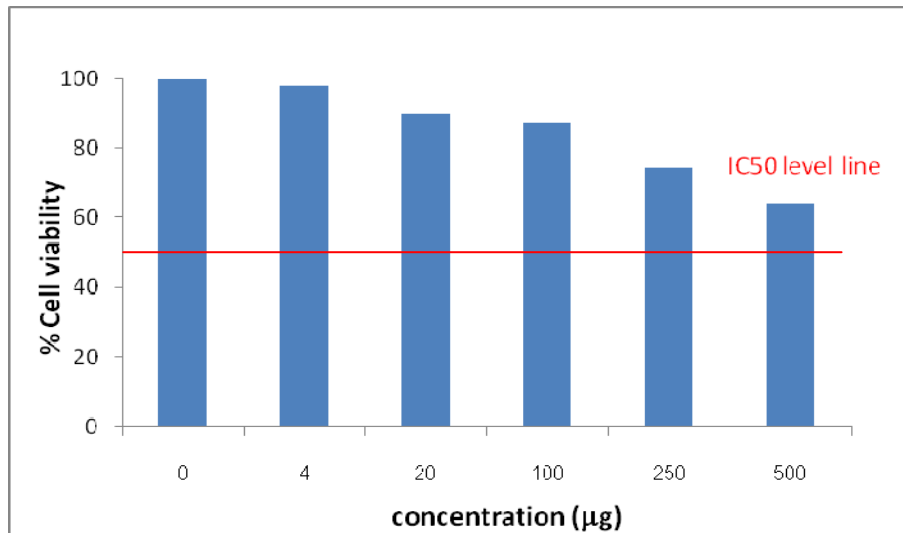
ในการทดลองนี้ เซลล์ POCs ได้รับสารละลายออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จึงทำการย้อมเซลล์ด้วยวิธี MTT และนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีผ่านกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 10 Power Field จากผลการทดลองพบว่าสารออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ POCs ได้ ดังจะเห็นได้จากการลดลงอย่างชัดเจนของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดเมื่อความเข้มข้นของสารละลายออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) เพิ่มขึ้น ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นลักษณะ Dose-Dependent Response นอกจากนี้ยังพบว่า % cell viability ของเซลล์ POCs ที่ได้รับสารละลายออลิโกโคโคซานที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีค่าเท่ากับ 88.31%, 74.71%, 70.27%, 66.71% และ 27.23% ตามลำดับ และค่า IC_{50} ของสารละลายออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) อยู่ที่ความเข้มข้นระหว่าง 250- 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 ผลของออลิโกโคโคซาน (ในสารละลายกรดแลคติกเข้มข้น 1%) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

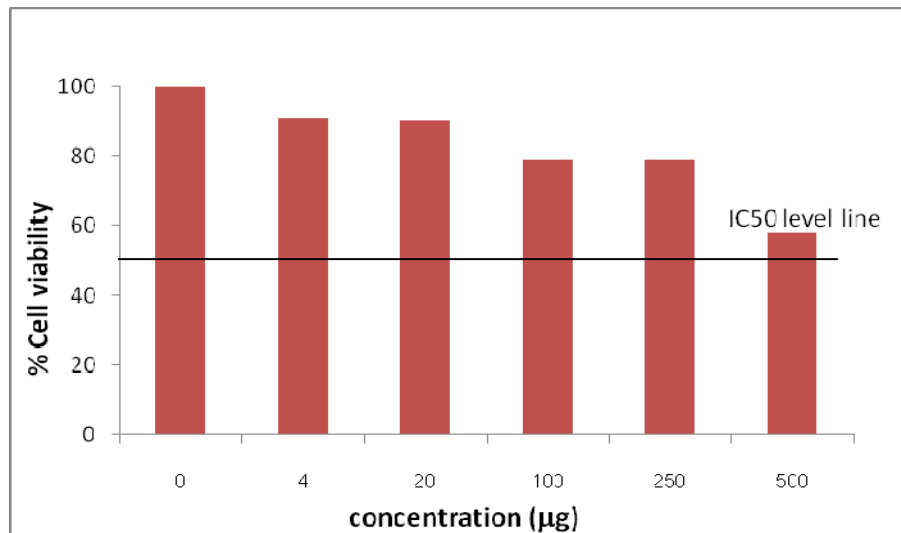
ในการทดสอบระดับ Cytotoxicity ของไคตินวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ POCs ได้ใช้ความเข้มข้นของดิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีจำนวนลดลงตามความเข้มข้นของไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในลักษณะ Dose-Dependent Response ซึ่งให้เห็นว่าไคตินวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญ

ของเซลล์ POCs ได้ % cell viability ของเซลล์ POCs ที่ได้รับคิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 97.83%, 89.71%, 87.60%, 74.46% และ 64.06% ตามลำดับ โดยเซลล์ POCs ที่ได้รับคิสเพอร์ชันของไคตินวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 500 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยที่สุด (รูปที่ 4.6)



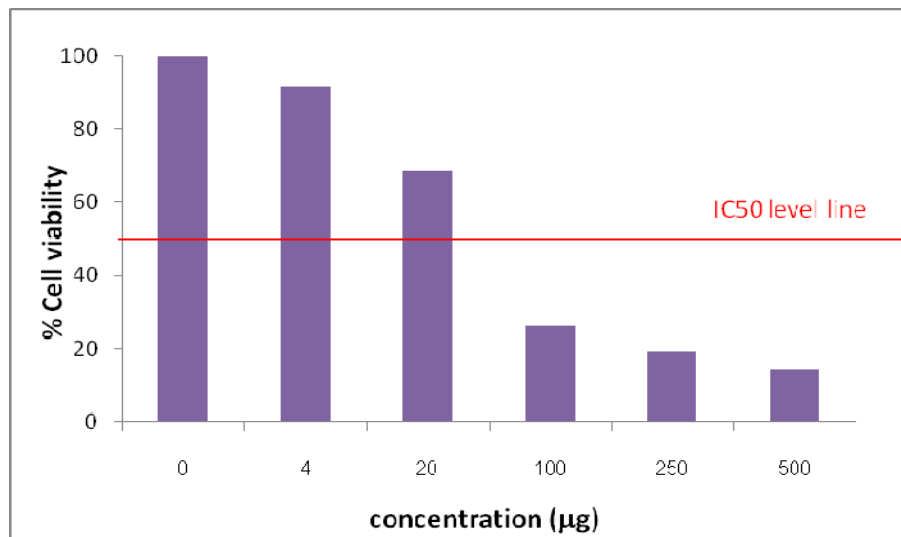
รูปที่ 4.6 ผลของไคตินวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

สำหรับการทดสอบระดับ Cytotoxicity ของไคโตซานวิสเกอร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ POCs ก็ใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g/mL}$ จากการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตภายหลังการเพาะเลี้ยงกับคิสเพอร์ชันของไคโตซานวิสเกอร์นาน 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของคิสเพอร์ชันของไคโตซานวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะ Dose-Dependent Response แสดงให้เห็นว่าไคโตซานวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ POCs ได้ ค่า % cell viability ของเซลล์ POCs ที่ได้รับคิสเพอร์ชันของไคโตซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 90.85%, 90.23%, 79.08%, 79.05% และ 58.13% ตามลำดับ และยังพบว่าเซลล์ POCs ที่รอดชีวิตมีจำนวนเหลือน้อยที่สุด เมื่อได้รับคิสเพอร์ชันของไคโตซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 $\mu\text{g/mL}$ (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 ผลของไคโตซานวิสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

ระดับ Cytotoxicity ของไคโตซานนาโนสเฟียร์ (กระจายตัวในน้ำ) ที่มีต่อเซลล์ POCs ทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 4 จนถึง 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จากผลการนับจำนวนเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วย MTT solution โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไคโตซานนาโนสเฟียร์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ POCs ได้ ดังจะเห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดมีจำนวนลดลงตามความเข้มข้นของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในลักษณะ Dose-Dependent Response ค่า % cell viability ของเซลล์ POCs ที่ได้รับดิสเพอร์ชันของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ความเข้มข้น 4, 20, 100, 250 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เท่ากับ 91.67, 68.70%, 26.22%, 19.29% และ 14.62% ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของไคโตซานนาโนสเฟียร์อยู่ที่ความเข้มข้นระหว่าง 20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ผลของไคโตซานนาโนสเฟียร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ POCs ที่มีชีวิตรอดหลังจากเพาะเลี้ยงในเพลทที่มี 6 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์/หลุม

4.4 สรุปผลการทดลอง

ความเป็นพิษต่อเซลล์ CSCs ของสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน ซึ่งพิจารณาจากค่า IC_{50} และ % cell viability สามารถเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ > ออลิโกไคโตซาน > ไคโตซานวิสเกอร์ > ไคตินวิสเกอร์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ POCs ของสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน ซึ่งพิจารณาจากค่า IC_{50} และ % cell viability สามารถเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ > ออลิโกไคโตซาน > ไคโตซานวิสเกอร์ > ไคตินวิสเกอร์

Sample	IC_{50} (µg/mL)*	
	Human Chorionic derived Stem Cells (CSCs)	Human Periosteum derived Stem Cells (POCs)
Chitin whisker	-	-
Chitosan nanosphere	> 100	> 20
Oligochitosan	> 250	> 250
Chitosan whisker	> 250	-

* “-” แสดงถึง ไม่พบ IC_{50} เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย/คิสเพอร์ชันของตัวอย่างอยู่ในช่วง 4-500 µg/mL

จากการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่าสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองทั้ง 2 ชนิด ในระดับต่ำ ถ้าเซลล์ได้รับสารอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 20 µg/mL

4.5 เอกสารอ้างอิง

1. a) Richardson, S.C.; Kolbe, H. V.; and Duncan, R. *Int. J. Pharm.* 1999, 178 (2), 231. b) Pruden, J. F.; Miegel, P.; Friedlich, L.; and Balassa, L. *American Journal of Surger* 1970, 119, 5, 560-564.
2. a) Yamamoto, H. and Amaike, M.; *Macromolecules* 1997, 30, 3936-3937. b) Tomihata, K. and Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18, 567-575.
3. a) Uragami, T.; Mori, H.; Noishiki, Y.; and Jinko Zoki. 1988, 17, 2,511-514. b) Matsuhashi, S. and Kume, T. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 237-241. c) Dumitriu, S.; Popa, M. I.; Cringu, A.; and Stratone, A. *Colliod Polym. Sci.* 1989, 267, 595-599.
4. Amano, K. and Ito, E. *European Journal of Biochemistry* 1978, 85, 1, 97-104.
5. Gades, M. D and Stern, J. S. *Journal of the American Dietetic Association* 2005, 105, 72-77.

บทที่ 5

การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลชีพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

Antimicrobial activity test of chitin-chitosan derivatives

5.1 บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความหลากหลายและอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรทางธรรมชาติ ที่เอื้อต่อการนำมาแปรรูปเป็นอาหาร ในบางฤดูกาลทรัพยากรดังกล่าวมีมากเกินไปเกินความต้องการ จึงจำเป็นต้องมีการแปรรูปเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา นอกจากนี้การปรับปรุงคุณภาพอาหารเพื่อประโยชน์และความปลอดภัยต่อสุขภาพเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นการใช้วัสดุธรรมชาติที่ปลอดภัย อาทิเช่น วัสดุไคติน-ไคโตซาน เพื่อเป็นสารเติมแต่งคุณค่าและรักษาคุณภาพอาหารแทนสารเติมแต่งสังเคราะห์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ต้องให้ความสำคัญ ทั้งนี้วัสดุไคติน-ไคโตซานเป็นสารที่มีคุณค่าที่ได้มาจากการสกัดเปลือกกุ้ง เปลือกปู อันเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็งและอาหารทะเลแปรรูป ซึ่งประเทศไทยมีอุตสาหกรรมดังกล่าวมาก เมื่อคำนึงถึงวัตถุดิบจากเปลือกกุ้ง ปู หรือแกนปลาหมึกที่ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบแล้ว การนำสารไคติน-ไคโตซาน มาใช้ประโยชน์ หรือสร้างมูลค่าเพิ่มต่อประเทศ ทั้งระดับชาติและนานาชาติ จึงเป็นโจทย์วิจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการบูรณาการองค์ความรู้นี้ให้เป็นประโยชน์ต่อสังคมอย่างมากที่สุด

ในอดีตที่ผ่านมา ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำไคโตซานในรูปของสารละลายมาประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งและรักษาคุณภาพอาหารในด้านต่างๆ อาทิเช่น ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเต้าหู้ ใช้เป็นสารเพิ่มความใสในน้ำผลไม้¹ เนื่องจากไคโตซานชาติเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งมีสมบัติพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility)² ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (Non toxicity)³ เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity)⁴ สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากระบบได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง (Biodegradability)⁵

ไคติน-ไคโตซานได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรด ไคโตซานจะมีจำนวนประจุบวกของหมู่อะมิโนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยกลูโคซามีนมากกว่าไคติน Chang et al.⁶ ได้แสดงถึงการนำไคโตซานไปผสมกับเต้าหู้ โดยการเตรียมสารละลายไคโตซานในกรดน้ำส้ม 5% แล้วนำไปผสมกับนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากงานวิจัยนี้พบว่า การเติมไคโตซานลงไปในเต้าหู้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้จากปกติ 5 วัน เป็นนานถึง 7-13 วัน นอกจากนี้ยังรายงานว่า การใช้ไคโตซานที่มี %DD สูง สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าไคโตซานที่มี %DD ต่ำ เนื่องจากไคโตซานที่มี %DD สูงจะมีจำนวนประจุบวกมากกว่า ซึ่งประจุบวกนี้เองจะทำหน้าที่ไปจับกับประจุลบ

ของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อีกมากมาย เช่น Roller and Corvill รายงานถึงการผสมไคโตซานลงไปใต้น้ำสลัดมายองเนส⁷ และน้ำแอปเปิ้ล⁸ เป็นต้น

ถึงแม้ว่าไคตินและไคโตซานจะมีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม มวลโมเลกุลที่สูงและความหนืดที่สูงของตัวพอลิเมอร์อาจจะจำกัดการใช้งานบางประเภท ตัวอย่างเช่น Young et al.⁹ ได้รายงานถึงการเติมไคโตซานมวลโมเลกุล 30,000 ถึง 120,000 ลงไปในไส้กรอก เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่า ไคโตซานสามารถต่อต้านการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเท่ากับการเติม NaNO_2 ลงไปในไส้กรอก แต่ปัญหาด้านความหนืดที่สูงของไคโตซานส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในลำไส้ของสัตว์ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในร่างกายมนุษย์ ไม่สามารถผลิตเอนไซม์จำพวก ไคตินเนสและไคโตซานเนส ซึ่งมีหน้าที่ในการย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคตินและไคโตซานโดยตรง ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายไคซานมวลโมเลกุลสูงและดูดซึมต่อไปได้¹⁰ ดังนั้น การใช้ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ออลิโกไคโตซาน (มวลโมเลกุลระดับ $10^3 \sim 10^4$ Dalton) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง Jo et al.¹¹ รายงานถึงการใส่ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 5,000 ผสมลงในไส้กรอก แล้วนำไปเปรียบเทียบกับไส้กรอกที่ผลิตด้วยกรรมวิธีปกติ ผลการทดลองพบว่าการเติมไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของไส้กรอก ซึ่งได้แก่ สี สันรสชาติ และความเหนียวของไส้กรอก

ดังนั้นเนื้อหางานวิจัยในบทนี้จึงเกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและเชื้อราชนิดต่างๆ ของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด ที่ได้พัฒนาขึ้น ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ และออลิโกไคโตซาน เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ในด้านต่างๆ ในอนาคต และคณะผู้วิจัยคาดว่าวัสดุดังกล่าวมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นทางด้านการรักษาคุณภาพอาหาร เช่น การยืดอายุการเก็บรักษา การออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ

5.2 วิธีการทดลอง

5.2.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและยีสต์

ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและยีสต์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Xing et al (2008)¹² โดยนำตัวอย่างมาทำละลายหรือปรับความเข้มข้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยน้ำกลั่น สำหรับไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และไคโตซานนาโนสเฟียร์ และ สารละลาย potassium lactate เข้มข้น 1% pH 3.6 สำหรับ ออลิโกไคโตซาน ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงตั้งแต่ 0-500 ppm ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรีย 12 สายพันธุ์และยีสต์ 1 สายพันธุ์ (ดังแสดงในตารางที่ 1) ทำการปิดตัวอย่างที่ได้ 130 ไมโครลิตร ผสมกับ inoculum ของเชื้อที่ทดสอบที่มีความเข้มข้นของเซลล์ ประมาณ 10^8 CFU/ml 20 ไมโครลิตรใน 96 wells microtiter plate นำไปบ่มเพื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด บันทึกค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร หลังจากที่ย้อม 24 ชั่วโมง สำหรับ Blank ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือสารละลาย potassium lactate เข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 ไมโครลิตร แทนตัวอย่าง

ตารางที่ 5.1 สายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง	ความสำคัญ
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (SA)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที	เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทั้งในคนและในสัตว์เช่น รุขุมขนอักเสบ ฝีหนองบริเวณผิวหนัง สมองอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ โรคเต้านมอักเสบ ในโคนม เป็นต้น
<i>Staphylococcus aureus</i> E181 (E181)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที	เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่าเอนเทอโร ทอกซินซึ่งทนต่อความร้อน และก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เรียกว่า Staphylococcal food-borne poisoning
<i>Bacillus cereus</i> C113 (BC)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที	แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษ เอนเทอโรทอกซินซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยมีอาการท้องร่วงถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีอาการปวดและเกร็งที่ช่องท้อง คลื่นไส้ และอาเจียน ซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 DMST 12743 (O157)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที	สารพิษประเภทเวโรทอกซินหรือเวโรไซโตทอกซิน (verotoxin or verocytotoxin) ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียนี้ทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า Hemorrhagic colitis หรืออาการเลือดออกในลำไส้หากอาการรุนแรงจะมีการพัฒนาของโรคต่อไปเป็น Hemolytic uremic syndrome หรือมีเลือดออกในทางเดินปัสสาวะเนื่องจากไตวายและทำให้เสียชีวิตได้
<i>Salmonella typhimurium</i> DMST 0562 (ST)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ	แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรคโรค salmonellosis ซึ่งทำให้กระเพาะอาหารและ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง	ความสำคัญ
	เขย่า200 รอบต่อนาที	ถ้าใส่อกเสบโดยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน ปวดศรีษะ ปวด ท้อง มีไข้ หนาวสั่น และอ่อนเพลีย
<i>Salmonella enteritidis</i> DMST 1706 (SE)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า200 รอบต่อนาที	เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถมีชีวิตอยู่ในรังไข่ และติดเชื้อหุ้มไปกับไข่และยังสามารถ ถ่ายทอดต่อไปในลูกไก่ที่มีชีวิตได้ โดยหาก บริโภคไข่หรือไก่ที่ปนเปื้อนเชื้อนี้จะทำให้ เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวด ศรีษะ ท้องเดิน อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตาม กล้ามเนื้อ เป็นลม มีไข้ปานกลาง มึนงง และอาจทำให้เสียชีวิตได้
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115 (LM)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า200 รอบต่อนาที	เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งหากติดเชื้อในระหว่างการตั้งครรภ์ ทำให้ เกิดการแท้ง หากติดเชื้อในทารกจะมี อาการหายใจติดขัด หัวใจเต้นเบา ผิวหนัง เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน เนื่องจากขาด อากาศ อาเจียน ชัก และอุจจาระเป็นเมือก หนาวสั่น มีไข้ คอหอยอักเสบขึ้น รุนแรง เม็ดเลือดขาวแตก เป็นอันตรายถึง ขั้นเสียชีวิต
<i>Listeria innocua</i> (LI)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า200 รอบต่อนาที	มีความคล้ายคลึงกับ <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> เป็นอย่างมากทั้งในด้าน สรีระวิทยาและชีววิทยา แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อ <i>Listeria innocua</i> ไม่ใช่สายพันธุ์ ที่ก่อให้เกิดโรค
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> BCC27607 (PSE)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า200 รอบต่อนาที	เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อ โรคฉวยโอกาส และจะมีการติดเชื้อมกับผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือ ป่วยมากๆ และมักจะระบาดตาม โรงพยาบาลต่างๆ ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวนมาก โดยจะก่อให้เกิดโรคเลือดเป็นพิษเนื่องจาก

สายพันธุ์จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง	ความสำคัญ
		คิดเชื้อในกระแสดเลือด หรือเชื้อหุ้มสมอง อีกเสบหากคิดเชื้อที่ระบบประสาท ส่วนกลาง นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ใน อากาศได้จึงทำให้เกิดโรคปอดได้อีกด้วย
<i>Lactobacillus plantarum</i> BCC 9545 (LP)	MRS, 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ไม่เขย่า	เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิดนี้ส่วน ใหญ่จะพบในอาหารประเภทเนื้อหรือเนื้อ หมักคุณสมบัติเด่นของเชื้อนี้คือสามารถ นำไปใช้เป็นต้นเชื้อสำหรับผลิตอาหาร ประเภทเนื้อหรือเนื้อหมักได้
<i>Pediococcus acidilactici</i> BCC 9546 (PA)	MRS, 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ไม่เขย่า	เป็นเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งมี คุณสมบัติในการสร้างกรดได้ดีดังนั้นจึง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นต้นเชื้อ สำหรับผลิตกัมมันต์นมหรือเนื้อหมักได้
สายพันธุ์จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง	ความสำคัญ
<i>Staphylococcus xylosum</i> BCC3710 (SX)	TSB, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า 200 รอบต่อนาที	ใช้เป็นต้นเชื้อในการหมักอาหารประเภท เนื้อสัตว์ ทำให้เนื้อมีสีแดงตามธรรมชาติ
<i>Debaryomyces hansenii</i> BCC9548 (DH)	YM, 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้อากาศโดยการ เขย่า 200 รอบต่อนาที	เชื้อยีสต์สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติในการสร้าง สารในกลุ่มเอสเทอร์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ เกิดกลิ่นของผลิตภัณฑ์ดังนั้นจึงสามารถนำ เชื้อนี้มาผสมในต้นเชื้อเพื่อพัฒนากลิ่นของ ผลิตภัณฑ์นมหรือเนื้อหมักได้

5.2.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา

5.2.2.1 การเตรียมเชื้อรา

การทดสอบนี้ใช้เชื้อราทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger* BCC 17391 *Fusarium sp.* BCC 12081 *Cladosporium sp.* BCC 12229 และ *Penicillium sp.* BCC 12364 (ตารางที่ 5.2) ซึ่งเชื้อราดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยเชื้อราทั้งหมดนี้ได้ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar

และทำการบ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจนจนกระทั่งเชื้อราดังกล่าวสร้างสปอร์ (ใช้เวลาประมาณ 3-7 วัน)

ตารางที่ 5.2 สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	ความสำคัญ
<i>Aspergillus niger</i> BCC 17391	บางชนิดของเชื้อราชนิดนี้สามารถก่อโรคที่เรียกว่า Aspergillosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อที่ปอดซึ่งทำให้เนื้อเยื่อปอดถูกทำลาย โดยมีสาเหตุเนื่องมาจากการสูดดมสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้เข้าไป และยังสามารถก่อให้เกิดโรค Otomycosis ซึ่งเป็นการติดเชื้อในระบบหูซึ่งก่อให้เกิดอาการหูหนวกได้ นอกจากนี้แล้วบางชนิดยังพบว่าสามารถสร้าง Mycotoxin ในกลุ่ม Aflatoxin ได้ ซึ่งสารนี้จะเป็นพิษทำให้ระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน ถูกทำลาย
<i>Fusarium sp.</i> BCC 12081	เชื้อราชนิดนี้สามารถสร้าง Mycotoxin ในกลุ่ม Fumonisins and trichothecenes เช่น T-2 Toxin และ DON ซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ระบบดังกล่าวถูกทำลาย
<i>Cladosporium sp.</i> BCC 12229	เป็น airborne fungi ซึ่งหากสูดดมสปอร์ของราชนิดนี้เข้าไปจะสามารถทำลายระบบประสาทส่วนกลางหรือระบบเลือด รวมถึงระบบทางเดินอาหารได้
<i>Penicillium sp.</i> BCC 12364	ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อที่เรียกว่า Penicilliosis ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อปอด ระบบการได้ยิน ระบบประสาทส่วนกลาง รวมถึงระบบทางเดินอาหารถูกทำลายนอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อรานี้สามารถสร้าง Mycotoxin ชนิด Ochratoxin A ซึ่งทำลายระบบประสาทส่วนกลาง รวมถึงสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้

5.2.2.2 การเตรียมสารละลายสปอร์

การเตรียมสารละลายสปอร์จากเชื้อราทดสอบนั้นเตรียมได้โดยใช้สารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 30 มิลลิลิตรเทลงบนจานเพาะเชื้อราที่สร้างสปอร์ จากนั้นใช้ปลายไม้เปิดทำการขูดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดโดยระมัดระวังอย่าทำการขูดแรงเพราะจะทำให้ Mycelium หลุดติดออกมา จากนั้นนำ

สารละลายสปอร์ดังกล่าวกรองผ่านผ้าขาวบางซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการกำจัด Mycelium สุกท้ายทำการนับจำนวนของสปอร์ที่รวบรวมได้โดยวิธี Viable spore count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar ซึ่งบ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชม. (ในการนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธีนี้ต้องไม่บ่มเชื้อนานเกินไปเพราะจะทำให้ไม่สามารถนับจำนวนของสปอร์ที่งอกได้เนื่องจาก Mycelium ที่งอกนั้นจะเจริญทับกันจนไม่สามารถแยกโคโลนีออกจากกันได้)

5.2.2.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา

ในการทดสอบนี้ได้ทำการเตรียมตัวอย่างโคโตซานทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และโคโตซานนาโนสเฟียร์ ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 4000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น ปลอดเชื้อเป็นตัวทำละลาย ออลิโกโคโตซานนั้นถูกเตรียมโดยใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการแปรปริมาณของตัวอย่างโคโตซานทั้ง 4 ชนิดให้เป็น 0 1000 1500 และ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อใช้สำหรับทดสอบต่อไป

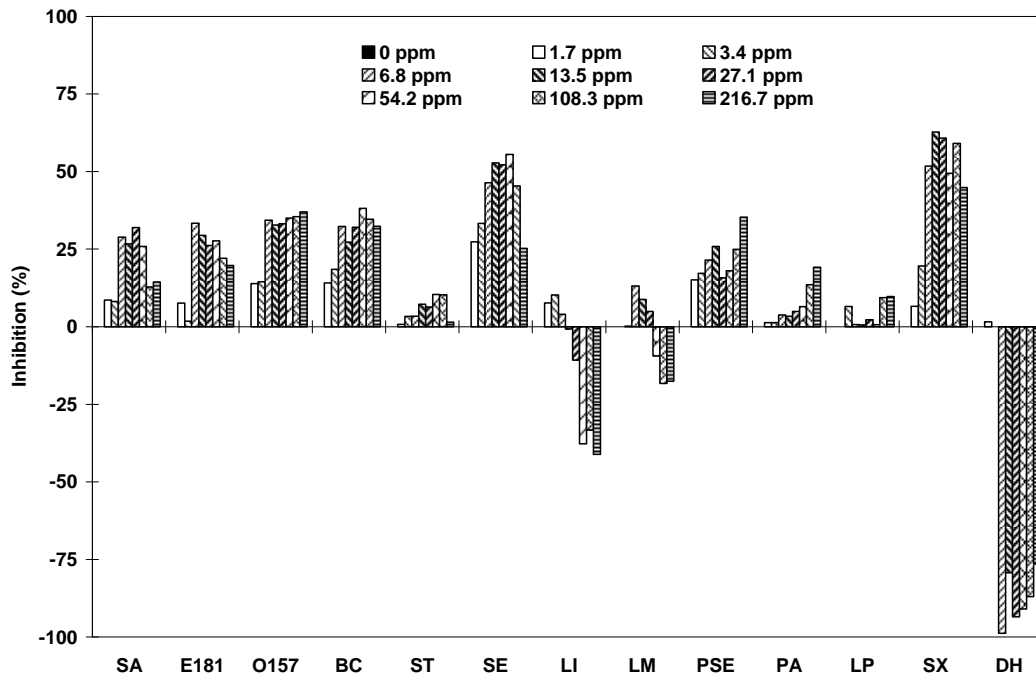
5.2.2.4 วิธีการทดสอบ

การทดสอบนี้ได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบของ Hernández-Lauzardo et al. (2007)¹³ โดยทำการบ่มสปอร์ของเชื้อรา (ประมาณ 10^4 – 10^6 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร) กับสารละลายโคโตซานทั้ง 4 ชนิดที่ได้ทำการแปรปริมาณเป็น 1000, 1500 และ 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาการสัมผัสนาน 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนของสปอร์ที่เหลืออยู่โดยวิธี Viable spore count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar และทำการบ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5.3 ผลการทดลองและอภิปราย

5.3.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและยีสต์

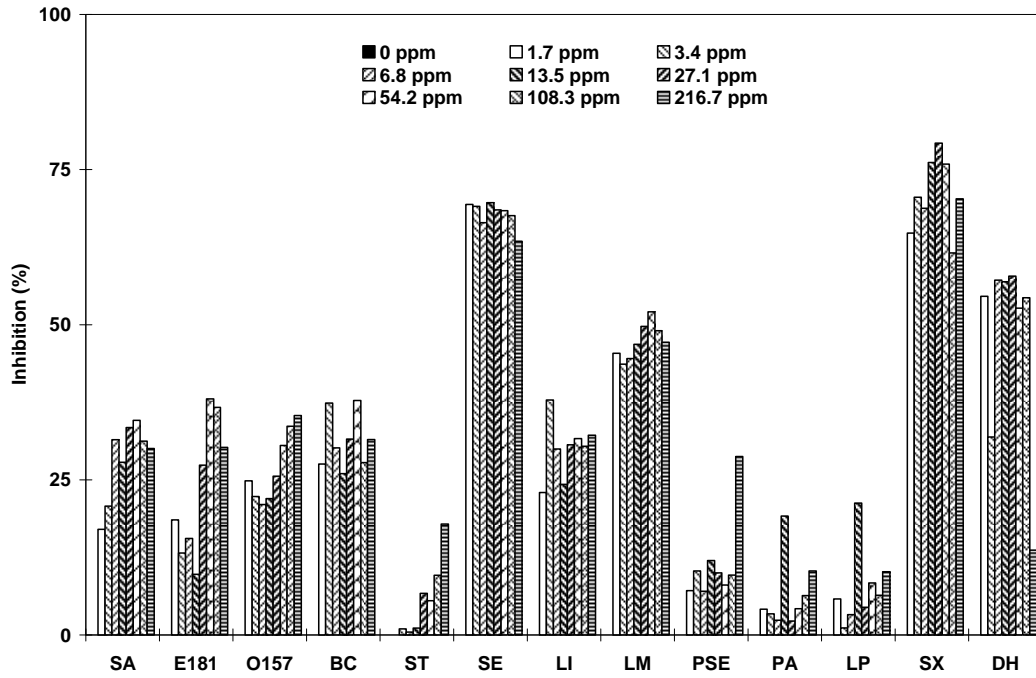
ไคตินวิสเกอร์แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 5.1) ถึงแม้ว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของไคตินวิสเกอร์จะสูงขึ้นโดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้นในช่วง 0-50 ppm จะเห็นได้ว่า ไคตินวิสเกอร์แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ ที่ระดับการยับยั้งสูงสุดประมาณร้อยละ 30-40 ยกเว้น *Salmonella enteritidis* DMST 1706 และ *Staphylococcus xylosus* ซึ่งถูกยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 ทำให้สามารถประมาณค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แสดงการยับยั้ง (minimal inhibitory concentration) ที่ระดับมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ MIC ของไคตินวิสเกอร์ต่อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้เท่ากับ 13.5 และ 6.8 ppm ตามลำดับ



รูปที่ 5.1 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคโตซานวิสเกอร์

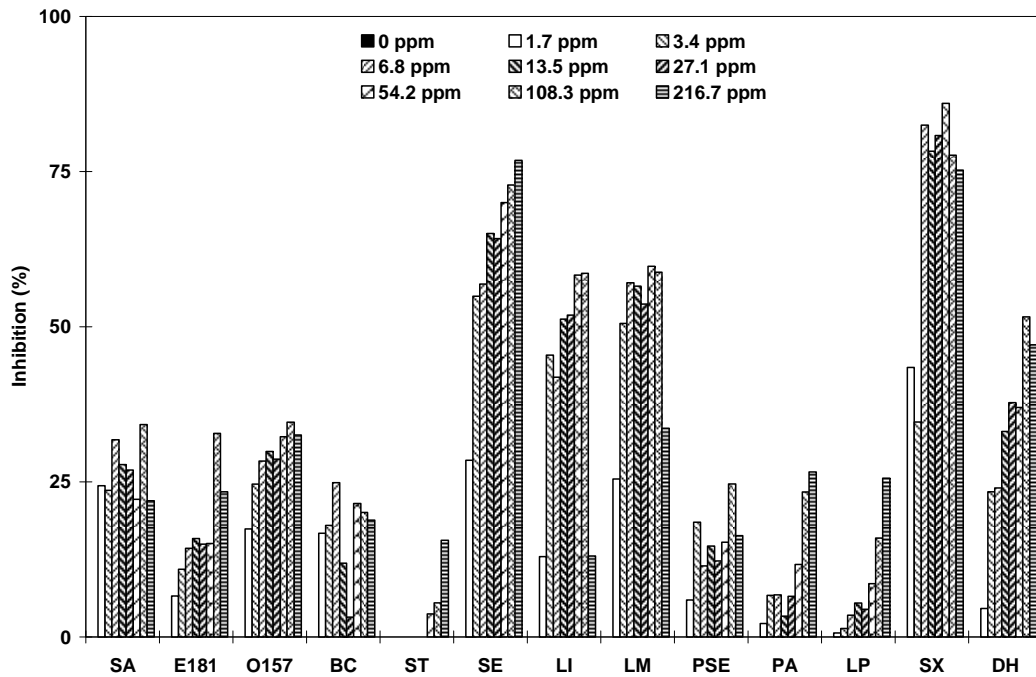
นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่า ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานวิสเกอร์มากขึ้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากความขุ่นของไคโตซานวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ไคโตซานวิสเกอร์สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* และ *Listeria innocua* และยีสต์ *Debaryomyces hansenii* ได้เป็นอย่างดีเช่นกัน

ไคโตซานวิสเกอร์แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดและยีสต์ที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 5.2) เช่นเดียวกับกับไคโตซานวิสเกอร์ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคโตซานวิสเกอร์สูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นที่ใช้ โดยทั่วไปแสดงระดับการยับยั้งประมาณร้อยละ 30-40 ยกเว้น *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus xylosum* และ *Debariomyces hansenii* ซึ่งถูกยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 ทำให้สามารถประมาณค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แสดงการยับยั้ง (minimal inhibitory concentration) ที่ระดับมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ MIC ของไคโตซานวิสเกอร์ต่อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ได้เท่ากับ 1.7, 27.1, 1.7 และ 6.8 ppm ตามลำดับ



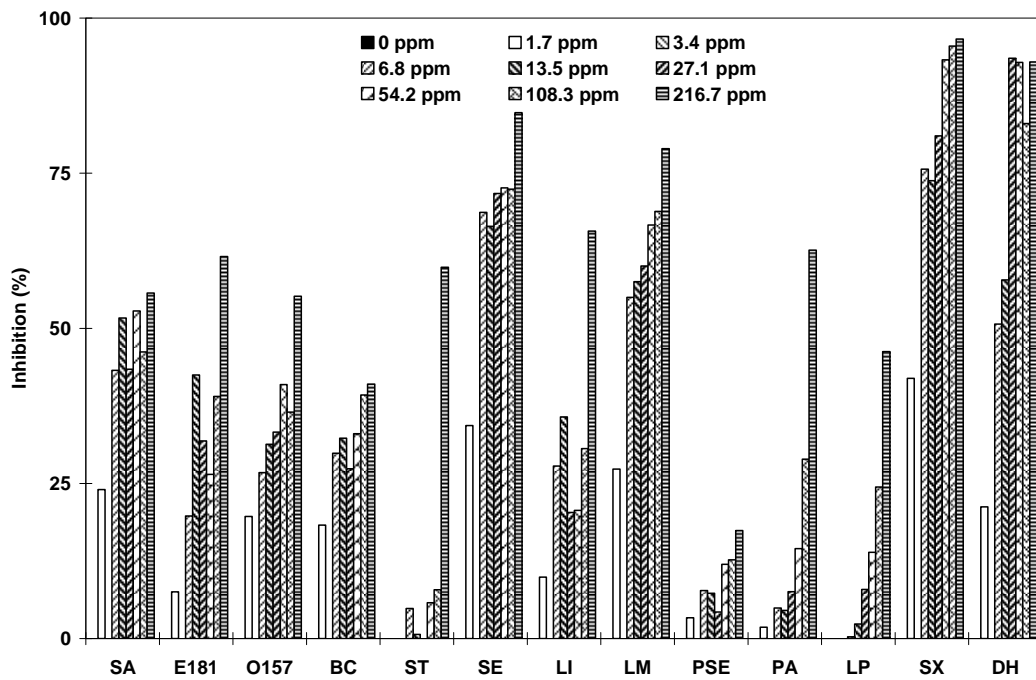
รูปที่ 5.2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคลโตซานวิสเกอร์

ไคลโตซานนาโนสเฟียร์แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดและยีสต์ที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 5.3) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไคลโตซานนาโนสเฟียร์สูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้น โดยทั่วไปแสดงระดับการยับยั้งประมาณร้อยละ 25-35 ยกเว้น *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus xylosus* และ *Debaryomyces hansenii* ซึ่งถูกยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 ทำให้สามารถประมาณค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แสดงการยับยั้ง (minimal inhibitory concentration) ที่ระดับมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ MIC ของไคลโตซานนาโนสเฟียร์ต่อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ได้เท่ากับ 3.4, 13.5, 3.4, 6.8, และ 108.3 ppm ตามลำดับ



รูปที่ 5.3 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของไลโคซานนาโนสเฟียร์

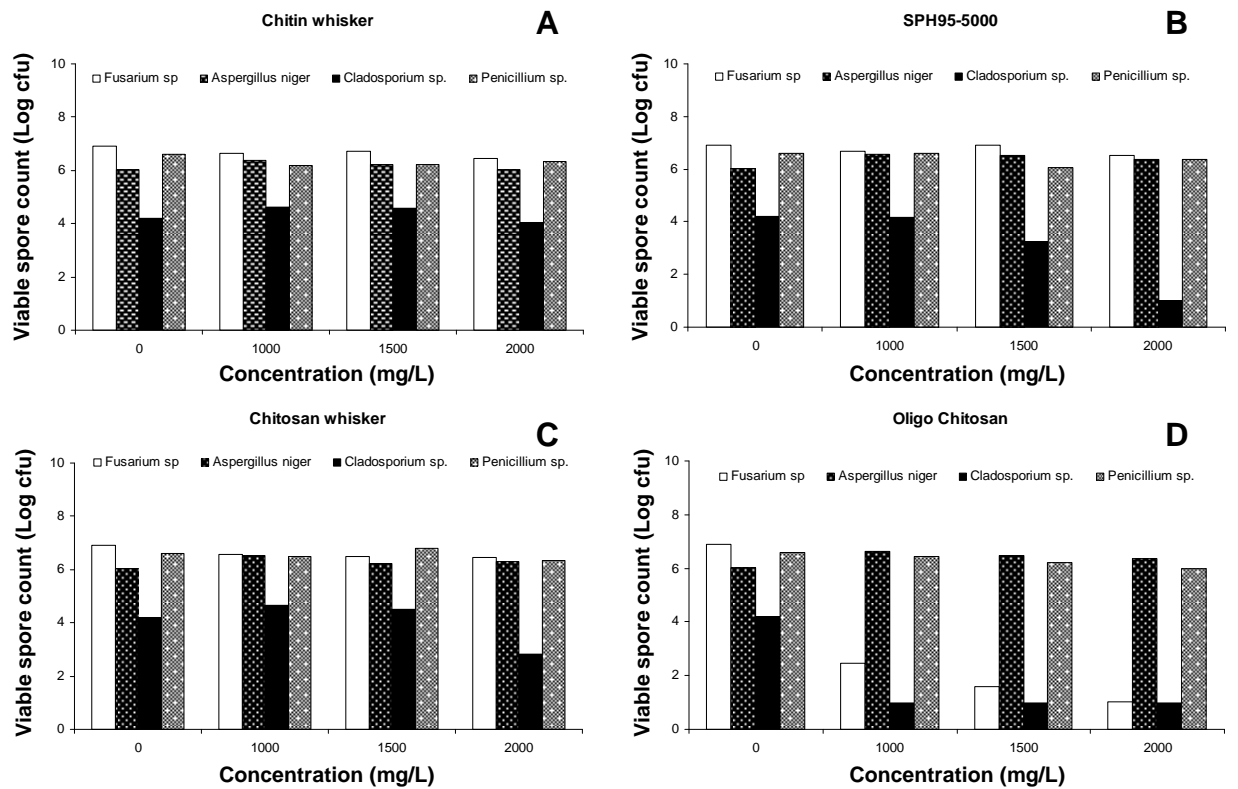
ออลิโกไลโคซานแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดและยีสต์ที่ทำการทดสอบ (รูปที่ 5.4) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของออลิโกไลโคซานสูงขึ้นโดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้น โดยทั่วไปแสดงระดับการยับยั้งมากกว่าร้อยละ 50 ยกเว้น ทำให้สามารถประมาณค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่แสดงการยับยั้ง (minimal inhibitory concentration) ที่ระดับมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ MIC ของออลิโกไลโคซานต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* E181, *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, *Salmonella typhimurium* DMST 0562, *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici* BCC 9546, *Staphylococcus xylosus* และ *Debariomyces hansenii* ได้เท่ากับ 13.5, 216.7, 216.7, 216.7, 6.8, 216.7, 6.8, 216.7, 6.8, และ 6.8 ppm ตามลำดับ ยกเว้น *Bacillus cereus* C113 *Pseudomonas aeruginosa* BCC 27607 และ *Lactobacillus plantarum* BCC 9545 ซึ่งถูกยับยั้งประมาณร้อยละ 25-46 แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นที่ระดับสูงสุดในการทดลอง



รูปที่ 5.4 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของออลิโกไคโตซาน

5.3.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อรา

รูปที่ 5.5 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อราของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานทั้ง 4 ชนิด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไคตินวิสเกอร์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่ไคโตซานวิสเกอร์และไคโตซานนาโนสเฟียร์แสดงฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ *Cladosporium sp.* โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 2000 และ 1500 ppm ตามลำดับ สำหรับออลิโกไคโตซานแสดงฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะ *Fusarium sp.* และ *Cladosporium sp.* โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 1000 ppm



รูปที่ 5.5 ผลการยับยั้งเชื้อราชนิดต่างๆ: □ *Fusarium sp.* ■ *Aspergillus niger* ■ *Cladosporium sp.* และ ■ *Penicillium sp.* ของ (A) ไคตินวิสเกอร์ (B) ไคโตซานนาโนสเฟียร์ (C) ไคโตซานวิสเกอร์ และ (D) ออลิโกไคโตซาน

5.4 สรุปผลการทดลอง

วัสดุไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ ไคโตซานนาโนสเฟียร์ และออลิโกไคโตซาน มีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และ เชื้อรา แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของอนุพันธ์ ความเข้มข้น และชนิดของจุลินทรีย์ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเกษตรต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ลดการสูญเสียจากการเสื่อมเสียของอาหารทั้งในด้านคุณภาพและการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

5.5 เอกสารอ้างอิง

1. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; and Jeon, Y. Trends in Food Science & Technology 1999, 10, 37-51.
2. a) Richardson, S.C.; Kolbe, H. V.; and Duncan, R. *Int. J. Pharm.* 1999, 178 (2), 231. b) Pruden, J. F.; Miegel, P.; Friedlich, L.; and Balassa, L. *American Journal of Surger* 1970, 119, 5, 560-564.

3. a) Yamamoto, H. and Amaike, M.; *Macromolecules* 1997, 30, 3936-3937. b) Tomihata, K. and Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18, 567-575.
4. a) Uragami, T.; Mori, H.; Noishiki, Y.; and Jinko Zoki. 1988, 17, 2,511-514. b) Matsuhashi, S. and Kume, T. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 237-241. c) Dumitriu, S.; Popa, M. I.; Cringu, A.; and Stratone, A. *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 595-599.
5. Amano, K. and Ito, E. *European Journal of Biochemistry* 1978, 85, 1, 97-104.
6. Chang, K.L.B.; Lin, Y.-S.; and Chen, R.H. *Journal of Food Engineering* 2003, 57, 315-319.
7. Roller, S. and Corvill, N. *Journal of Food Protection* 2000, 63, 202-209.
8. Roller, S. and Corvill, N. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 47, 67-77.
9. Youn, S.K.; Park, S. M.; Kim, Y.J.; and Ahn, D.H. *Journal of Chitin and Chitosan* 1999, 4, 189-195.
10. Fukamizo, T. and Brzezinski, R. *Biochemical Cell Biology* 1997, 75, 687-696.
11. Jo, C.; Lee, J.W.; Lee, K.H.; and Byun, M.W. *Meat Science* 2001, 59, 369-375.
12. Xing, Ke.; Chen, X.G.; Li, Y. Y.; Liu, C.S.; Liu, C.G.; Cha, D.S.; and Park, H.J. *Carbohydrate Polymers* 2008, 74, 114-120.
13. Hernández-Lauzardo, A.N.; Bautista-Baños, S.; Velázquez-del Valle, M.G.; Méndez-Montealvo, M.G.; Sánchez-Rivera, M.M.; and Bello-Pérez, L.A. *Carbohydrate Polymers* 2008, 73, 541-547.

บทที่ 6

การศึกษาเบื้องต้นของการประยุกต์ใช้ไคโตซานวิสเกอร์ในขนมสาเล่

Preliminary study on utilization of chitosan whiskers in Thai steamed egg cake

(Kanohm Sa Lee)

6.1 บทนำ

ไคติน-ไคโตซานเป็นสารสกัดที่ได้จากเปลือกกุ้ง กระจกุ้ง และแกนปลาหมึก ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติ จึงไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม ไคติน-ไคโตซานสามารถนำมาประยุกต์ได้ในหลายอุตสาหกรรม รวมทั้งเกษตรกรรม การแพทย์ คอสมेटิกส์ และอาหาร

ในอดีตที่ผ่านมา ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำไคโตซานในรูปของสารละลายมาประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งและรักษาคุณภาพอาหารในด้านต่างๆ อาทิเช่น ใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเต้าหู้ ใช้เป็นสารเพิ่มความใสในน้ำผลไม้¹ เนื่องจากไคโตซานชาติเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งมีสมบัติพื้นฐานที่เกี่ยวกับการเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility)² ไม่เป็นพิษหรืออันตราย (non toxicity)³ เป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (bioactivity)⁴ สามารถย่อยสลายหรือถูกขับออกจากร่างกายได้เองตามธรรมชาติโดยไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง (biodegradability)⁵

ไคติน-ไคโตซานได้ถูกนำมาประยุกต์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน เนื่องจากในสถานะที่เป็นกรด ไคโตซานมีจำนวนประจุบวกของหมู่อะมิโนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยกลูโคซามีนมากกว่าไคติน คณะวิจัยของ Chang⁶ ได้รายงานการนำไคโตซานไปผสมกับเต้าหู้ โดยเตรียมสารละลายไคโตซานในกรดน้ำส้ม 5% แล้วนำไปผสมกับนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมไคโตซานลงไปในเต้าหู้ สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้จากปกติ 5 วัน เป็นนานถึง 7-13 วัน นอกจากนี้ยังรายงานว่า การใช้ไคโตซานที่มี %DD สูง สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าไคโตซานที่มี %DD ต่ำ เนื่องจากไคโตซานที่มี %DD สูงมีจำนวนประจุบวกมากกว่า ซึ่งประจุบวกนี้จะทำหน้าที่ไปจับกับประจุลบของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ และยังมีรายงานว่า การใช้ไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อีกมากมาย เช่น Roller and Corvill รายงานถึงการผสมไคโตซานลงไป ในน้ำสลัดมายองเนส⁷ และน้ำแอปเปิ้ล⁸ เป็นต้น ถึงแม้ว่าไคตินและไคโตซานจะมีประสิทธิภาพในการต่อต้านการเกิดของเชื้อจุลินทรีย์เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามมวลโมเลกุลที่สูงและความหนืดที่สูงของพอลิเมอร์นี้อาจจำกัดการใช้งานบางประเภท จากงานวิจัยของ Young และคณะ⁹ พบว่าการเติมไคโตซานมวลโมเลกุล 30,000 ถึง 120,000 ลงไปในไส้กรอก เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ไคโตซานสามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเท่ากับการเติม NaNO₂ ลงไปในไส้กรอก แต่ปัญหาด้านความหนืดที่สูง

ของโคโคซานส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในลำไส้ของสัตว์ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์จำพวก โคคิเนสและโคโคซานเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของโคคิเนสและโคโคซานโดยตรง ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายโคโคซานมวลโมเลกุลสูงและดูดซึมต่อไปได้¹⁰ ดังนั้น การใช้โคโคซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ออลิโกโคโคซาน (มวลโมเลกุลระดับ $10^3 \sim 10^4$ Dalton) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง คณะวิจัยของ Jo¹¹ ได้รายงานการใช้โคโคซานที่มีมวลโมเลกุล 5,000 ผสมลงในไส้กรอก แล้วนำไปเปรียบเทียบกับไส้กรอกที่ผลิตด้วยกรรมวิธีปกติ พบว่าการเติมโคโคซานมวลโมเลกุลต่ำไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของไส้กรอก ซึ่งได้แก่ สี สัน รสชาติ และความเหนียวของไส้กรอก

โคคิเนส-โคโคซานเป็นอาหารเสริมที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากในร่างกายคนไม่มีเอนไซม์ช่วยย่อยโคคิเนส-โคโคซาน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้โคโคซานยังมีคุณสมบัติในการจับคอเลสเตอรอลในอาหาร โดยโคโคซานจะไปจับกับคอเลสเตอรอลแล้วก่อตัวเป็นไมเซลล์ ส่งผลให้การดูดซึมของคอเลสเตอรอลในระบบทางเดินอาหารลดลง¹² ดังนั้นโคโคซานจึงสามารถช่วยรักษาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และป้องกันหรือลดความเสี่ยงของการเป็นโรคหัวใจ ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการผลิตอาหารที่มีโคโคซานเป็นส่วนผสมหลายชนิด เช่น คุกกี้ มันฝรั่งแผ่นทอดกรอบ เส้นก๋วยเตี๋ยว และน้ำส้มสายชู เป็นต้น¹³

ในปี ค.ศ. 1983 โคโคซานได้รับการยอมรับจาก USFDA (The United States Food and Drug Administration) ให้ใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร¹ จึงได้มีการนำโคโคซานมาใช้เพื่อรักษาสีของอาหารให้คงทน เนื่องจากโคโคซานมีคุณสมบัติในการดูดซับสีได้ดี นอกจากนี้ยังมีการใช้โคโคซานเพื่อคงรูปอาหารหรือเพื่อเพิ่มความเหนียวให้กับอาหาร¹⁴ อีกด้วย

โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอนุพันธ์โคคิเนส-โคโคซานที่เตรียมได้มาใช้ประโยชน์ในการบริโภคด้วยวิธีการใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหาร หรือสารถนอมอาหาร เนื่องจากโคโคซานจัดเป็นพอลิแซคคาไรด์จำพวกมิโน ซึ่งมีสมบัติพื้นฐานในเชิงการแพทย์ว่าสามารถย่อยสลายในร่างกายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลต่ำจำพวกอะมิโนแซคคาไรด์ที่จำเป็นต่อข้อต่อ กระดูกอ่อน นอกจากนี้ ในเชิงชีวเคมี วัสดุโคคิเนส-โคโคซาน ยังมีสมบัติในการต่อต้านเชื้อราแบคทีเรีย ดังนั้นการพัฒนาวัสดุนี้เพื่อใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารจำพวกอาหารแห้ง เช่น กะปิ ปลา ร้า น้ำปลา หรือ อาหารสดบางประเภทเช่น แหนม เต้าหู้ ลูกชิ้นปลา นอกจากจะเป็นการเพิ่มคุณค่าอาหารด้วยอะมิโนแซคคาไรด์แล้ว ยังเป็นการถนอมอาหารที่จะทำให้อาหารดังกล่าวปราศจากการรบกวนของเชื้อรา และแบคทีเรีย อีกด้วย

สำหรับเนื้อหางานวิจัยในบทนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของการประยุกต์ใช้อนุพันธ์โคคิเนส-โคโคซานในขนมสาลี ซึ่งเป็นขนมที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักและทำให้สุกโดยการนึ่งด้วยไอน้ำ โดยทั่วไปขนมสาลีไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน มักเสื่อมเสียโดยเชื้อรา เนื่องจากประกอบด้วยแป้งและความชื้นปริมาณค่อนข้างสูง วัสดุโคคิเนส-โคโคซานต้นแบบที่เลือกใช้สำหรับการยืดอายุการเก็บรักษา

ขนมสาหร่ายในงานวิจัยนี้ คือ ไคโตซานวิสเกอร์ เนื่องจากมีหมู่อะมิโนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง มีขนาดเล็ก และสามารถแขวนลอยหรือกระจายตัวได้ในน้ำ

6.2 วิธีการทดลอง

6.2.1 การเตรียมขนมสาหร่าย

ผสมแป้ง (750 กรัม) ไข่ นม เนย สีผสมอาหาร (สีชมพู) แล้วตีให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งเป็นสามส่วน ส่วนละ 1100 กรัม นำแต่ละส่วนไปผสมไคโตซานวิสเกอร์ (ความเข้มข้น 25.63 mg/mL และ pH ~ 6.2) ปริมาตร 29.26, 58.53 และ 146.3 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของไคโตซานวิสเกอร์เป็น 0.3, 0.6 และ 1.5 % โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับน้ำหนักแป้ง จากนั้นนำไปนึ่งประมาณ 30 นาที รอให้ขนมสาหร่ายเย็น แล้วเก็บใส่กล่องพลาสติกใสพอลิโพรไพลีน สำหรับขนมสาหร่ายชุดควบคุมก็เตรียมโดยวิธีเดียวกัน โดยไม่เติมไคโตซานวิสเกอร์

สถานที่เตรียมขนมสาหร่าย: ร้านทรงนิมิต อ.วิเศษชัยชาญ จ.อ่างทอง

6.2.2 การตรวจสอบสมบัติและลักษณะทางกายภาพของขนมสาหร่าย

6.2.2.1 การตรวจสอบค่า water activity

ค่า water activity (a_w) ของตัวอย่างตรวจสอบโดยเครื่องวัดค่า water activity (รุ่น testo 650 ของบริษัท testo GmbH & co. Lenzkirch, Germany) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในวันที่ 0, 2 และ 4 ของการเก็บรักษา ตรวจสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.2.2.2 การตรวจสอบสี

สีของตัวอย่างตรวจสอบโดยเครื่องวัดสี chromameter (รุ่น CR-310 ของบริษัท Minolta Co.Ltd.,Japan) ในวันที่ 0, 2 และ 4 ของการเก็บรักษา ตรวจสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

6.2.3 การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัส

คุณลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) ของตัวอย่าง ตรวจสอบในวันที่ 0 และ 3 ของการเก็บรักษา ตัดขนมที่เตรียมได้ทั้ง 4 สูตรให้มีขนาด 3×3×3 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปตรวจสอบเนื้อสัมผัส โดยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (texture analyzer) LLOYD (รุ่น TA 500, England) ซึ่งมีสภาวะการทดสอบดังนี้ load cell ขนาด 500 นิวตัน หัวทดสอบชนิดหัวกดทรงกระบอกมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ความเร็วของหัวทดสอบเท่ากับ 20 มิลลิเมตรต่อนาที และระยะทางที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสียรูปเท่ากับ 60% ทดสอบตัวอย่างละ 10-12 ซ้ำ

6.2.4 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา

6.2.4.1 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มีดังนี้ standard plate count agar (PCA) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.9 % แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจกพลาสติกปราศจากเชื้อ เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) ไมโครปิเปต (micropipet) และทิป (tip)

6.2.4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหาร standard plate count agar (PCA) ปริมาณ 23.5 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15 - 20 มิลลิลิตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วจึงเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะคว่ำลง (อาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมก่อนทำการทดลอง 1 วัน)

6.2.4.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างขนมสาลีปริมาณ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเทสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.9 % ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10) ลงในถุง แล้วนำไปตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหาร Stomacher (BagMixer® 400) ด้วยความเร็วสูง นาน 3 นาที จะได้ตัวอย่างที่ผสมเข้ากันและมีความเข้มข้นเป็น 10^{-1} จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นลดลงเรื่อยๆ ครั้งละ 10 เท่า (10^{-2} , 10^{-3} , ...) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธี spread plate ซึ่งมีหลักการโดยย่อดังนี้ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มาผึ่งผืนหน้าให้แห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจายเชื้อ (spread) ให้ทั่วผืนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนระดับความเข้มข้นอื่น เช่น 10^{-2} , 10^{-3} จนถึง 10^{-5} ก็ทำเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อโดยเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี

6.2.4.2 การตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มีดังนี้ potato dextrose agar (PDA) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.9 % แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจกพลาสติกปราศจากเชื้อ เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) ไมโครปิเปต (micropipet) และทิป (tip) และสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เข้มข้น 10% (ฆ่าเชื้อแล้วเก็บในตู้เย็น)

6.2.4.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหาร potato dextros agar (PDA) ปริมาณ 39 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เข้มข้น 10 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15 - 20 มิลลิลิตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วจึงเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้เย็น (อาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมก่อนทำการทดลอง 1 วัน)

6.2.4.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (ดู 6.2.4.1.2)

จำนวนยีสต์และราวิเคราะห์โดยวิธี spread plate ซึ่งมีหลักการโดยย่อดังนี้ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มาผึ่งผิวน้ำให้แห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจายเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนระดับความเข้มข้นอื่น เช่น 10^{-2} , 10^{-3} จนถึง 10^{-5} ก็ทำเช่นเดียวกัน โดยทำการทดลองระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อโดยเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี

6.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาเบื้องต้น ได้เลือกขนมสาเล่เป็นอาหารต้นแบบ เนื่องจากเป็นขนมไทยที่มีองค์ประกอบหลักเป็นแป้ง มีอายุการเก็บรักษาก่อนข้างสั้น ประมาณ 2-3 วัน สำหรับสารตัวอย่างที่เลือกใช้เพื่อเป็นกรณีศึกษาเบื้องต้นนี้ คือ ไคโตซานวิสเกอร์ เนื่องจากเหตุผลสองประการ คือ (i) ไคโตซานสามารถด้านการเจริญของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียได้ดีกว่าไคติน และ (ii) ไคโตซานวิสเกอร์สามารถกระจายตัวในน้ำกลั่นได้ ให้คิสเพอร์ชันหรือคอลลอยด์ที่เสถียร ซึ่งเหมาะสำหรับอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง เพราะไม่จำเป็นต้องใช้กรดอะซิติกช่วยในการละลาย นอกจากนี้การใช้สารไคโตซานวิสเกอร์ซึ่งกระจายตัวในน้ำกลั่นยังไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นและรสชาติของอาหารอีกด้วย

6.3.1 ลักษณะทางกายภาพของขนมสาเล่

แป้งผสมมีลักษณะเหลวขึ้น เมื่อปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่เติมลงไปในสูตรเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณน้ำที่มากขึ้น (สูตรขนมสาเล่ปกติไม่มีการเติมน้ำ) และเมื่อนำไปนึ่ง

ขนมสาหร่ายที่ได้จากการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์มีลักษณะแข็งขึ้น ฟูน้อยลง และมีสีเข้มขึ้น ลักษณะดังกล่าวชัดเจนขึ้นตามปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่เติมลงไป อย่างไรก็ตามการเติมไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณ 0.3 และ 0.6 %w/w ยังให้ขนมสาหร่ายที่มีลักษณะไม่แตกต่างจากขนมสาหร่ายชุดควบคุมมากนัก

6.3.2 ค่า water activity ของขนมสาหร่าย

ค่า water activity หรือค่า a_w เป็นค่าที่บอกถึงระดับปริมาณน้ำต่ำสุดในอาหารที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ดังนั้นจึงสามารถใช้ในการประเมินเบื้องต้นว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเสีย นอกจากนี้ค่า a_w ยังใช้ในการควบคุมและป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย จึงมีผลโดยตรงต่อการกำหนดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญเติบโตภายใต้ค่า a_w ที่แตกต่างกันและจำกัด โดยทั่วไปต้องทำให้อาหารมีค่า a_w ต่ำกว่าที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น แบคทีเรียเกือบทุกชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อค่า a_w ต่ำกว่า 0.9 และราส่วนใหญ่ไม่เจริญเติบโต เมื่อค่า a_w ต่ำกว่า 0.7

จากตารางที่ 6.1 พบว่าค่า a_w ของขนมสาหร่ายชุดควบคุมเป็น 0.93 (ตารางที่ 6.1) ในขณะที่ค่า a_w ของขนมสาหร่ายชุดทดลองหรือชุดที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณ 0.3-1.5 %w/w มีค่าในช่วง 0.96-1.00 (ตารางที่ 6.1) โดยค่า a_w เพิ่มขึ้นตามปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่เติมลงไป ในที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณน้ำที่มีในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ และค่า a_w ไม่ขึ้นกับระยะเวลาในการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าขนมสาหร่ายที่เตรียมได้ทุกสูตรมีความเสี่ยงต่อการเน่าเสียหรือเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่เป็นแบคทีเรียและรา เนื่องจากค่า a_w สูงกว่า 0.9 โดยขนมสาหร่ายสูตรทดลองหรือสูตรที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์มีความเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่า (พิจารณาจากค่า a_w ที่มากกว่า) ดังนั้นการประยุกต์ใช้ไคโตซานวิสเกอร์ในรูปแบบของคิสเพอร์ชั่นหรือในรูปแบบของสารแขวนลอยในน้ำสำหรับขนมสาหร่าย อาจไม่เหมาะสม

ตารางที่ 6.1 ค่า water activity (a_w) ของขนมสาหร่ายที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ

Chitosan whisker content (%w/w)	Water activity (a_w)		
	Day 0	Day 1	Day 3
0.0	0.93±0.03	0.93±0.01	0.93±0.01
0.3	0.96±0.01	0.95±0.01	0.97±0.01
0.6	0.98±0.00	0.95±0.01	0.98±0.02
1.5	1.00±0.00	0.98±0.01	0.98±0.01

6.3.3 สีของขนมสาลี

การตรวจสอบสีของอาหารสามารถพิจารณาได้จากค่า L^* , a^* และ b^* โดย L^* เป็นค่าที่บอกความสว่างของสี ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 โดย 0 หมายถึงสีดำ และ 100 หมายถึง สีขาว สำหรับ a^* เป็นค่าที่บอกถึงโทนสีแดง-เขียว โดย “+” หมายถึงวัตถุมีสีแดง และ “-” หมายถึงวัตถุมีสีเขียว ในส่วนของ b^* เป็นค่าที่บอกถึงโทนสีเหลือง-น้ำเงิน โดย “+” หมายถึงวัตถุมีสีเหลือง และ “-” หมายถึงวัตถุมีน้ำเงิน (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2542)

จากการทดลองพบว่าขนมสาลีชูดควบคุมมีค่า $L^* \sim 82$, $a^* \sim 19$ และ $b^* \sim 26$ (ตารางที่ 6.2) และขนมสาลีชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย เช่น 0.3 และ 0.6 %w/w แสดงค่า $L^* \sim 80$, $a^* \sim 17$ และ $b^* \sim 26$ (ตารางที่ 6.2) ซึ่งใกล้เคียงกับกรณีของขนมสาลีชูดควบคุมชี้ให้เห็นว่าขนมสาลีชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อยมีสีและความสว่างที่ไม่แตกต่างจากสาลีชูดควบคุมมากนัก อย่างไรก็ตามขนมสาลีชูดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณมาก เช่น 1.5 %w/w แสดงค่า L^* ลดลง ($L^* \sim 76$) ในขณะที่ค่า a^* ($a^* \sim 20$) และ b^* ($b^* \sim 28$) เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 6.2) ชี้ให้เห็นว่าขนมมีสีเข้มขึ้น หรือมีความสว่างของสีลดลง และยังคงมีโทนสีแดง และสีเหลือง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพที่สังเกตเห็น นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อสีของขนมสาลีด้วย กล่าวคือ เมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ขนมสาลีทุกสูตรแสดงค่า L^* ลดลง ชี้ให้เห็นว่าขนมมีสีเข้มขึ้น และค่า a^* และ b^* ก็มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน แต่ยังคงแสดงค่า + แสดงให้เห็นว่าขนมสาลียังมีสีอยู่ในโทนแดง และเหลือง ตามลำดับ

ตารางที่ 6.2 ค่า L^* , a^* และ b^* ของขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ

Chitosan whisker content (%w/w)	Color	Day 0	Day 1	Day 3
0	L^*	81.71±1.71	81.53±0.97	80.58±3.14
	a^*	18.91±0.72	17.51±1.47	13.29±1.65
	b^*	26.19±2.13	24.10±0.57	24.65±0.32
0.3	L^*	80.05±1.11	74.21±0.63	71.03±4.48
	a^*	17.34±0.19	18.19±3.09	16.32±1.88
	b^*	25.07±0.15	25.98±1.14	22.56±2.09
0.6	L^*	80.26±0.27	76.87±0.88	75.65±0.46
	a^*	17.10±0.34	18.51±2.47	17.74±4.13
	b^*	25.80±0.14	26.10±0.40	24.87±0.53
1.5	L^*	76.08±0.50	75.21±1.01	75.80±0.82
	a^*	20.29±0.24	19.08±2.33	16.37±0.36
	b^*	28.30±0.27	25.55±0.70	26.59±0.13

6.3.4. คุณลักษณะเนื้อสัมผัส

คุณลักษณะเนื้อสัมผัสมีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค คุณลักษณะเนื้อสัมผัสที่สำคัญของอาหาร ได้แก่ ค่าความแข็ง (hardness, หน่วยนิวตัน) การเกาะรวมตัวกันของเจล (cohesiveness) การคืนตัวกลับ (springiness, หน่วยมิลลิเมตร) ความยากง่ายในการเคี้ยว (gumminess, หน่วยนิวตัน) และพลังงานในการเคี้ยว (chewiness, หน่วยนิวตันเมตร)

จากการทดลองพบว่าขนมสาลีช็อคทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ต้องใช้แรงสูงสุดในการกดสูงกว่า (5.83-7.14 นิวตัน) ขนมสาลีช็อคควบคุม (4.73 นิวตัน) (ตารางที่ 6.3) แสดงว่าขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์มีลักษณะแข็งกว่ากรณีของขนมสาลีที่ไม่เติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ และเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น เช่น 3 วัน พบว่าความแข็งของขนมสาลีช็อคควบคุมแทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ขนมสาลีช็อคทดลองมีความแข็งเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนมสาลีช็อคทดลองมีน้ำเป็นองค์ประกอบมาก และมีการสูญเสียน้ำในระหว่างการเก็บรักษา ส่งผลให้ขนมมีลักษณะแข็งขึ้น เมื่อพิจารณาค่า cohesiveness หรือการเกาะรวมตัวกันภายในของอาหาร พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.60-0.62 (ตารางที่ 6.3) ซึ่งให้เห็นว่าขนมสาลีนั้นมีการเกาะรวมตัวกันภายในอยู่ในระดับปานกลาง หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าพลังงานที่ใช้ในการบดเคี้ยวหรือในการทำลายขนมสาลีให้แตกหักแยกออกจากกันอยู่ในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตามค่า cohesiveness มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อปริมาณสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ค่า cohesiveness ของขนมสาลีช็อคควบคุม และช็อคทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย (0.3 และ 0.6 %w/w) ลดลง เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับกรณีของขนมสาลีช็อคทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณมาก (1.5 %w/w) สำหรับการคืนตัวกลับหรือ springiness ของขนมสาลีพบว่าอยู่ในช่วง 16-18 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6.3) โดยระยะเวลาในการเก็บรักษาและปริมาณสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ที่เติมลงไปไม่มีผลต่อการกลับคืนสู่ขนาดและรูปร่างเดิมของขนมสาลี เมื่อพิจารณาความยากง่ายในการเคี้ยว หรือ gumminess ซึ่งคำนวณได้จากผลคูณของค่า hardness และค่า cohesiveness พบว่ามีค่า 2.94 นิวตัน สำหรับขนมสาลีช็อคควบคุม และมีค่าในช่วง 3.62-4.41 นิวตัน สำหรับขนมสาลีช็อคทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ (ตารางที่ 6.3) ซึ่งให้เห็นว่าขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์มีลักษณะคล้ายยางหรือเป็งเป็ยกในขณะที่บดเคี้ยวมากกว่าขนมสาลีที่ไม่ได้เติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ หรืออาจกล่าวได้ว่าขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์มีความยากในการเคี้ยวมากกว่าหรือขนมสาลีที่ไม่ได้เติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ และเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้นลักษณะคล้ายยางหรือเป็งเป็ยกในขณะที่บดเคี้ยวหรือความยากในการเคี้ยวของขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ก็เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งแตกต่างจากกรณีของขนมสาลีที่ไม่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ สำหรับพลังงานในการเคี้ยว หรือ chewiness สามารถคำนวณได้จากผลคูณของค่า hardness ค่า cohesiveness และค่า springiness จากการทดลองพบว่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยว (เพื่อให้มีขนาดเล็กลง) ของขนมสาลีช็อค

ทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ในช่วง 63.97-74.43 นิวตันมิลลิเมตร ซึ่งมากกว่า 63.97 นิวตันมิลลิเมตร (ตารางที่ 6.3) ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับค่าความแข็ง (hardness) และความเหนียว (gumminess) ที่กล่าวไปข้างต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวขนมสาลีด้วย กล่าวคือ เมื่อเวลาในการเก็บขนมานขึ้น พลังงานที่ต้องใช้ในการเคี้ยวขนมก็เพิ่มขึ้นด้วย หรือเคี้ยวยากขึ้น สำหรับกรณีของขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ ในส่วนของขนมสาลีชุดควบคุม พบว่าพลังงานที่ต้องใช้ในการเคี้ยวขนมลดลงเล็กน้อย เมื่อเวลาในการเก็บขนมานขึ้น

ตารางที่ 6.3 ค่าความแข็ง การเกาะรวมตัวกันของเจล การคืนตัวกลับ ความยากง่ายในการเคี้ยว และ พลังงานในการเคี้ยวของขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ

Chitosan whisker content (%w/w)	Day	Hardness (N)	Cohesiveness	Springiness (mm)	Gumminess (N)	Chewiness (N.mm)
0	0	4.73±0.31	0.62±0.02	16.22±1.00	2.94±0.18	47.76±5.19
	3	4.54±0.81	0.58±0.00	17.03±0.77	2.64±0.46	44.77±6.68
0.3	0	5.83±0.56	0.62±0.02	17.61±0.73	3.62±0.41	63.97±9.00
	3	9.51±2.08	0.60±0.03	17.43±0.60	5.77±1.39	100.36±23.44
0.6	0	7.14±0.86	0.61±0.03	16.95±1.30	4.41±0.72	74.43±11.49
	3	8.44±0.82	0.55±0.01	17.18±0.37	4.65±0.43	79.95±8.51
1.5	0	6.49±0.60	0.60±0.02	16.58±1.36	3.88±0.41	63.99±4.98
	3	7.69±1.79	0.63±0.03	17.03±0.76	4.83±1.23	81.68±19.35

6.3.5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา

จากการทดลองพบว่าขนมสาลีชุดควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดประมาณ 77 โคโลนี/กรัม ในวันที่ 0 หรือวันแรกของการเตรียม ในขณะที่ขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ไม่พบจุลินทรีย์เลย (ตารางที่ 6.4 และรูปที่ 6.1) อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องของขนมเพิ่มขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดก็เพิ่มขึ้นด้วย เช่น เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเป็น 1 วัน ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของขนมสาลีชุดควบคุมเท่ากับ 1950 โคโลนี/กรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่เตรียมขนมประมาณ 25 เท่า และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย เช่น 0.3 และ 0.6 %w/w เท่ากับ 117-147 โคโลนี/กรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นจากวันแรกที่เตรียมขนม แต่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดดังกล่าวของขนมสาลีชุดทดลองน้อยกว่ากรณีของขนมสาลีชุดควบคุมประมาณ 13 เท่า ซึ่งให้เห็นว่าไคโตซานวิสเกอร์อาจหน่วงการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงแรกของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ ปริมาณมาก เช่น 1.5 %w/w พบว่าเป็น 10.8×10^4 โคโลนี/กรัม ซึ่งมากกว่ากรณีของขนมสาลีชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณน้ำหรือความชื้นที่มีอยู่มากในเนื้อขนมสาลีที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณมาก เป็นที่น่า

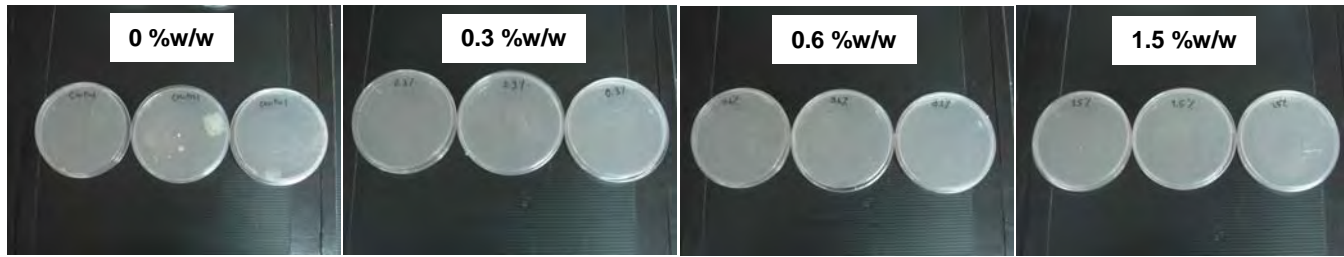
สังเกตว่าเมื่อเวลาในการเก็บรักษาขนมสาเล่เป็น 2 และ 3 วัน ไม่สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญได้ เมื่อเตรียมขนมให้เจือจาง 10^4 และ 10^5 เท่า ตามลำดับ สำหรับขนมสาเล่ชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (รูปที่ 6.1) ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีการปรากฏของโคโลนีเดี่ยว ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างมีลักษณะเยิ้มซึ่งเป็นผลมาจากความชื้น ทำให้ไม่สามารถมองเห็น โคโลนีของจุลินทรีย์ หรืออาจเนื่องจากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญมากกว่า 10^4 และ 10^5 โคโลนี/กรัม เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเป็น 2 และ 3 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 6.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราของขนมสาเล่ที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ

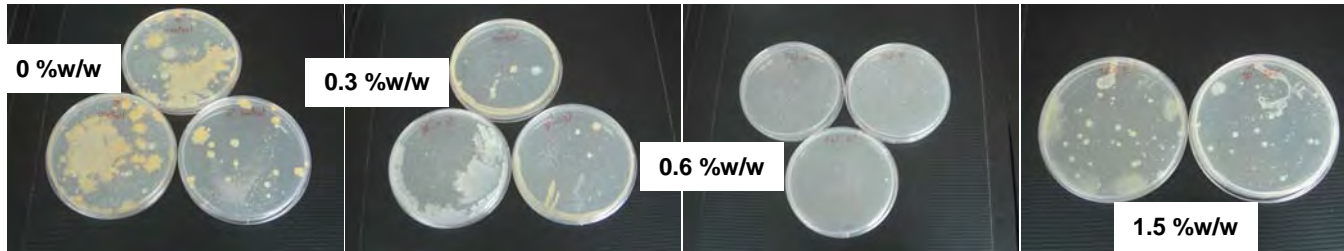
Chitosan whisker content (%w/w)	Day	จุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)	ยีสต์และรา (โคโลนี/กรัม)
0	0	76.67±25.17	0
	1	1950.00±393.45	10±0
	2	$51.7 \times 10^4 \pm 46.0 \times 10^4$	40±10
	3	$19.8 \times 10^4 \pm 2.4 \times 10^4$	UC (DF=10 ³)
0.3	0	0	0
	1	146.67±47.26	0
	2	UC* (DF=10 ⁴)	90±36
	3	UC (DF=10 ⁵)	UC (DF=10 ³)
0.6	0	0	0
	1	116.67±25.17	0
	2	UC* (DF=10 ⁴)	250±94
	3	UC (DF=10 ⁵)	UC (DF=10 ³)
1.5	0	0	0
	1	$10.8 \times 10^4 \pm 9.5 \times 10^4$	80±51
	2	UC* (DF=10 ⁴)	70±15
	3	UC (DF=10 ⁵)	$65 \times 10^3 \pm 16 \times 10^3$

*UC= uncountable

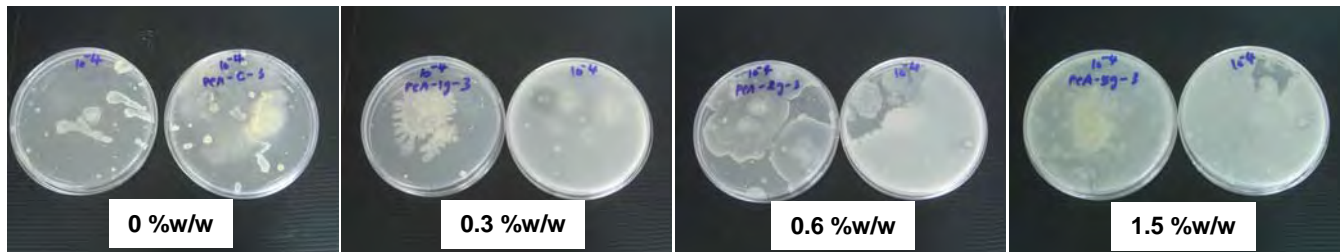
Day 0



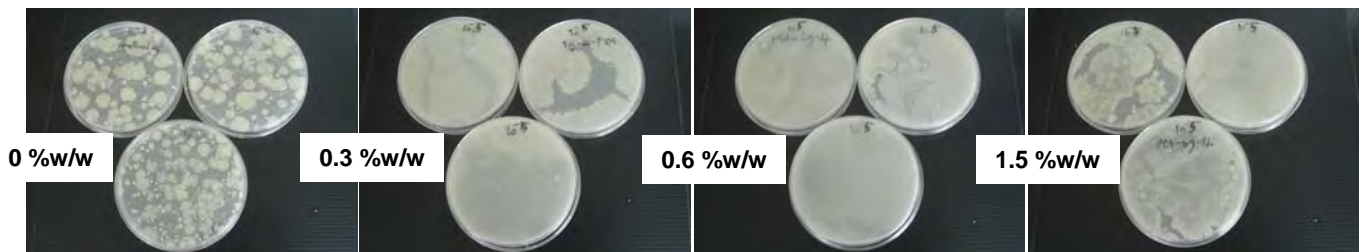
Day 1



Day 2



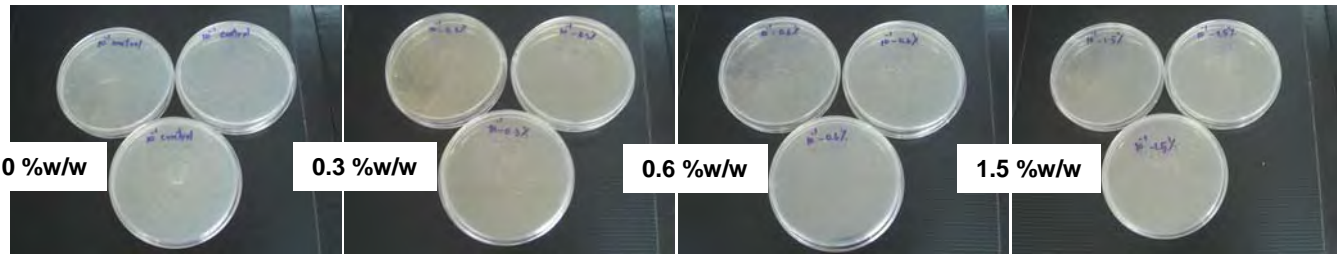
Day 3



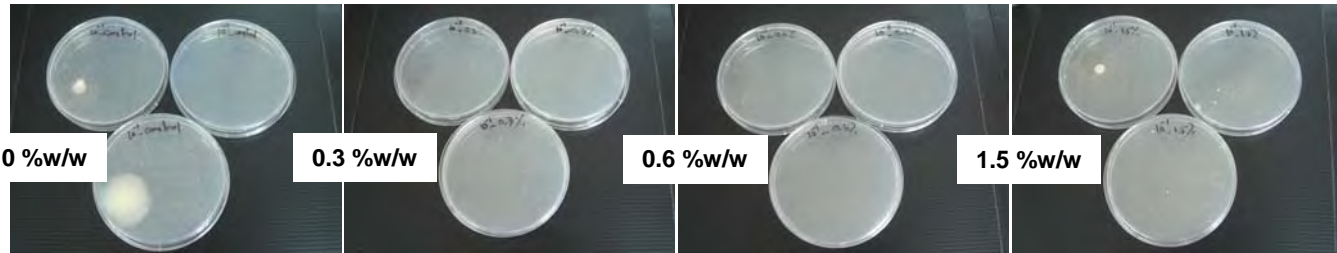
รูปที่ 6.1 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของขนมสาลีชุดควบคุมและขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ (0.3, 0.6 และ 1.5 %w/w) เมื่อมีการผันแปรเวลาในการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกโพลิสไตรีน ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับการตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา พบว่าในวันที่ 0 หรือวันแรกของการเตรียมขนม ไม่มีการเจริญของยีสต์และราปรากฏเลย ทั้งกรณีของขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดและขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ (ตารางที่ 6.4 และรูปที่ 6.2) อย่างไรก็ตามขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดที่มีปริมาณยีสต์และราเท่ากับ 10 โคโลนี/กรัม เมื่อเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็น 1 วัน ส่วนขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย คือ 0.3 และ 0.6 %w/w ยังไม่พบการเจริญของยีสต์และรา ซึ่งให้เห็นว่าโคโคซานวิสเกอร์สามารถหน่วงการเจริญของยีสต์และราได้ในช่วงต้นของการเก็บรักษา เช่นเดียวกับกรณีของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามเมื่อขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณมาก คือ 1.5 %w/w มีปริมาณยีสต์และราที่เจริญเท่ากับ 80 โคโลนี/กรัม ซึ่งมากกว่ากรณีของขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดประมาณ 4 เท่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเหตุผลเดียวกันกับการเจริญของแบคทีเรีย คือปริมาณน้ำหรือความชื้นในเนื้อขนมสูง ซึ่งเอื้อต่อการเจริญของยีสต์และรา เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น เช่น 2 และ 3 วัน พบว่าปริมาณยีสต์และราที่เจริญในขนมเพิ่มขึ้น ทั้งกรณีของขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดและขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ (ตารางที่ 6.4 และรูปที่ 6.2) อย่างไรก็ตามในวันที่ 3 ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณยีสต์และราที่เจริญ ของขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดและขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย คือ 0.3 และ 0.6 %w/w ได้ เมื่อตัวอย่างถูกเจือจาง 10^3 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เจือจางมากเกินไป หรืออาจสรุปได้ว่าในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา ปริมาณยีสต์และราที่เจริญในขนมสาเกี๊ยะชุบแป้งทอดและขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย คือ 0.3 และ 0.6 %w/w น้อยกว่าปริมาณยีสต์และราที่เจริญในขนมสาเกี๊ยะทอดที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ ปริมาณมาก คือ 1.5 %w/w ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพที่เห็นด้วยตาเปล่า ซึ่งจะกล่าวต่อไป อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์ ยีสต์และราควรเป็นไปตามเกณฑ์คุณภาพอาหารที่กำหนด ซึ่งจะมีการศึกษาค้นคว้าข้อมูลต่อไป

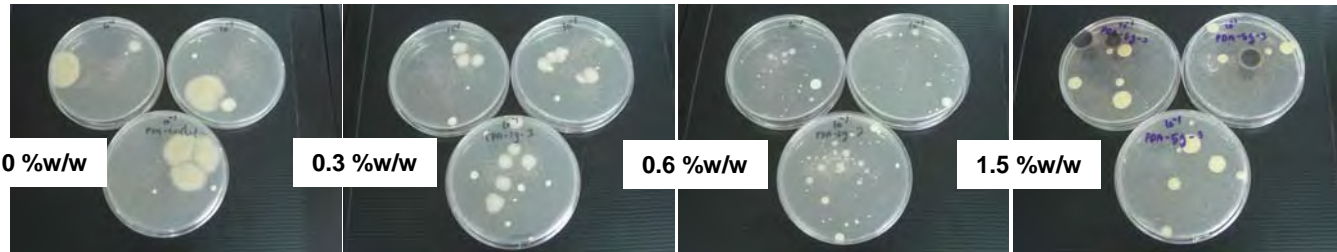
Day 0



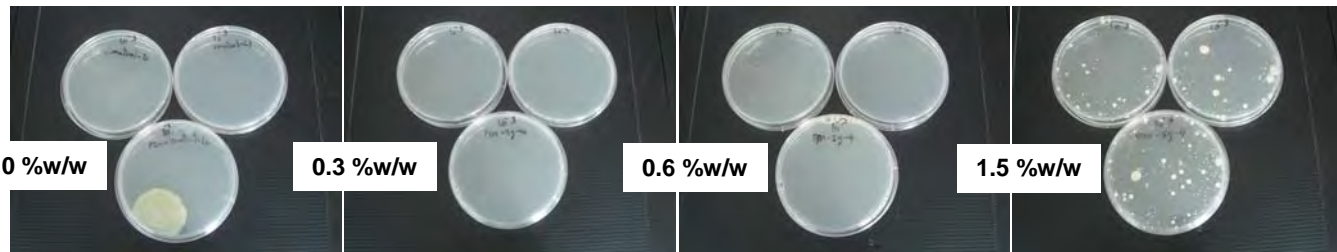
Day 1



Day 2



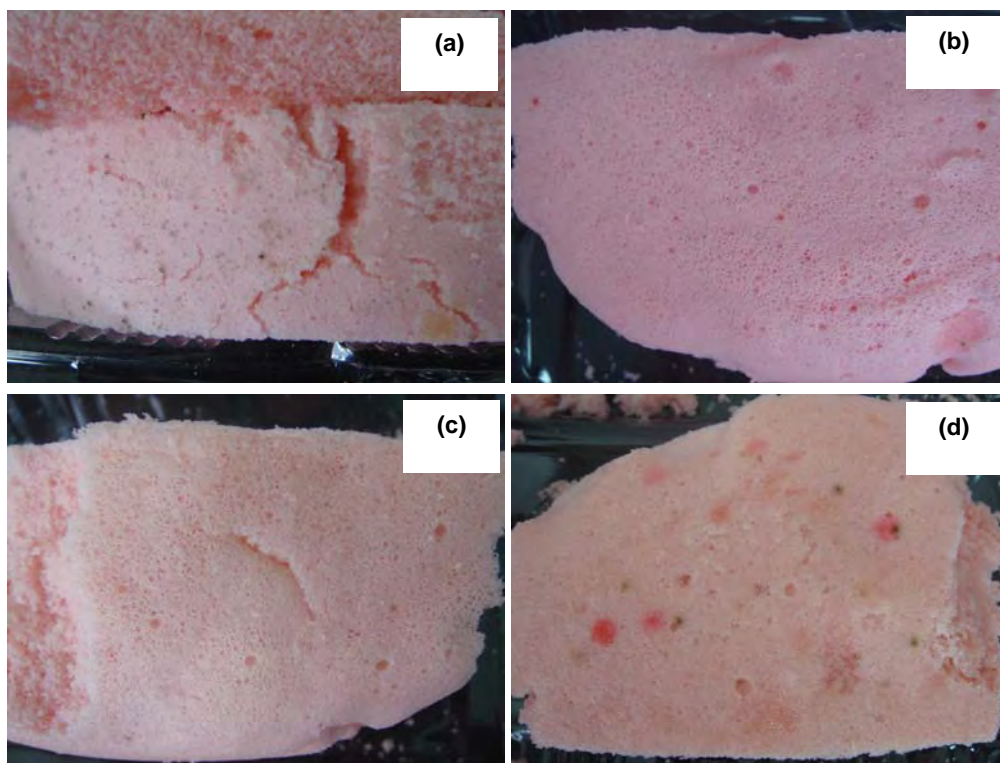
Day 3



หมายเหตุ: ความเข้มข้นของตัวอย่างเจือจางเกินไป (10^{-3}) จึงไม่เห็นเชื้อในวันที่ 3

รูปที่ 6.2 ยีสต์และราที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ของขนมสาลีชุดควบคุมและขนมสาลีชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ (0.3, 0.6 และ 1.5 %w/w) เมื่อมีการผันแปรเวลาในการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกใสพอลิโพรไพลีน ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับลักษณะทางกายภาพของขนมสาเล่เมื่อเก็บไว้ในกล่องพลาสติกใสพอลิโพรไพลีน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (ไม่นับวันที่ผลิต) พบว่าเป็นดังแสดงในรูปที่ 6.3 ซึ่งมีการเจริญของราที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำปรากฏที่ผิวหน้าขนม โดยจะเห็นได้ชัดเจนสำหรับกรณีของขนมสาเล่ชูดควบคุม และขนมสาเล่ชูดทดลองที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณมาก เช่น 1.5 %w/w ที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องจากการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณมาก ส่งผลให้น้ำหรือความชื้นที่อยู่ ในเนื้อขนมสาเล่มีปริมาณมากตามไปด้วย ซึ่งเอื้อต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับขนมสาเล่ชูดทดลองที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย เช่น 0.3 และ 0.6 %w/w แทบมองไม่เห็นจุดสีดำที่เป็นราเลย ซึ่งให้เห็นว่าการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชูดควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นผลของโคโคซานวิสเกอร์ อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบดังกล่าวอาจให้ผลที่คลาดเคลื่อนเนื่องจากการเตรียมขนมสาเล่ชูดควบคุม ไม่ได้เติมน้ำเพิ่มลงไป ในขณะที่การเตรียมขนมสาเล่ชูดทดลองมีการเติมน้ำเพิ่มลงไปซึ่งมาจากการเติมสารแวนิลอยโคโคซาน ถึงกระนั้นก็ได้ผลที่ได้ก็ยังสามารถยืนยันสนับสนุนว่าโคโคซานวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ยีสต์และราได้ เมื่อปริมาณน้ำที่ใช้ในการเตรียมขนมสาเล่มีน้อย



รูปที่ 6.3 ลักษณะทางกายภาพของของขนมสาเล่ภายหลังการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกใสพอลิโพรไพลีน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (ไม่นับวันที่ผลิต) (a) ขนมสาเล่ชูดควบคุม และ (b)-(d) ขนมสาเล่ชูดทดลองที่มีการเติมสารแวนิลอยโคโคซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆ; (b) 0.3, (c) 0.6 และ (d) 1.5 %w/w

6.4 สรุปผลการทดลอง

สำหรับการทดลองการศึกษาเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้ออนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในอาหาร ได้เลือกใช้ไคโตซานวิสเกอร์ในรูปของสารแขวนลอยเป็นอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานต้นแบบ และขนมสาเล่เป็นอาหารต้นแบบ โดยในการทดลองได้มีการผันแปรปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์เป็น 0.3, 0.6 และ 1.5%w/w และพบว่าขนมสาเล่ที่ได้จากการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์มีลักษณะทางกายภาพที่แข็งขึ้น ฟูน้อยลง และมีสีเข้มขึ้น โดยลักษณะดังกล่าวชัดเจนขึ้นตามปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่เติมลงไป อย่างไรก็ตามการเติมไคโตซานวิสเกอร์ ปริมาณ 0.3 และ 0.6 %w/w ยังให้ขนมสาเล่ที่มีลักษณะทางกายภาพไม่แตกต่างจากขนมสาเล่ชุดควบคุมมากนัก สำหรับค่า a_w หรือ water activity ของขนมสาเล่พบว่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่เติมลงไปในสูตร ส่งผลให้ความเสี่ยงในการเน่าเสียของขนมเพิ่มขึ้นด้วย ในส่วนของสี พบว่าขนมสาเล่ชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย เช่น 0.3 และ 0.6 %w/w มีสีและความสว่างที่ไม่แตกต่างจากขนมสาเล่ชุดควบคุมมากนัก ในขณะที่ขนมสาเล่ชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณมาก เช่น 1.5 %w/w มีสีเข้มขึ้น หรือมีความสว่างของสีลดลง แต่ยังคงมีโทนสีแดงและสีเหลืองเหมือนขนมสาเล่ชุดควบคุมและขนมสาเล่ชุดทดลองที่มีการเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อย นอกจากนี้ขนมมีสีเข้มขึ้นเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น เมื่อพิจารณาคูณลักษณะเนื้อสัมผัสพบว่า การเติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ลงในสูตรขนมสาเล่ส่งผลให้ขนมที่ได้มีลักษณะแข็งขึ้น มีความยากในการเคี้ยวมากขึ้น และต้องพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับขนมสาเล่ชุดควบคุมหรือชุดที่ไม่ได้เติมสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ และลักษณะดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น จากการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา พบว่าไคโตซานวิสเกอร์สามารถหน่วงการเจริญของจุลินทรีย์หรือแบคทีเรีย ยีสต์ และราได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงแรกหรือช่วงต้นของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามก็อาจต้องมีการควบคุมปริมาณน้ำที่ใส่ลงไปในสูตร เพื่อลดปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ยีสต์และรา

6.5 เอกสารอ้างอิง

1. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; and Jeon, Y. Trends in Food Science & Technology 1999, 10, 37-51.
2. a) Richardson, S.C.; Kolbe, H. V.; and Duncan, R. *Int. J. Pharm.* 1999, 178 (2), 231. b) Pruden, J. F.; Miegel, P.; Friedlich, L.; and Balassa, L. *American Journal of Surger* 1970, 119, 5, 560-564.
3. a) Yamamoto, H. and Amaike, M.; *Macromolecules* 1997, 30, 3936-3937. b) Tomihata, K. and Ikada, Y. *Biomaterials* 1997, 18, 567-575.

4. a) Uragami, T.; Mori, H.; Noishiki, Y.; and Jinko Zoki. 1988, 17, 2,511-514. b) Matsubishi, S. and Kume, T. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 237-241. c) Dumitriu, S.; Popa, M. I.; Cringu, A.; and Stratone, A. *Colloid Polym. Sci.* 1989, 267, 595-599.
5. Amano, K. and Ito, E. *European Journal of Biochemistry* 1978, 85, 1, 97-104.
6. Chang, K.L.B.; Lin, Y.-S.; and Chen, R.H. *Journal of Food Engineering* 2003, 57, 315-319.
7. Roller, S. and Corvill, N. *Journal of Food Protection* 2000, 63, 202-209.
8. Roller, S. and Corvill, N. *International Journal of Food Microbiology* 1999, 47, 67-77.
9. Youn, S.K.; Park, S. M.; Kim, Y.J.; and Ahn, D.H. *Journal of Chitin and Chitosan* 1999, 4, 189-195.
10. Fukamizo, T. and Brzezinski, R. *Biochemical Cell Biology* 1997, 75, 687-696.
11. Jo, C.; Lee, J.W.; Lee, K.H.; and Byun, M.W. *Meat Science* 2001, 59, 369-375.
12. Muzzarelli, R.A.A. *Carbohydrate Polymers* 1996, 29, 309-316.
13. Hirano, S. In *Chitin and Chitosan*; Elsevier Applied Science:London, 1989; pp. 51-69.
14. Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; and Jeon, Y.-J. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 10, 37-51.

บทที่ 7

การศึกษาเบื้องต้นของการประยุกต์ใช้ออนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานในถั่วกวน

Preliminary study on utilization of chitin-chitosan derivatives in bean paste

7.1 บทนำ

ไคติน-ไคโตซานเป็น โคพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย β -(1-4)-D-glucosamine (deacetylation unit) และ N-acetyl-D-glucosamine (acetylation unit) ซึ่งพบในเปลือกกุ้ง กระจงคองปู หรือแกนปลาหมึก ไคโตซานเป็นวัสดุที่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจาง ทำให้สามารถนำมาเตรียมเป็นฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้ นอกจากนี้ไคโตซานยังแสดงสมบัติที่น่าสนใจอื่นๆอีก เช่น การเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต การย่อยสลายได้ทางชีวภาพ การมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และความไม่มีพิษ^{1, 2, 3, 4} ปัจจุบันมีการรายงานการใช้ประโยชน์ของไคโตซานในรูปแบบต่างๆสำหรับอุตสาหกรรม เช่น ไคโตซานผงสำหรับการบำบัดน้ำเสีย สารเร่งการเจริญเติบโตของพืช ไหมละลาย เจลรักษาบาดแผล สารลดความอ้วน สารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และสารเติมแต่งในอาหาร เป็นต้น

ไคติน-ไคโตซานได้ถูกนำมาประยุกต์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าไคติน เนื่องจากหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยย่อยกลูโคซามีนสามารถถูกโปรโตเนตให้ประจุบวกในสภาวะที่เป็นกรด คณะวิจัยของ Chang⁵ ได้รายงานการนำไคโตซานไปผสมกับเต้าหู้ สารละลายไคโตซานถูกเตรียมในกรดน้ำส้มเข้มข้น 5% จากนั้นนำไปผสมกับนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมไคโตซานลงในเต้าหู้ สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้จากปกติ 5 วัน เป็นนานถึง 7-13 วัน นอกจากนี้ยังรายงานว่า การใช้ไคโตซานที่มี %DD สูง สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าไคโตซานที่มี %DD ต่ำ เนื่องจากไคโตซานที่มี %DD สูงมีจำนวนประจุบวกมากกว่า ซึ่งประจุบวกนี้จะทำหน้าที่ไปจับกับประจุลบของผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตามสารละลายไคโตซานในกรดอินทรีย์เจือจางมีความหนืดค่อนข้างสูง ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในลำไส้ของสัตว์ส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในร่างกายมนุษย์ ไม่สามารถผลิตเอนไซม์จำพวกไคตินเนสและไคโตซานเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคตินและไคโตซานโดยตรง ทำให้ร่างกายไม่สามารถย่อยสลายไคโตซานมวลโมเลกุลสูงและดูดซึมต่อไปได้ ดังนั้นการใช้ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ออลิโกไคโตซาน (มวลโมเลกุลระดับ $10^3 \sim 10^4$ Dalton) และไคโตซานที่สามารถกระจายตัวหรือแขวนลอยในน้ำจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

เนื้อหางานวิจัยในบทนี้กล่าวถึงการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่เตรียมได้จากโครงการวิจัยมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารเติมแต่งเพื่อเพิ่มคุณค่า และรักษาคุณภาพอาหาร หรือสารถนอมอาหาร โดยอาหารต้นแบบที่เลือกใช้คือ ถั่วกวนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการทำ

ไส้ขนมไทยประเภทต่างๆ เช่น ขนมไหว้พระจันทร์และขนมเปี๊ยะ เป็นต้น ถั่วกวนมีถั่วและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก การบรรจุหรือหีบห่อถั่วกวนจะทำในถุงพลาสติกทั่วไปซึ่งปิดผนึกในระบบสุญญากาศ ถั่วกวนที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิตู้เย็นได้นาน 6-12 เดือน อย่างไรก็ตามเมื่อเปิดถุงใช้แล้วไม่สามารถเก็บถั่วกวนไว้ได้นาน ผลผลิตนี้มักเสื่อมเสียโดยเชื้อรา ดังนั้นคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าการผสมวัสดุโคติน-โคโตซานกับถั่วกวนจะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาถั่วกวนให้นานขึ้นได้ วัสดุโคติน-โคโตซานต้นแบบที่เลือกใช้สำหรับงานวิจัยในบทนี้คือ ออลิโกโคโตซาน โคตินวิสเกอร์และโคโตซานวิสเกอร์ เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีหมู่อะมิโนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างและเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็ก

7.2 วิธีการทดลอง

7.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ผสมตัวอย่างถั่วกวนกับอนุพันธ์โคติน-โคโตซาน ได้แก่ ออลิโกโคโตซาน โคตินวิสเกอร์และโคโตซานวิสเกอร์ ในรูปแบบผงแห้ง (ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก) จากนั้นเก็บใส่ถุงใสพอลิโพรไพลีนสำหรับตัวอย่างชุดควบคุมก็เตรียมโดยวิธีเดียวกัน แต่ไม่เติมสารโคติน-โคโตซาน

7.2.2 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา

7.2.2.1 การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มีดังนี้ Standard plate count agar (PCA) สารละลายเปปโตน (peptone water) เข้มข้น 0.1% แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) ไมโครปิเปต (micropipet) และทิป (tip)

7.2.2.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหาร standard plate count agar (PCA) ปริมาณ 23.5 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียสลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15-20 มิลลิลิตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วจึงเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะคว่ำลง (อาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมก่อนทำการทดลอง 1 วัน)

7.2.2.1.2 การเตรียมตัวอย่างและการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างถั่วกวนปริมาณ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเทสารละลายสารละลายเปปโตนเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10) ลงในถุง แล้วนำไปตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสมอาหาร Stomacher (BagMixer® 400) ด้วยความเร็วสูง นาน 3 นาที จะได้

ตัวอย่างที่ผสมเข้ากันและมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นลดลงเรื่อยๆ ครั้งละ 10 เท่า (10^{-2} , 10^{-3} , ...) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธี spread plate ซึ่งมีหลักการโดยย่อดังนี้ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มาผึ่งผิวหน้าให้แห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจายเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ ได้แก่ 10^{-2} 10^{-3} จนถึง 10^{-5} ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกัน การทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ โดยเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี

7.2.2.2 การตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลองนี้มีดังนี้ Potato dextrose agar (PDA) สารละลายเปปโตเนเข้มข้น 0.1% แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) ถูงพลาสติกปราศจากเชื้อ เครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) ไมโครปิเปต (micropipet) ทิป (tip) และสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เข้มข้น 10% (ฆ่าเชื้อแล้วและเก็บในตู้เย็น)

7.2.2.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหาร PDA ปริมาณ 39 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) เข้มข้น 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 15 - 20 มิลลิลิตร รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้วจึงเก็บจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้เย็น (อาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมก่อนทำการทดลอง 1 วัน)

7.2.2.2.2 การเตรียมตัวอย่างและการตรวจสอบปริมาณยีสต์และรา

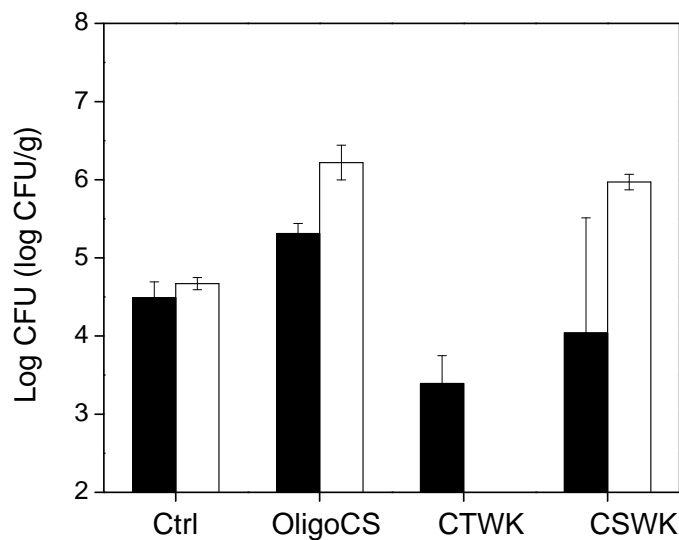
การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราทำเช่นเดียวกับกรณีของการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (ดู 7.2.2.1.2)

จำนวนยีสต์และราวิเคราะห์โดยวิธี spread plate ซึ่งมีหลักการโดยย่อดังนี้ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้มาผึ่งผิวหน้าให้แห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader) กระจายเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ ได้แก่ 10^{-2} 10^{-3} จนถึง 10^{-5} ก็ทำการทดลองเช่นเดียวกัน การทดลองแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 3

ซ้ำ จากนั้นนำงานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีบนงานเพาะเชื้อโดยเลือกงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี

7.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

สำหรับการศึกษาเบื้องต้นได้เลือกถั่วกวนเป็นอาหารต้นแบบ เนื่องจากมีแป้ง โปรตีนจากถั่ว และน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ถั่วกวนเป็นส่วนประกอบหลักของขนมไทยส่วนใหญ่ เช่น ขนมเปียะ ทำให้ขนมมีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้นประมาณ 5 วัน ในการทดลองได้เลือกใช้ออลิโกไซโตซาน ไคตินวิสเกอร์ และไคโตซานวิสเกอร์ ในรูปแบบผง เป็นสารเติมแต่งเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาถั่วกวน เนื่องจากสารไคติน-ไคโตซานทั้ง 3 ชนิดเหมาะสำหรับอาหารที่ไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง



รูปที่ 7.1 Total Viable Bacterial counts (log CFU/g) ของตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆที่ความเข้มข้น 0.5% (w/w) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ: ■:2 วัน และ □:3 วัน

จากการทดลองซึ่งได้ติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราของตัวอย่างถั่วกวนที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าในวันแรกของการทดลองไม่พบเชื้อแบคทีเรีย ใดๆก็ตามในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างควบคุมมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ประมาณ 4.5 log CFU/g (รูปที่ 7.1 และ รูปที่ 7.2(a)) ในขณะที่ตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมออลิโกไซโตซานมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าตัวอย่างควบคุมประมาณ 1 log CFU/g ในทางตรงกันข้ามปริมาณแบคทีเรียที่เจริญในตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมไคตินวิสเกอร์และไคโตซานวิสเกอร์น้อยกว่ากรณีของตัวอย่างควบคุมประมาณ 1-1.5 log CFU/g และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างถั่วกวนพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อราและยีสต์ในทุกตัวอย่าง (ข้อมูลไม่แสดง)

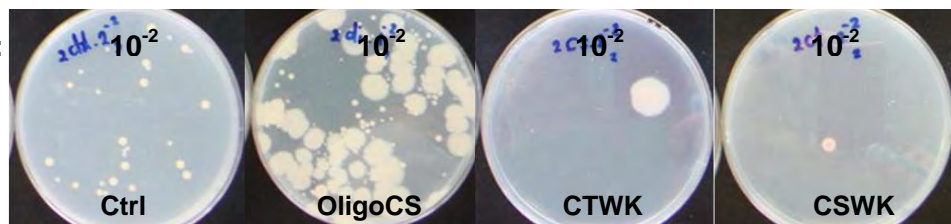
เมื่อพิจารณาตัวอย่างถั่วกวนที่ผ่านการเก็บรักษาในวันที่ 3 พบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเพิ่มขึ้น ยกเว้นตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมไคตินวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดี ในขณะที่ตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมอลิโกไคโตซานและไคโตซานวิสเกอร์มีปริมาณแบคทีเรียที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 7.1 และ รูปที่ 7.2 (b)) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างถั่วกวนพบว่ามียีสต์และราเกิดขึ้นในตัวอย่างชุดควบคุมและตัวอย่างที่ผสมสารไคโตซานวิสเกอร์ (รูปที่ 7.3(a))

ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาตัวอย่างถั่วกวนพบว่ามียีสต์และราเกิดขึ้นสำหรับตัวอย่างถั่วกวนทุกประเภท ยกเว้นตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมไคตินวิสเกอร์ โดยราที่พบมีลักษณะปุย สีขาว เกาะกลุ่มรวมตัวกัน ดังรูปที่ 7.4 ดังนั้นจึงยุติการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และราของตัวอย่างถั่วกวนชุดควบคุมและตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมอลิโกไคโตซานและไคโตซานวิสเกอร์ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมไคตินวิสเกอร์เมื่อทำการทดสอบต่อในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา พบว่ามีการเจริญของยีสต์และราเช่นกัน ดังรูปที่ 7.4

จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถสรุปได้ว่าไคตินวิสเกอร์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และราของถั่วกวนได้ โดยยีสต์อายุการเก็บรักษาของถั่วกวนได้นานขึ้น 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

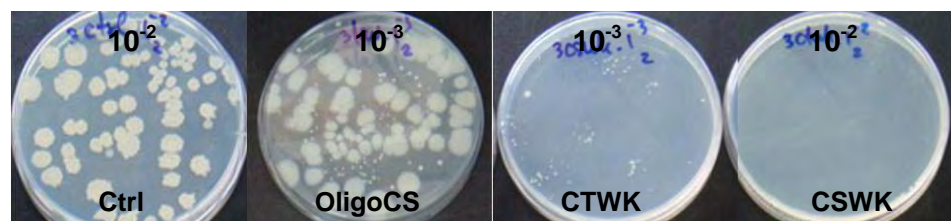
Day2

Dilution:



Day3

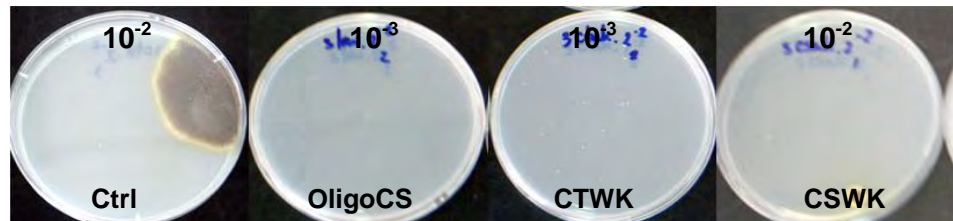
Dilution:



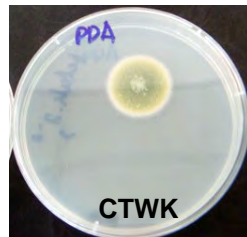
รูปที่ 7.2 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างถั่วกวนชุดควบคุมและชุดที่มีการเติมสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ

Day3

Dilution:

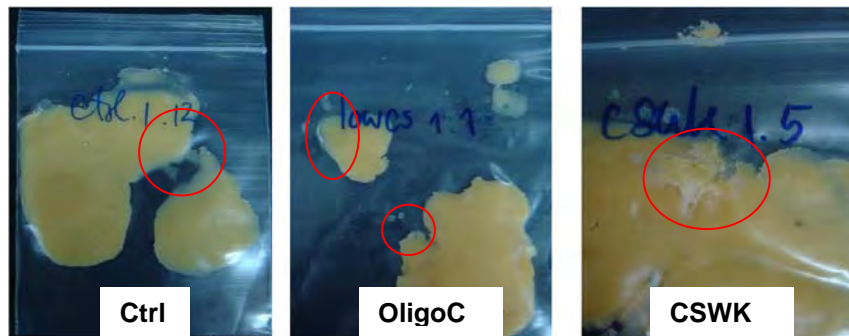


Day4



รูปที่ 7.3 ยีสต์และราที่เจริญในตัวอย่าง ภายหลังการบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างถั่วกวนชุกควบคุมและชุดที่มีการเติมสารไคติน-โคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ

Day4



Day5



รูปที่ 7.4 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างถั่วกวนที่ผสมสารไคติน-โคโตซานชนิดต่างๆ (0.5% (w/w)) ที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างๆ

7.4 สรุปการทดลอง

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สารไคติน-ไคโตซาน (ในรูปของออลิโกไคโตซาน ไคตินวิสเกอร์ และไคโตซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ถั่วกวนที่มีแป้งและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักนั้น พบว่าไคตินวิสเกอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ total viable bacteria และยีสต์ราได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาถั่วกวนที่อุณหภูมิห้องได้นานขึ้น 1 วัน อย่างไรก็ตามหลังจากวันที่ 5 ของการเก็บรักษาพบว่ามีการขึ้นราเกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการทดลองอาจเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างถั่วกวน

7.5 เอกสารอ้างอิง

1. Rao, S.B.; and Sharma, C.P. Journal of Biomedical Materials Research 1997, 34, 21-28.
2. Richardson, S.C.; Kolbe, H.V.; and Duncan, R. International Journal of pharmaceutics 1999, 175(2), 231-243.
3. Yamamoto, H.; and Amaike, M. Macromolecules 1997, 30(13), 3936-3937.
4. Tomihata, K.; and Ikada, Y. Biomaterials 1997, 18, 567-575.
5. Chang, K.L.B.; Lin, Y.-S.; and Chen, R.H. Journal of Food Engineering 2003, 57, 315-319.

บทที่ 8

การพัฒนาคุณภาพของกุ้งทะเลด้วยสารแขวนลอยระบบน้ำของนาโนไคโตซานวิสเกอร์
 Quality improvement of Pacific white shrimp by water-based nano-chitosan whiskers

8.1 บทนำ

ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลสามารถเสื่อมเสียคุณภาพได้ง่ายในระหว่างขั้นตอนการขนส่งและการเก็บรักษา ปัจจุบันสารเติมแต่งจำนวนมากได้ถูกนำมาใช้เพื่อรักษาคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษา นอกจากนี้ การควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ คุณลักษณะทางกายภาพ และการควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของอาหารทะเล อาทิเช่น เนื้อสัมผัส (texture) รวมถึงโครงสร้างภายใน (microstructure) สี และความสามารถในการอุ้มน้ำ ที่เกี่ยวเนื่องกับน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมด้วย¹ โดยทั่วไปเกลืออนินทรีย์ เช่น เกลือฟอสเฟต ได้ถูกใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อ สัตว์ปีก และอาหารทะเล เพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหาร เช่น การอุ้มน้ำ และ น้ำหนักหลังประกอบอาหาร (cooking yield)^{2,3} อย่างไรก็ตามการใช้เกลือฟอสเฟตอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของเนื้อสัมผัส เช่น ความใสและนิ่มของผลิตภัณฑ์ ปัจจุบันผู้บริโภคใส่ใจสุขภาพมากขึ้น ดังนั้นผลิตภัณฑ์หรือสารเติมแต่งที่มาจากธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสนใจมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบมาจากสารสังเคราะห์

ไคติน-ไคโตซานเป็นสารสกัดที่ได้จากเปลือกกุ้ง กระจดปู และแกนปลาหมึก⁴ ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติ จึงไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม ไคติน-ไคโตซานสามารถนำไปประยุกต์ได้ในหลายอุตสาหกรรม รวมทั้งเกษตรกรรม การแพทย์ คอสมेटิกส์ และอาหาร ไคติน-ไคโตซานได้ถูกนำมาใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เช่น เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา⁵ ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานมีประจุบวกของหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของหน่วยกลูโคซามีนเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ไคโตซานจึงแสดงคุณสมบัติพิเศษที่หลากหลาย Tsai และคณะ⁶ ได้รายงานการใช้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 1% ในกรดไฮโดรคลอริก ในการแช่เนื้อปลาแซลมอล เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาจาก 5 วัน เป็น 9 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คณะวิจัยของ Soultos⁷ (2008) พบว่าสารละลายผสมของไคโตซานเข้มข้น 0.5% ถึง 1% และไนเตรท สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และ รา ในไส้กรอกหมู และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานถึง 28 วัน ภายใต้อุณหภูมิที่เย็น

อย่างไรก็ตามไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายทั่วไปได้ ในขณะที่ไคโตซานสามารถละลายได้ในตัวทำละลายกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก เป็นต้น ซึ่งเป็นผลมาจากการรับโปรตอนหรือการถูกโปรตอนของหมู่อะมิโน ($-NH_2$) เกิดเป็นเกลือแอมโมเนียม ($-NH_3^+ \dots OOC-R$) ซึ่งไปขัดขวางการเกิดพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างสาย

โซไฟลิเมอร์ เมื่อพันธะดังกล่าวลดลง การละลายของไคโตซานจึงดีขึ้น แม้ว่าไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ แต่การประยุกต์หรือการใช้ประโยชน์ของสารละลายไคโตซานในกรดอินทรีย์สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเวชภัณฑ์นั้นยังมีข้อจำกัด ทั้งในเรื่องของกลิ่น รสชาติ และอาการแพ้ เป็นต้น นอกจากนี้สารละลายไคโตซานในตัวทำละลายกรดอินทรีย์เจือจางยังมีความหนืดสูงอีกด้วย จึงส่งผลต่อการใช้งาน ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาไคโตซานให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน (carboxymethyl chitosan)⁸ ไอโอดิไคโตซาน (iodo chitosan)⁹ ตติยภูมิ-อะมิโนไคโตซาน (tert-amino chitosan)¹⁰ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาไคโตซานในรูปอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ ต้องผ่านขั้นตอนการดัดแปร โครงสร้างทางเคมี ซึ่งจำเป็นต้องมีการระบุรายละเอียดในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อความปลอดภัย ในอดีตที่ผ่านมา กลุ่มวิจัยของสุวบุญ ได้ประสบความสำเร็จในการเตรียมไคโตซานในรูปแบบเส้นใยวิสเกอร์¹¹ ซึ่งมีขนาดในระดับนาโนเมตร ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ โดยสามารถเตรียมได้จากเส้นใยไคตินวิสเกอร์¹² ด้วยขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน จากมุมมองดังกล่าว นำไปสู่การประยุกต์ใช้ไคโตซานวิสเกอร์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยไคโตซานวิสเกอร์ที่ใช้จะแขวนลอยในน้ำและปราศจากการดัดแปรโครงสร้างทางเคมี ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ว่าไคโตซานวิสเกอร์สามารถแสดงสมบัติพิเศษในการใช้งานด้านอาหารได้หรือไม่

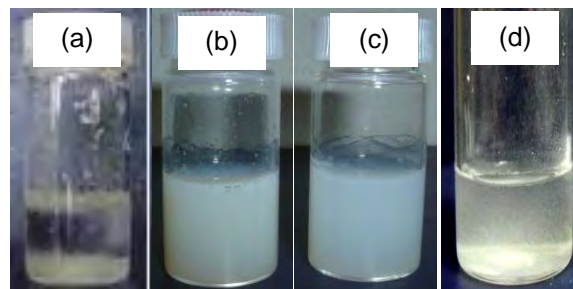
เนื้อหางานวิจัยในบทนี้จึงกล่าวถึงการใส่สารไคติน-ไคโตซานหรืออนุพันธ์ในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถละลายน้ำหรือแขวนลอยในน้ำได้ เป็นสารเติมแต่งในอาหารทะเล โดยใช้กุ้งขาว (Pacific white shrimp) เป็นอาหารทะเลต้นแบบในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของอนุพันธ์ไคติน-ไคโตซาน

8.2 วิธีการทดลอง

8.2.1 การทรีทตัวอย่างกุ้งขาวด้วยสารไคติน-ไคโตซานในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำ

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่ใช้ในการทดลอง (ขนาด 40 ตัวต่อกิโลกรัม) ถูกเก็บรักษาขณะขนส่งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นถูกแกะเปลือกและผ่าหลัง ก่อนนำไปทรีทด้วยสารตัวอย่าง โดยในขั้นตอนแรกได้ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แซ่กุ้งขาว ในสารแขวนลอยนาโนไคตินวิสเกอร์ (CTWK) นาโนไคโตซานวิสเกอร์ (CSWK) และ ออลิโกไคติน/ไคโตซาน (OligoCS) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05% (w/v) ในระบบที่ไม่มีเกลือและมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเลือกระบบที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) และ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) ควบคู่กับเนื้อสัมผัสของตัวอย่าง จากนั้นผันแปรความเข้มข้นของสารแขวนลอยตัวอย่าง 4 ระดับ คือ 0.01%, 0.05%, 0.25% และ 0.5% (w/v) เลือกระบบที่ดีที่สุดโดยพิจารณาเช่นเดียวกับข้างต้นแล้วผันแปรความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนต 3 ระดับ คือ 1% 3%

และ 5% (w/v) โดยควบคุม pH ของระบบให้เท่ากับ 6, 7 และ 8 ตามลำดับ การปรับ pH ทำโดยใช้ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล



รูปที่ 8.1 ลักษณะทางกายภาพของสารแขวนลอยในน้ำของ (a) เกร็ดโคโตซาน (b) โคตินวิสเกอร์ (c) โคโตซานวิสเกอร์ และ (d) ออลิโกโคโตซาน

8.2.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของกึ่งที่ทรีทด้วยสารโคติน-โคโตซาน

สมบัติทางกายภาพของกึ่ง ได้แก่ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ถูกตรวจสอบดังนี้ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$\text{Weight gain (\%)} = [(B - A) / A] \times 100 \% \quad (1)$$

เมื่อ A คือน้ำหนักของกึ่งก่อนแช่ในสารแขวนลอยของตัวอย่าง และ B คือน้ำหนักของกึ่งหลังแช่ในสารแขวนลอยของตัวอย่างแล้วผึ่งแห้งเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยของตัวอย่างถูกนำไปผ่านความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที และตามด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที และผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\text{Cooking loss (\%)} = [(B - C) / B] \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Cooking yield (\%)} = (C / A) \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ A คือน้ำหนักของกึ่งก่อนแช่ในสารแขวนลอยของตัวอย่าง และ B คือน้ำหนักของกึ่งหลังแช่ในสารแขวนลอยของตัวอย่างแล้วผึ่งแห้งเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ C คือน้ำหนักของกึ่งหลังผ่านความร้อนและตามด้วยการแช่ในน้ำแข็ง

8.2.3 การติดตามการแพร่ผ่านของไคโตซานวิสเกอร์ภายในโครงสร้างกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้ง

ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ จะถูกแช่ต่อในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการแพร่ผ่านของไคโตซานวิสเกอร์ในกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด รุ่น Hitachi SEM (TM1000) scanning electron microscopy/ (SEM-EDX) ภายใต้อัตราเร่ง 30 kV

8.2.4 การตรวจสอบคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้งที่ทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซาน

คุณลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) ของตัวอย่างกุ้ง ตรวจสอบโดยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (texture analyzer) รุ่น TA-XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, England) โดยใช้หัวทดสอบชนิด Warner-Bratzler shear apparatus¹³ ซึ่งมีสถานะการทดสอบดังนี้ load cell ขนาด 25 กิโลกรัม ความเร็วของหัวทดสอบเท่ากับ 2 มิลลิเมตรต่อวินาที การทดสอบทำตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยทดสอบในทิศทางเคลื่อนที่ของหัวทดสอบตั้งฉากกับกล้ามเนื้อโปรตีน

8.2.5 การตรวจสอบเสถียรภาพทางความร้อนของกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้งที่ทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซาน

เสถียรภาพทางความร้อนของตัวอย่างกุ้งตรวจสอบได้โดยเครื่องวิเคราะห์ทางความร้อน (Thermal gravimetric analyzer) รุ่น Perkin Elmer Pyris Diamond ภายใต้สภาวะบรรยากาศไนโตรเจน ที่มีอัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจนเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ในช่วงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถึง 600 องศาเซลเซียส

8.2.6 การตรวจสอบสีของกุ้งที่ผ่านการทรีทด้วยสารไคติน-ไคโตซานและผ่านความร้อน

สีของตัวอย่างกุ้ง ซึ่งแสดงผลโดยค่า L* (ค่าความสว่าง) a* (ค่าสีแดง/เขียว) และ b*(ค่าสีเหลือง/น้ำเงิน) ตรวจสอบโดยเครื่องวัดสี chromameter (รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta Co.Ltd., Japan) การทดลองทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ค่าความแตกต่างของสี (Delta E*) จะคำนวณจากสมการที่ (4) โดยเทียบกับตัวอย่างควบคุม

$$\text{Delta } E^* = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad (4)$$

8.2.7 การวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีนในกุ้ง

โครงสร้างของโปรตีนในตัวอย่างกุ้งสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคการแยกสารแบบอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) โดย

ใช้ 4% stacking gel และ 12.5% separating gel ตามเทคนิคของ Laemmli (1970)¹⁴ ตัวอย่างโปรตีนเตรียมได้จากการผสมสารแขวนลอยที่ผ่านการแช่ตัวอย่างกึ่งปริมาตร 20 mL กับสารละลาย SDS เข้มข้น 10% w/v ปริมาตร 10 mL แล้วปั่นจนเป็นอิมัลชันโดยเครื่อง homogenizer รุ่น IKA labortechnik homogenizer จากนั้นบ่มสารผสมในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกสาร นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์โดยเทคนิคการแยกสาร จากนั้นย้อมสีเจลโดยใช้ coomassie blue R-250 ในสารละลายผสมของกรดอะเซติก (10%) เมทาบอล (40%) และน้ำ (50%) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำได้โดยใช้ซอฟต์แวร์ UN-SCAN-IT Gel digitizing software Ver.6.1 (Silk Scientific Corp., Orem, UT)¹⁵ โดยวิเคราะห์จากผลรวมของจำนวนพิกเซลของแถบโปรตีน ซึ่งมีค่าเท่ากับผลรวมของจำนวนโปรตีน

8.2.8 การวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค (microstructure) ของตัวอย่างกึ่ง

โครงสร้างระดับจุลภาคของตัวอย่างกึ่งตรวจสอบที่ข้อปล้องของกึ่งตำแหน่งที่ 2 เตรียมข้อปล้องตำแหน่งที่ 2 ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการทรีตด้วยสารไคติน-ไคโตซานให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร × 4 มิลลิเมตร × 4 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำที่ไม่มีประจุ ตามด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นตั้งแต่ 50% ถึง 100% จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เทคนิค super critical fluid แล้วตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกึ่งโดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด รุ่น Hitachi SEM S-4800 ultra-high resolution cold field emission scanning electron microscope (FE-SEM)

8.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

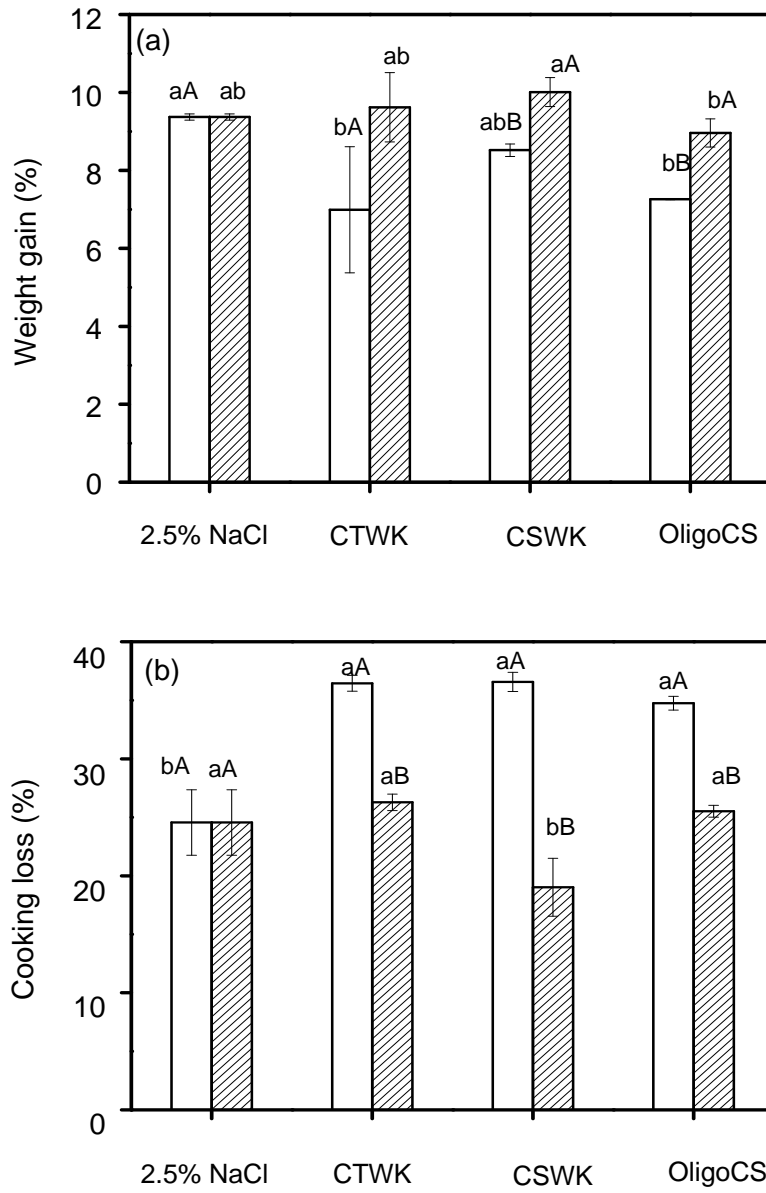
8.3.1 ผลของชนิดสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำต่อคุณภาพของกึ่ง

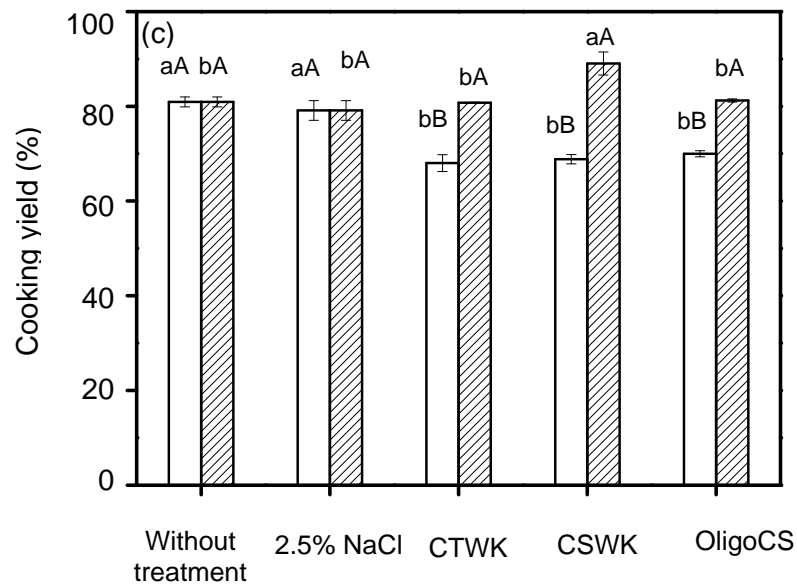
ในการทดลองนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของชนิดสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำต่อคุณภาพของกึ่ง ซึ่งประเมินจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของกึ่ง การศึกษาอิทธิพลดังกล่าวทำในระบบที่แตกต่างกัน 2 ระบบ คือ ระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% และระบบที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 8.2 โดยทั่วไปการเพิ่มคุณภาพกึ่ง เช่น น้ำหนักตัว สามารถทำได้โดยการแช่ในสารละลายเกลือ จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ~ 9.4% ในขณะที่ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และอลิโกไคโตซาน ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05% (w/v) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินและไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5%) มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น

~ 9.5% และ 10.1% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากรณีของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไคตินวิสเกอร์และไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักของตัวอย่างกุ้งได้

รูปที่ 8.2(b) และ 8.2(c) แสดงถึงน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนและน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการทรีตด้วยสารตัวอย่างชนิดต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนและน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 25% และ 82% ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซานนั้น มีน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนเพิ่มขึ้น (ประมาณ 34.8-36.5%) และมีน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนลดลง (ประมาณ 68.0-70.0%) เมื่อเทียบกับตัวอย่างตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซานยังมีประสิทธิภาพไม่ดีพอในการปรับปรุงคุณภาพทางด้านน้ำหนักของกุ้ง ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาการปรับปรุงประสิทธิภาพของสารไคติน-ไคโตซานในระบบที่มีการเติมเกลือร่วมด้วย

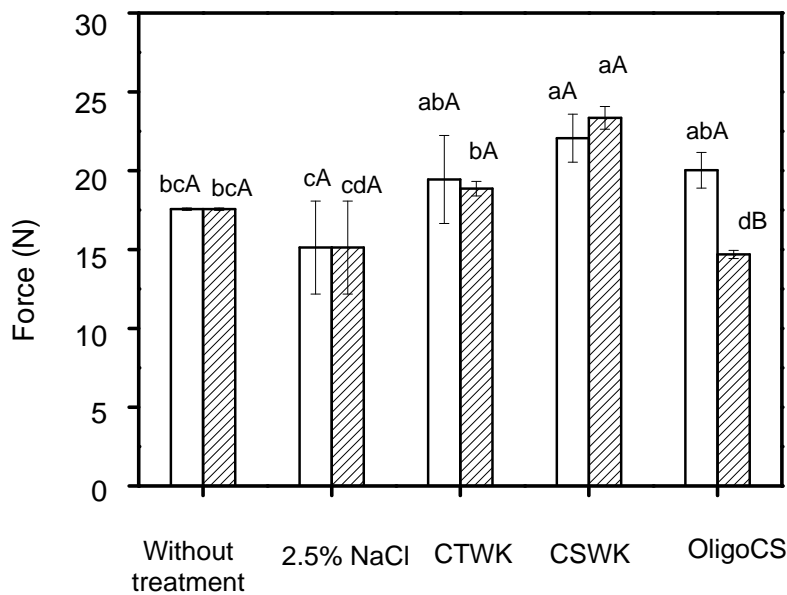
จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซานในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% ลดลง เมื่อเทียบกับระบบที่ไม่มีเกลือ และตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซานในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ยังมีน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนเพิ่มขึ้นอีกด้วย เมื่อเทียบกับระบบที่ไม่มีเกลือ และมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างกุ้งที่ไม่ได้ผ่านการแช่สาร (ประมาณ 80.0%) อย่างไรก็ตามระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีการเติมเกลือสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวอย่างกุ้งได้มากที่สุด คณะวิจัยของ Sathivel¹⁶ ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ไคโตซานเป็นสารเคลือบที่สามารถบริโภคได้ (edible coating) เช่น สารละลายไคโตซานในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1-2 % สำหรับแช่เนื้อปลาฟุ้งแชลล์แชลล์แชลล์ฟิล์มเคลือบของไคโตซานสามารถป้องกันการสูญเสียความชื้นและช่วยรักษาสีสรรของปลาหลังผ่านการให้ความร้อนได้ เมื่อพิจารณากรณีของไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือพบว่าผลที่ได้เป็นการเสริมประสิทธิภาพ (synergistic effect) ในแง่ของการเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน โดยทั่วไปโมเลกุลของน้ำในกล้ามเนื้อโปรตีนของกุ้งจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน¹⁷ ดังนั้นการสูญเสียของน้ำอาจเกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนระหว่างกระบวนการให้ความร้อน¹⁸ นอกจากนี้ไอออนคลอไรด์ในเกลือโซเดียมคลอไรด์ยังสามารถช่วยเพิ่มการบวมตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อโปรตีน และสามารถช่วยการเพิ่มความสามารถในการเก็บกักน้ำ (water holding capacity)¹⁹





รูปที่ 8.2 (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และออลิโกไคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% (w/v) ในระบบที่ไม่มี (□) และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (▨) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ

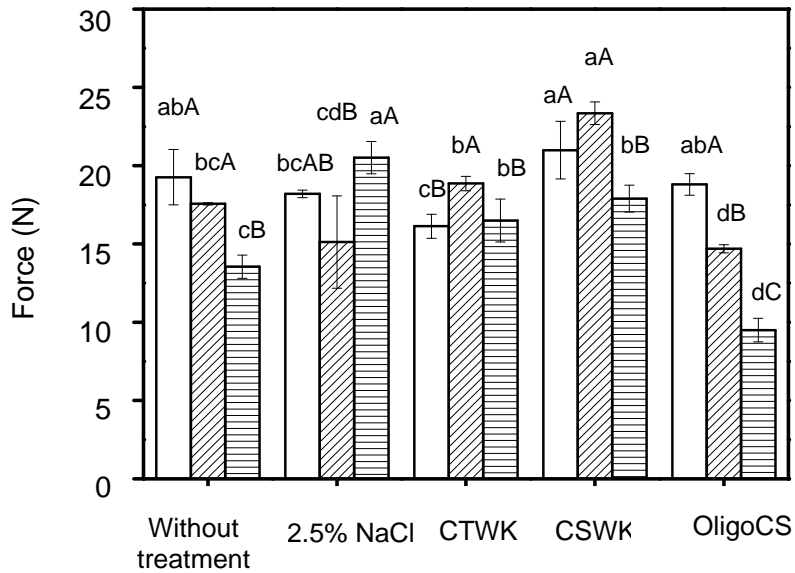
ลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างเนื้อกึ่ง เช่น ความแน่น สามารถวิเคราะห์ได้โดยพิจารณาจากค่าแรงเฉือน (shear force) ของตัวอย่างที่ผ่านการการแช่ในสารไคติน-ไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 8.3) จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคตินวิสเกอร์และไคโตซานวิสเกอร์หลังผ่านความร้อนมีแรงเฉือนที่ใกล้เคียงกัน แต่ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยออลิโกไคโตซานในระบบที่มีเกลือมีค่าแรงเฉือนต่ำกว่า (~14.7 N) ซึ่งอาจเกิดจากกรดแลคติกในขั้นตอนการเตรียมออลิโกไคโตซานมีผลต่อโครงสร้างโปรตีนของกึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Sims และ Bailey²⁰ ที่รายงานเกี่ยวกับผลของกรดทำให้คอลลาเจนในเนื้อสัตว์มีโครงสร้างที่หลวมขึ้น



รูปที่ 8.3 ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยโคตินวิสเกอร์ โคโตซาน วิสเกอร์ และออลิโกโคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% (w/v) ในระบบที่ไม่มี (□) และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (▨) ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ

นอกจากนี้ปัจจัยทางด้านคุณภาพ เช่น เนื้อสัมผัสและสี ที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารโคติน-โคโตซานชนิดต่างๆ ในช่วง 48 ชั่วโมง ในระบบที่มีเกลือ ตัวอย่างกุ้งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.3-6.5 จากรูปที่ 8.4 พบว่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งที่ไม่ผ่านการทรีทหรือแช่สารมีค่าลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (เช่น จาก ~19 N เป็น 13.5 N เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเท่ากับ 48 ชั่วโมง) นอกจากนี้ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยออลิโกโคโตซาน ก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัด จาก ~18.8 N เป็น 9.50 N เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเท่ากับ 48 ชั่วโมง และการลดลงของค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยออลิโกโคโตซานมากกว่ากรณีของตัวอย่างกุ้งที่ไม่ผ่านการทรีทอีกด้วย ในทางตรงกันข้ามสารแขวนลอยโคตินวิสเกอร์และโคโตซานวิสเกอร์สามารถช่วยรักษาเนื้อสัมผัสของตัวอย่างกุ้งในระหว่างการเก็บรักษาได้ อีกทั้งยังช่วยรักษาเนื้อสัมผัสให้ใกล้เคียงกับกุ้งที่ไม่ผ่านการแช่สารที่วันแรกของการเก็บรักษาอีกด้วย นอกจากนี้ผลที่ได้จากการตรวจสอบค่าสีของตัวอย่างกุ้ง (L^* , a^* , b^* และ ΔE^*) สามารถยืนยันได้ว่า สารโคตินวิสเกอร์และโคโตซานวิสเกอร์สามารถช่วยรักษาสีของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านความร้อน ในทางตรงกันข้าม ถึงแม้ว่ากุ้งที่ผ่านการแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่ค่าความสว่าง (L^*) ของตัวอย่างกุ้งลดลง ในขณะที่ค่าสีแดง (a^*)

และค่าความแตกต่างของสถิติ (Delta E*) เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแช่ตัวอย่างกุ้งในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลต่อคุณภาพสีของกุ้ง ดังแสดงในตารางที่ 8.1



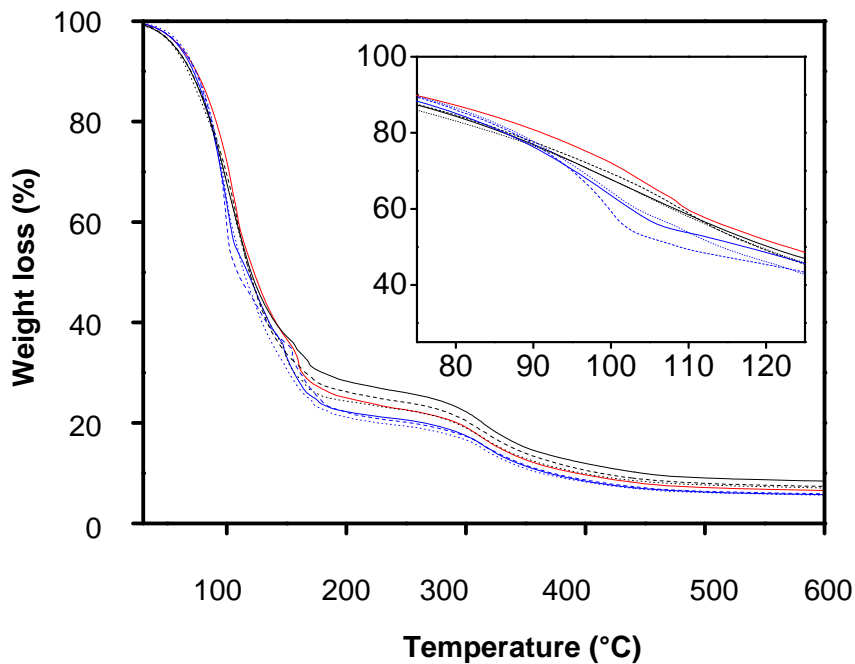
รูปที่ 8.4 ค่าแรงเนียนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยโคตินวิสเกอร์ โคโตซาน วิสเกอร์ และออลิโกโคโตซาน ความเข้มข้น 0.05% (w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 0-48 ชั่วโมง □ : 0 ชั่วโมง ▨ : 24 ชั่วโมง และ ▩ : 48 ชั่วโมง ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ

ตารางที่ 8.1 ค่าสี L* a* b* และ delta E ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแวนิลอยโคติน-ไปโตซาน ระหว่างการเก็บรักษา 48 ชั่วโมง

Samples	L			a*			b*			Delta E		
	0 hrs	24 hrs	48 hrs	0 hrs	24 hrs	48 hrs	0 hrs	24 hrs	48 hrs	0 hrs	24 hrs	48 hrs
front												
No treatment	72.43 ± 1.80 ^{aA}	73.14 ± 2.13 ^{aA}	72.69 ± 2.92 ^{aA}	4.93 ± 0.90 ^{bA}	3.30 ± 1.24 ^{aA}	6.41 ± 3.68 ^{aA}	10.88 ± 2.48 ^{aA}	11.57 ± 2.68 ^{aA}	11.06 ± 4.47 ^{aA}	-	3.35 ± 1.37 ^{aA}	5.13 ± 2.45 ^{aA}
2.5%NaCl	67.47 ± 3.72 ^{bA}	69.58 ± 5.31 ^{aA}	70.03 ± 3.49 ^{aA}	12.31 ± 5.67 ^{aA}	8.10 ± 7.09 ^{aA}	8.43 ± 4.02 ^{aA}	16.50 ± 5.10 ^{aA}	11.08 ± 5.10 ^{aA}	12.60 ± 3.86 ^{aA}	10.64 ± 8.26 ^{aA}	8.04 ± 5.92 ^{aA}	6.37 ± 3.74 ^{aA}
2.5%NaCH+CTWK	70.12 ± 1.94 ^{abA}	69.66 ± 1.19 ^{aA}	70.30 ± 0.71 ^{aA}	8.86 ± 1.22 ^{abA}	9.14 ± 3.77 ^{aA}	9.01 ± 0.69 ^{aA}	14.05 ± 2.54 ^{aA}	15.23 ± 4.59 ^{aA}	14.80 ± 1.33 ^{aA}	5.74 ± 2.92 ^{abA}	7.33 ± 4.75 ^{aA}	6.19 ± 0.55 ^{aA}
2.5%NaCH+CSWK	69.70 ± 3.04 ^{abA}	69.05 ± 2.65 ^{aA}	73.37 ± 1.58 ^{aA}	9.03 ± 5.09 ^{abA}	10.22 ± 6.06 ^{aA}	5.71 ± 2.96 ^{aA}	13.55 ± 4.50 ^{aA}	16.12 ± 7.47 ^{aA}	11.99 ± 5.42 ^{aA}	7.03 ± 5.34 ^{abA}	10.22 ± 6.58 ^{aA}	5.34 ± 1.37 ^{aA}
2.5%NaCH+OligoCS/Lactate	71.77 ± 0.11 ^{abA}	73.00 ± 4.26 ^{aA}	68.40 ± 5.79 ^{aA}	6.51 ± 2.45 ^{abA}	5.62 ± 3.00 ^{aA}	10.06 ± 5.76 ^{aA}	12.13 ± 2.98 ^{aA}	11.37 ± 3.50 ^{aA}	14.14 ± 4.92 ^{aA}	3.60 ± 1.49 ^{abA}	4.87 ± 2.33 ^{aA}	9.68 ± 5.50 ^{aA}
middle												
No treatment	74.54 ± 5.26 ^{aA}	72.14 ± 1.95 ^{aA}	72.99 ± 2.59 ^{aA}	3.79 ± 3.50 ^{bA}	6.43 ± 3.61 ^{aA}	5.02 ± 1.34 ^{bA}	9.61 ± 5.62 ^{aA}	13.07 ± 2.95 ^{aA}	11.32 ± 2.32 ^{aA}	-	5.70 ± 3.73 ^{aA}	3.14 ± 3.06 ^{aA}
2.5%NaCl	67.94 ± 0.26 ^{bA}	67.84 ± 1.22 ^{aA}	69.16 ± 3.09 ^{aA}	11.85 ± 0.85 ^{aA}	8.97 ± 2.78 ^{aA}	9.75 ± 3.36 ^{aA}	16.04 ± 1.21 ^{aA}	13.64 ± 3.85 ^{aA}	13.92 ± 3.32 ^{aA}	12.27 ± 1.08 ^{aA}	9.83 ± 3.35 ^{aA}	9.15 ± 5.54 ^{aA}
2.5%NaCH+CTWK	71.76 ± 2.92 ^{abA}	70.89 ± 4.02 ^{aA}	71.29 ± 1.42 ^{aA}	7.40 ± 2.21 ^{abA}	6.23 ± 4.44 ^{aA}	8.54 ± 0.59 ^{abA}	12.48 ± 3.29 ^{aA}	11.40 ± 5.55 ^{aA}	13.89 ± 1.16 ^{aA}	5.68 ± 4.39 ^{bA}	7.73 ± 3.30 ^{aA}	7.25 ± 1.39 ^{aA}
2.5%NaCH+CSWK	70.70 ± 2.33 ^{abA}	71.44 ± 3.59 ^{aA}	71.54 ± 2.58 ^{aA}	8.46 ± 1.34 ^{aA}	7.28 ± 2.05 ^{aA}	5.84 ± 2.11 ^{abA}	12.46 ± 3.07 ^{aA}	12.31 ± 1.26 ^{aA}	10.75 ± 0.83 ^{aA}	7.14 ± 2.69 ^{bA}	5.58 ± 3.94 ^{aA}	3.87 ± 3.32 ^{aA}
2.5%NaCH+OligoCS/Lactate	70.56 ± 0.79 ^{abA}	72.27 ± 2.67 ^{aA}	71.49 ± 2.73 ^{aA}	7.66 ± 2.81 ^{abA}	5.36 ± 1.00 ^{aA}	6.99 ± 2.31 ^{abA}	13.32 ± 2.34 ^{aA}	11.77 ± 1.72 ^{aA}	12.24 ± 1.08 ^{aA}	6.92 ± 3.03 ^{bA}	3.83 ± 2.76 ^{aA}	5.33 ± 3.30 ^{aA}
tail												
No treatment	70.31 ± 1.73 ^{aA}	68.19 ± 2.09 ^{aA}	70.25 ± 1.67 ^{aA}	10.78 ± 2.73 ^{aA}	12.79 ± 2.25 ^{aA}	9.74 ± 2.87 ^{bA}	14.65 ± 2.95 ^{abA}	17.76 ± 0.95 ^{aA}	14.28 ± 3.02 ^{aA}	-	4.87 ± 1.46 ^{aA}	3.36 ± 2.24 ^{aA}
2.5%NaCl	64.75 ± 2.64 ^{bA}	67.75 ± 1.46 ^{aA}	64.48 ± 3.57 ^{bA}	14.74 ± 1.28 ^{aA}	11.10 ± 0.54 ^{ab}	14.66 ± 2.49 ^{aA}	17.94 ± 2.53 ^{aA}	13.33 ± 2.98 ^{bcA}	17.74 ± 4.70 ^{aA}	7.74 ± 3.36 ^{aA}	3.62 ± 2.04 ^{aA}	8.37 ± 4.89 ^{aA}
2.5%NaCH+CTWK	67.69 ± 3.78 ^{abA}	67.10 ± 1.60 ^{aA}	68.91 ± 2.86 ^{aA}	10.55 ± 3.40 ^{aA}	12.52 ± 1.27 ^{aA}	7.50 ± 3.50 ^{bA}	14.85 ± 4.93 ^{abA}	16.60 ± 1.20 ^{abA}	11.48 ± 4.67 ^{aA}	6.33 ± 0.68 ^{aA}	4.32 ± 1.81 ^{aA}	6.36 ± 3.95 ^{aA}
2.5%NaCH+CSWK	68.30 ± 2.35 ^{abA}	68.46 ± 1.31 ^{aA}	69.06 ± 1.30 ^{aA}	10.14 ± 2.51 ^{aA}	10.87 ± 1.81 ^{aA}	11.12 ± 1.21 ^{abA}	9.51 ± 4.48 ^{bA}	14.86 ± 2.07 ^{abcA}	15.83 ± 2.64 ^{aA}	6.72 ± 3.22 ^{aA}	2.78 ± 1.70 ^{aA}	3.04 ± 0.94 ^{aA}
2.5%NaCH+OligoCS/Lactate	65.23 ± 2.01 ^{bB}	69.60 ± 1.08 ^{aA}	67.18 ± 0.72 ^{abAB}	12.52 ± 2.21 ^{aA}	7.43 ± 1.45 ^{bB}	10.22 ± 1.42 ^{abAB}	17.26 ± 2.75 ^{aA}	11.53 ± 1.62 ^{cB}	13.58 ± 2.33 ^{aAB}	6.24 ± 3.39 ^{aA}	4.68 ± 2.29 ^{aA}	4.03 ± 0.72 ^{aA}

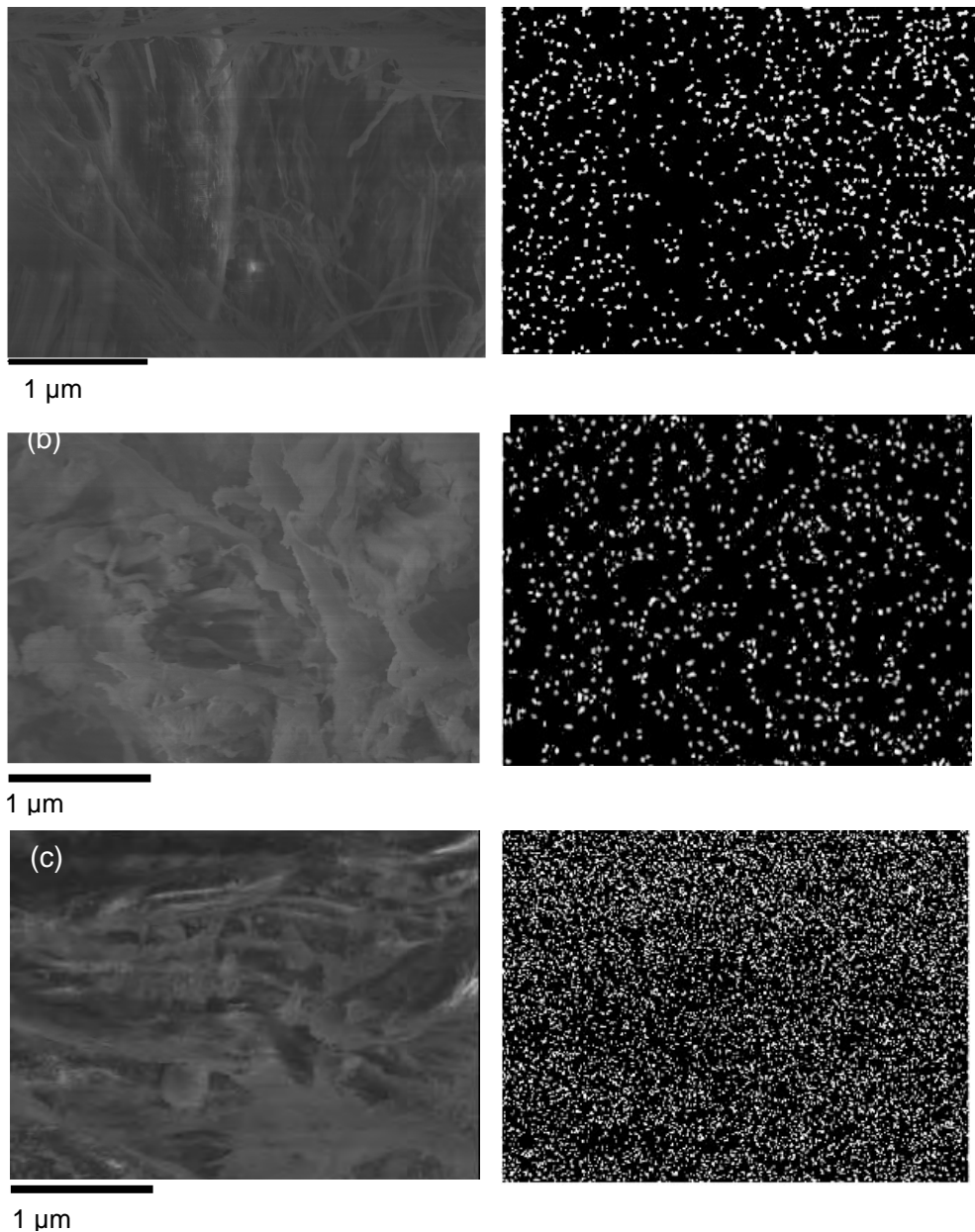
ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรพิมพ์เล็กภายในคอลัมน์เดียวกันและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ภายในแถวเดียวกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05)

การศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับความเสถียรทางความร้อนของตัวอย่างกึ่ง ซึ่งประเมินจากการสูญเสียน้ำและโปรตีนจากโครงสร้างกล้ามเนื้อกึ่ง สามารถตรวจสอบได้โดยเครื่องวิเคราะห์ทางความร้อน (TGA) จากรูปที่ 8.5 พบว่าการสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างกึ่งเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อุณหภูมิห้องจนถึงอุณหภูมิ 450 °C การสูญเสียน้ำหนักในช่วงแรกที่อุณหภูมิช่วง 90 °C ถึง 150 °C เกี่ยวข้องกับการระเหยของน้ำในตัวอย่างกึ่ง ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆในระบบที่ไม่มีเกลือ มีการสูญเสียน้ำมากกว่าตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารไคติน-ไคโตซานในระบบที่มีเกลือ แสดงให้เห็นว่าสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆในระบบที่มีเกลือแสดงผลของการเสริมประสิทธิภาพ (synergistic effect) ในแง่การป้องกันการสูญเสียน้ำ สำหรับการสูญเสียน้ำหนักในช่วงที่สองซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 320 °C อาจเกี่ยวข้องกับการเสถียรภาพขององค์ประกอบโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างกึ่ง ระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นระบบที่ดีที่สุดในการช่วยลดน้ำหนักที่สูญเสียบ้างผ่านความร้อน เพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังจากความร้อน และช่วยรักษาเนื้อสัมผัสและสีของตัวอย่างกึ่ง ดังนั้นระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีการเติมเกลือจึงถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาต่อไป (ดูหัวข้อ 8.3.2)



รูปที่ 8.5 เทอร์โมแกรม TGA ของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคติน-ไคโตซานในระบบที่มีและไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์: **—**:ชุดควบคุม **—**:CTWK เข้มข้น 0.05% **- - -**:CSWK เข้มข้น 0.05% **.....**:OligoCS เข้มข้น 0.05% **—**:CTWK เข้มข้น 0.05% ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% **- - -**:CSWK เข้มข้น 0.05% ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% และ **.....**:OligoCS เข้มข้น 0.05% ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5%

ประเด็นสำคัญอีกประเด็นหนึ่งที่ต้องศึกษา คือ การแพร่ผ่านของสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์เข้าไปในตัวอย่างกึ่ง โดยทั่วไปสารไคติน-ไคโตซานมีความสามารถในการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อน (complex) กับไอออนคอปเปอร์ ดังนั้นไอออนคอปเปอร์จึงเป็นตัวชี้วัดที่ดีสำหรับไคโตซานเมื่ออยู่ในรูปของโครงสร้างเชิงซ้อนกับไอออนคอปเปอร์



รูปที่ 8.6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM-EDX) แสดงการกระจายตัวของคอปเปอร์ในตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ของ (a) ชุดควบคุม (b) CSWK- CuSO_4 และ (c) CSWK- CuSO_4 ในระบบที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์

ในงานวิจัยนี้ ได้นำตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการทรีตด้วยสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซาน ไปแช่ในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต จากนั้นล้างสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตส่วนเกินออกก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM-EDX) ที่จะแสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของคอปเปอร์ ซึ่งสามารถระบุตำแหน่งของไคโตซานในตัวอย่างกึ่งได้ จากรูปที่ 8.6(a) และ 8.6(b) พบว่ากระจายตัวของคอปเปอร์ในตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์เกิดขึ้นดี ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าไคโตซานวิสเกอร์มีการกระจายตัวที่ดีภายในตัวอย่างกึ่ง ในทำนองเดียวกันตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือก็ให้การกระจายตัวของคอปเปอร์ที่ดีในทุกบริเวณของตัวอย่างกึ่ง (รูปที่ 8.6(c)) แสดงให้เห็นว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์สามารถช่วยเพิ่มการบวมตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อโปรตีนและช่วยให้ไคโตซานวิสเกอร์สามารถแพร่ผ่านและกระจายตัวได้ดีภายในโครงสร้างกล้ามเนื้อโปรตีนของกึ่งด้วย

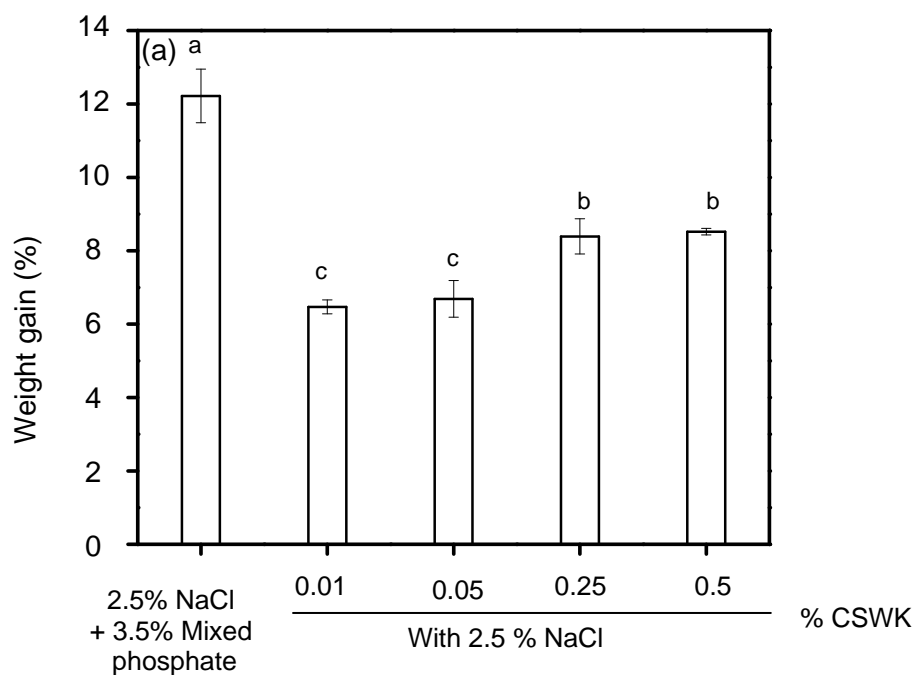
8.3.2 ผลของความเข้มข้นของไคโตซานวิสเกอร์ในระบบเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (w/v) ต่อคุณภาพของกึ่ง

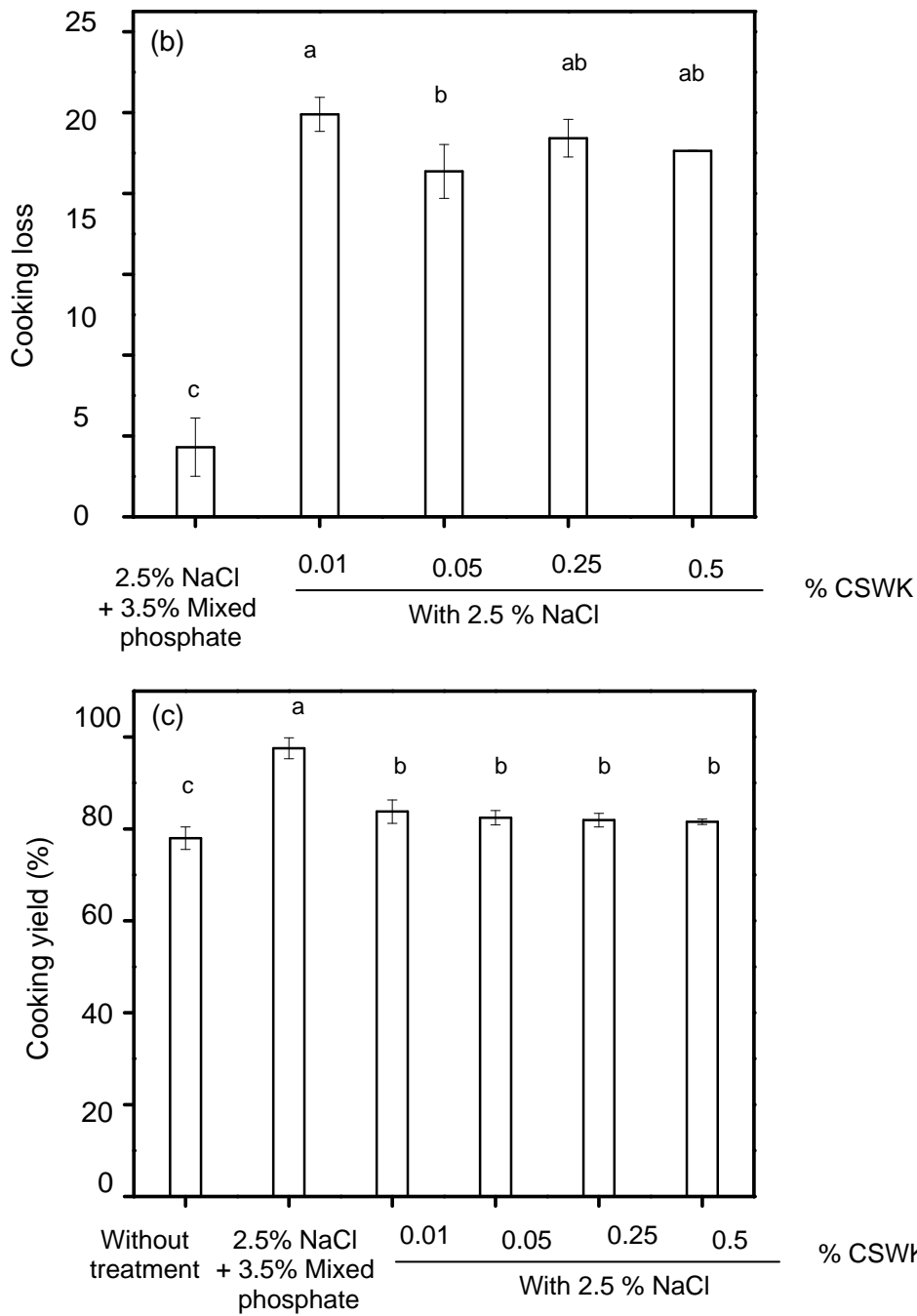
สำหรับการทดลองในหัวข้อนี้ ได้เลือกสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานที่ดีที่สุดจากการทดลองในหัวข้อ 8.3.1 มาใช้เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของสารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานต่อคุณภาพของตัวอย่างกึ่ง สารตัวอย่างไคติน-ไคโตซานที่เลือกใช้คือ ไคโตซานวิสเกอร์ ความเข้มข้นของไคโตซานวิสเกอร์ที่ศึกษามี 4 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.25 และ 0.50% และคุณภาพของตัวอย่างกึ่งพิจารณาจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปที่ 8.7 โดยทั่วไปสารพอลิฟอสเฟตนิยมใช้เป็นสารเติมแต่งที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ เพื่อช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนและลดน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน²¹ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สารฟอสเฟตเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารไคโตซานวิสเกอร์ในการปรับปรุงคุณภาพของตัวอย่างกึ่ง ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01% (w/v) และ 0.05% (w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างกึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 2% เมื่อความเข้มข้นของสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์เพิ่มขึ้นเป็น 0.25-0.50% (w/v) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ยังน้อยกว่ากรณีของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารละลายฟอสเฟตผสม (mixed phosphate) ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนและน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกึ่ง พบว่าไม่มีความแตกต่างเมื่อแช่ตัวอย่างกึ่งด้วยสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05% (w/v) ถึง 0.5% (w/v) ($P > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสาร

แขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์มากกว่ากรณีของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารละลายฟอสเฟตผสม ($P < 0.05$) ในขณะที่น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนน้อยกว่า

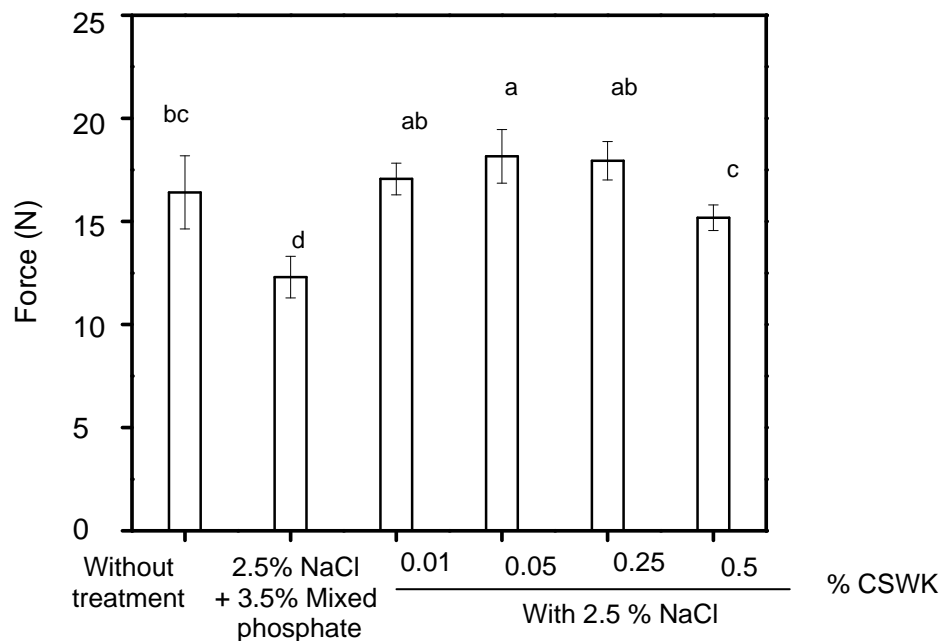
คุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกึ่งที่ผ่านการทรีทด้วยสารโคโคซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ผ่านความร้อนแสดงดังรูปที่ 8.8 ค่าแรงเนียนของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01% (w/v) ถึง 0.25% (w/v) มีค่าใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในแขวนลอยสารโคโคซานวิสเกอร์มีค่าแรงเนียนลดลง เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% (w/v) ($P < 0.05$) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าโคโคซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25% (w/v) ในระบบที่มีเกลือ (2.5% w/v) สามารถรักษาเนื้อสัมผัสของกึ่งได้ใกล้เคียงกับตัวอย่างกึ่งที่ไม่ได้ผ่านการแช่สาร ในทางตรงกันข้าม ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของฟอสเฟตผสม (3.5% w/v) และเกลือ (2.5% w/v) มีค่าแรงเนียนลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างกึ่งที่ไม่ได้ผ่านการแช่สาร และมีค่าต่ำที่สุด ถึงแม้ว่าสารละลายผสมของฟอสเฟตผสมและเกลือจะสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนได้ แต่คุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกึ่งมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะนุ่มลง

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25% (w/v) ในระบบที่มีเกลือ มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มน้ำหนัก ลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านความร้อน และช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน อีกทั้งยังสามารถรักษาเนื้อสัมผัสของตัวอย่างกึ่งได้ใกล้เคียงกับธรรมชาติหรือตัวอย่างกึ่งที่ไม่ผ่านการทรีทอีกด้วย ดังนั้นโคโคซานวิสเกอร์ภายใต้เงื่อนไขนี้จึงถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาต่อไป





รูปที่ 8.7 (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกุ้งหูดควบคุม ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของสารละลายฟอสเฟต (3.5% w/v) และเกลือ (2.5% w/v) และตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอย่างที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



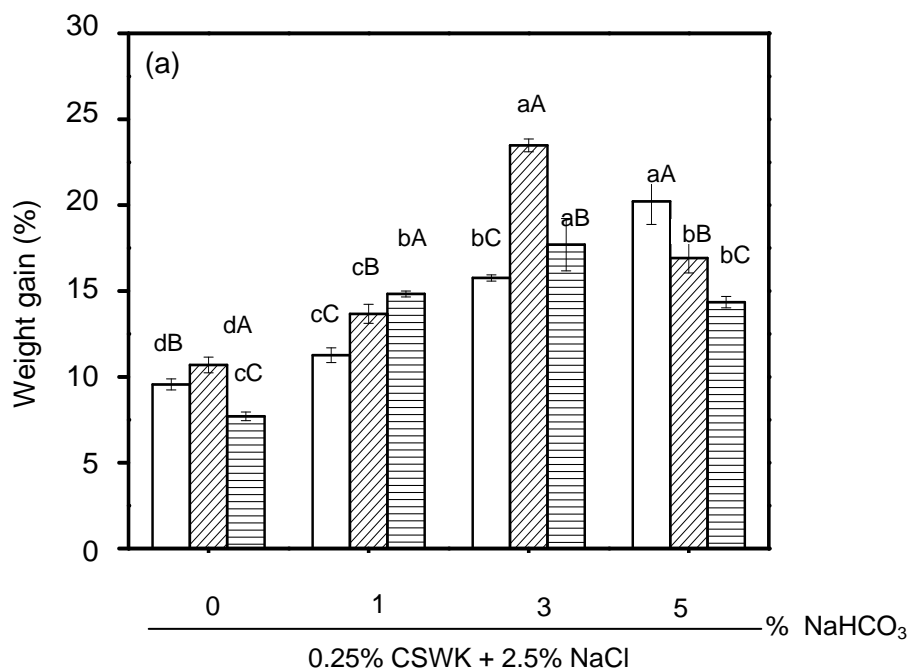
รูปที่ 8.8 ค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งชุดควบคุม ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของสารละลายฟอสเฟต (3.5% w/v) และเกลือ (2.5% w/v) และตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีความเข้มข้นต่างๆในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

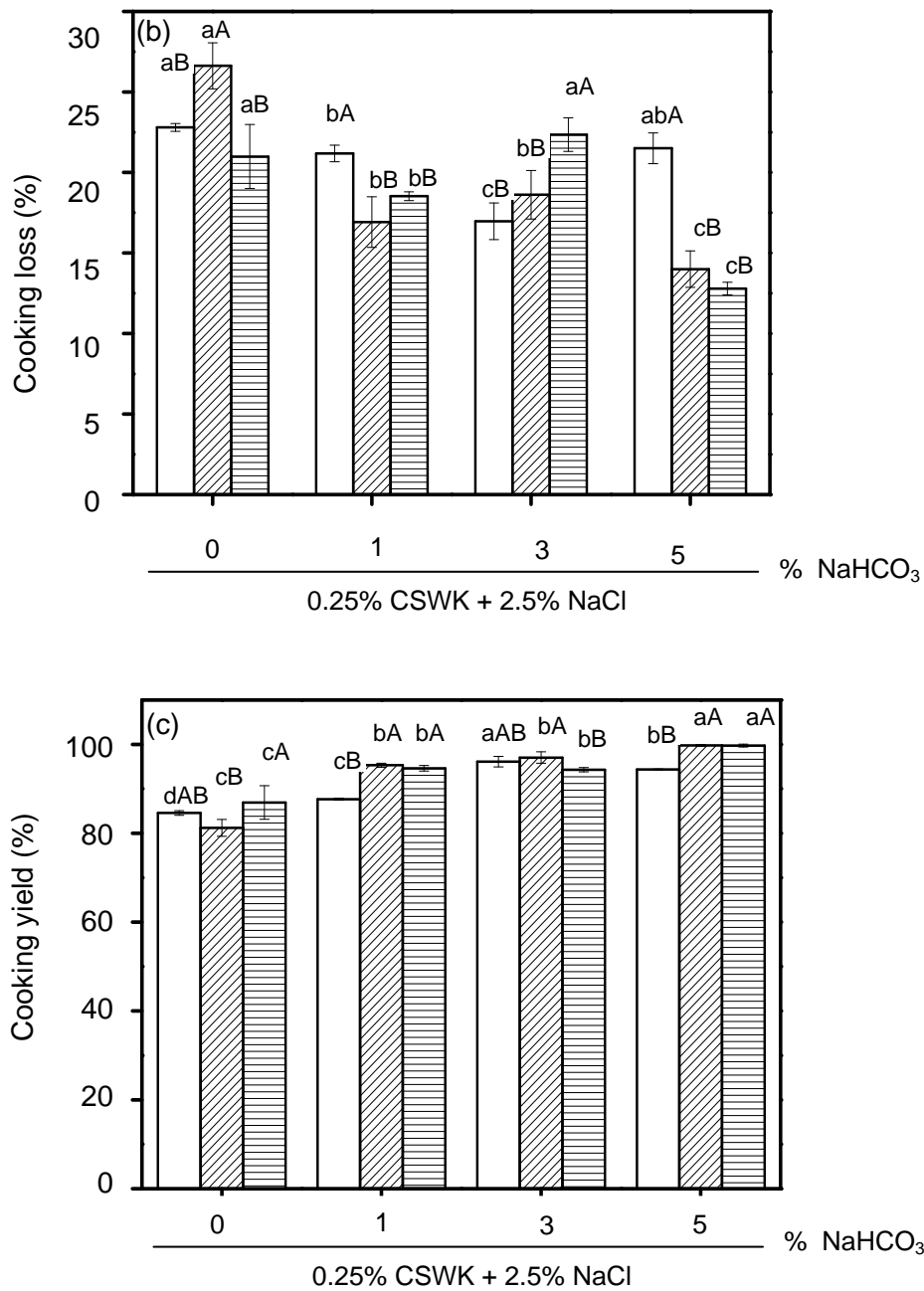
8.3.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตและอิทธิพลของค่าพีเอชของระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ ต่อคุณภาพของกุ้ง

ถึงแม้ว่าสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% (w/v)) แสดงผลดีในด้านการเพิ่มน้ำหนักของตัวอย่างกุ้ง อย่างไรก็ตามน้ำหนักของตัวอย่างกุ้งยังคงน้อยเมื่อเทียบกับตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายผสมของฟอสเฟตผสมและเกลือ ในการทดลองนี้ได้มีการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบ เนื่องจากโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นสารที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักและช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อน^{22,23} รูปที่ 8.9(a) แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตต่อน้ำหนักของตัวอย่างกุ้งในระบบที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ในระบบที่มีเกลือและโซเดียมไบคาร์บอเนต มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 11-23% ซึ่งมากกว่ากรณีของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว (7.70-10.70%) ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณา

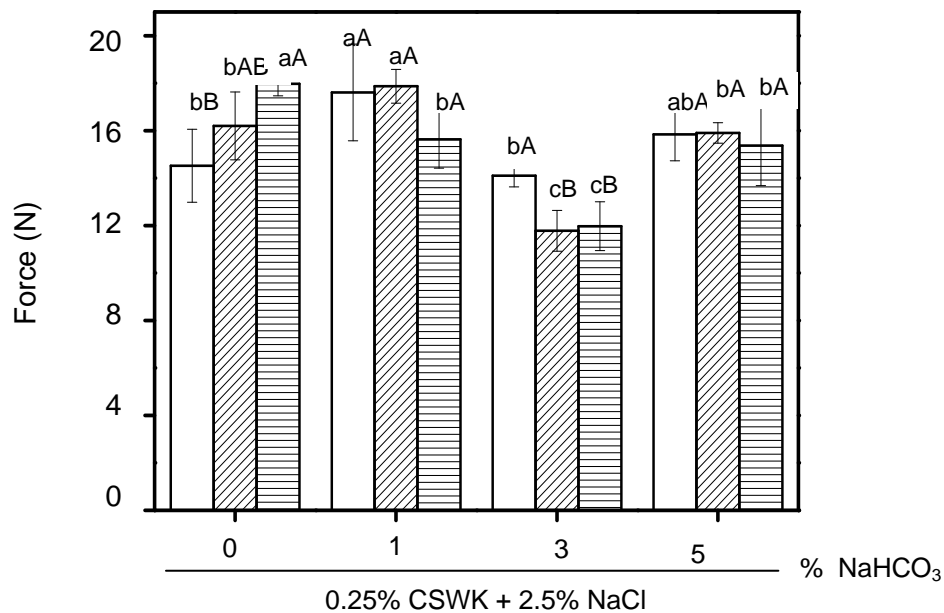
ผลของความเข้มข้นของโซเดียมไบคาร์บอเนตและค่าพีเอชของระบบต่อน้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อนและน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนพบว่าได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8.9 (b) และ 8.9(c) ตามลำดับ สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ในระบบเกลือและโซเดียมไบคาร์บอเนตสามารถลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านความร้อนและสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกุ้งได้ จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือและโซเดียมไบคาร์บอเนตแสดงผลของการเสริมประสิทธิภาพในการลดการสูญเสียน้ำหนักและสามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน

เมื่อพิจารณาลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างกุ้งจากค่าแรงเนียนในรูปที่ 8.10 พบว่าตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีการเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 3% (w/v) มีค่าแรงเนียนลดลงอย่างชัดเจน ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามการหาระบบที่ดีที่สุดต้องคำนึงถึงระบบที่สามารถให้ค่าน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนสูงที่สุดและสามารถลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านความร้อนมากที่สุด ระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (5% w/v) ที่สภาวะพีเอช 8 เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดที่สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของกุ้งในแง่ของน้ำหนักและการรักษาเนื้อสัมผัสของตัวอย่างของกุ้ง โดยตัวอย่างกุ้งจะมีเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับกรณีของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการทรีทในระบบที่ไม่ใส่เกลือโซเดียมไบคาร์บอเนต





รูปที่ 8.9 (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และเกลือโซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการผันแปรพีเอชของระบบ: □: pH 6 ▨: pH 7 และ ▩: pH 8 ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P < 0.05) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ



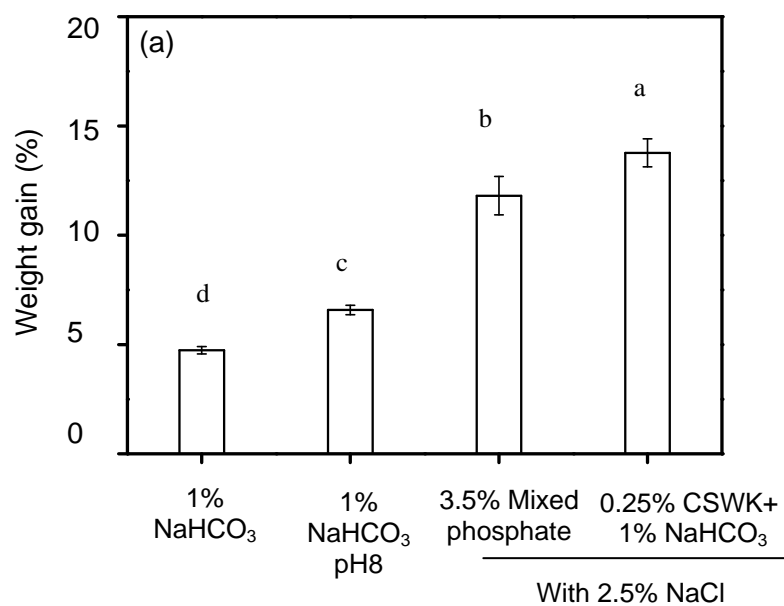
รูปที่ 8.10 ค่าแรงเนียนของตัวอย่างกึ่งที่ผ่านการแช่ในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ในระบบที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และเกลือ โซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีการปรับพีเอชของระบบ: □:pH 6 ▨:pH 7 และ ▩:pH 8 ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) ตัวอักษรพิมพ์เล็กและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างสารระบบเดียวกันและระหว่างสารชนิดเดียวกันตามลำดับ

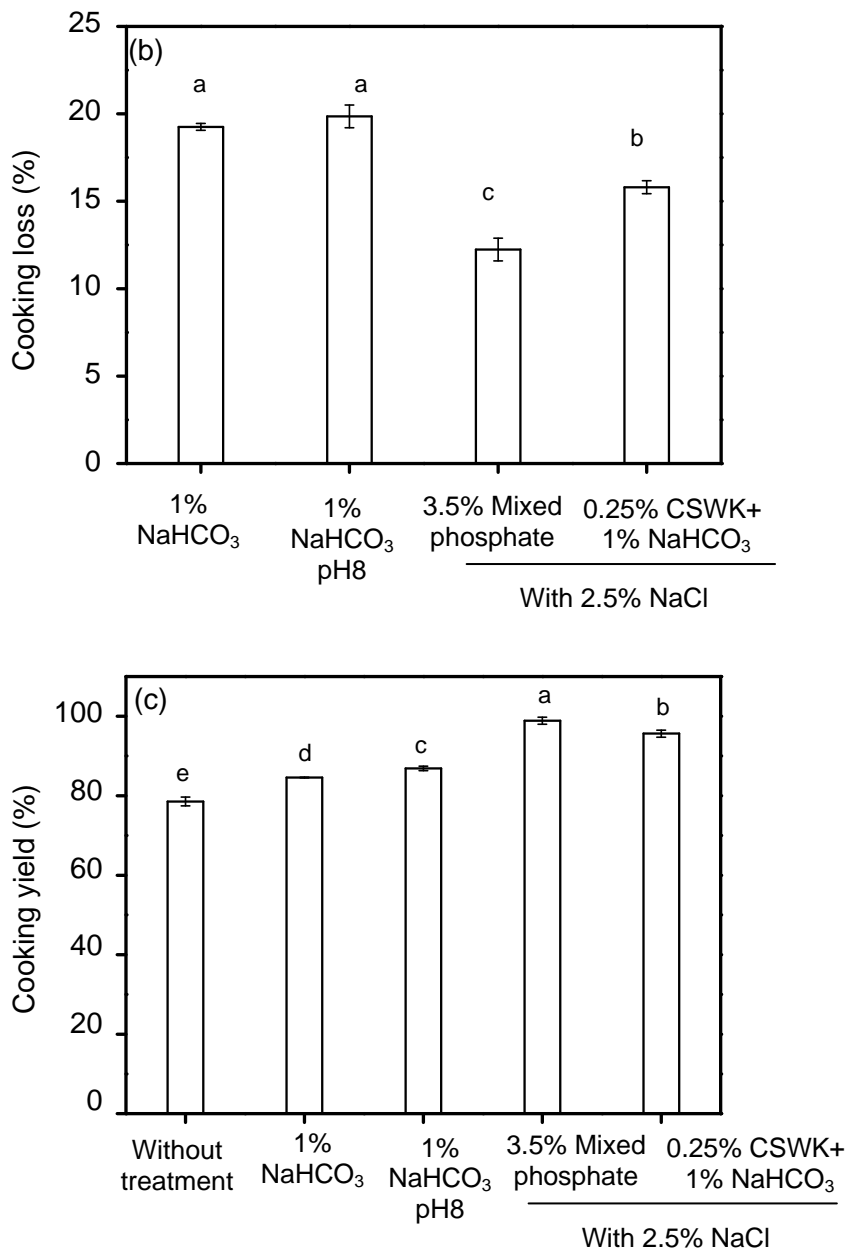
8.3.4 การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างโซเดียมไบคาร์บอเนตและค่าพีเอชของระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ต่อคุณภาพของกึ่ง

โซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นสารเติมแต่งสำหรับอาหารที่นิยมนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มน้ำหนักของอาหารและลดการสูญเสียน้ำหนักของอาหาร พีเอชก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการบวมตัวของเส้นใยโปรตีน¹⁷ การศึกษาคุณภาพของกึ่งเชิงเปรียบเทียบระหว่างระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (2.5% w/v) ที่มีการเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่ำที่สุด (1% w/v) และระบบสารละลายฟอสเฟตผสม แสดงดังรูปที่ 8.11 คุณภาพของกึ่งประเมินจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน และน้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อนตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า การแช่ตัวอย่างกึ่งในสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ที่มีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักและลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านกระบวนการให้

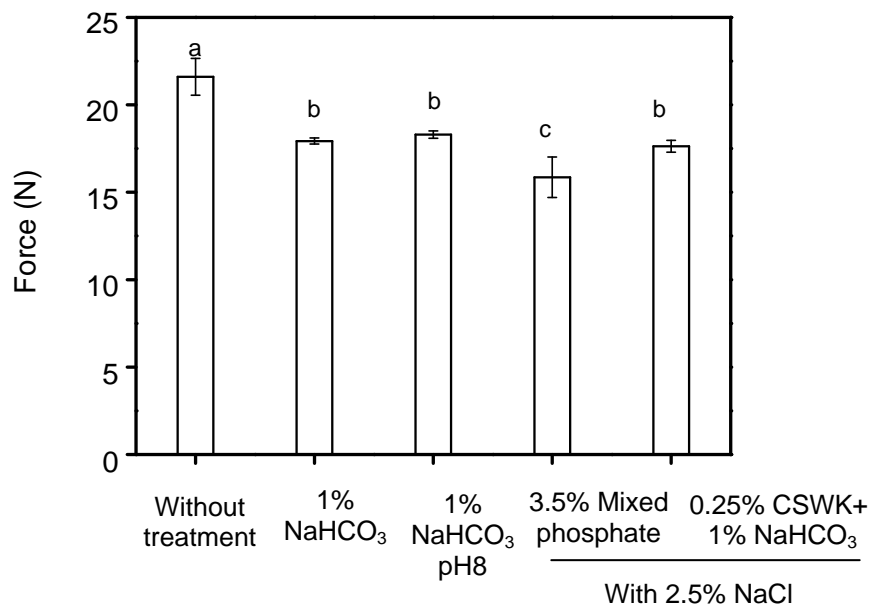
ความร้อนของตัวอย่างกุ้งได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารฟอสเฟตผสมเพียงอย่างเดียว ($P < 0.05$) สะท้อนให้เห็นถึงความสามารถของไคโตซานวิสเกอร์ในการช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำภายใต้เงื่อนไขที่ระบุ เช่น ในสถานะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% w/v และโซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% w/v และมีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 โดยสถานะดังกล่าวให้ผลที่ใกล้เคียงกับตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายฟอสเฟตผสม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มน้ำหนัก

รูปที่ 8.12 แสดงค่าแรงเฉือนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายฟอสเฟตผสมมีค่าแรงเฉือนต่ำที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ที่มีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 มีค่าแรงเฉือนไม่แตกต่างจากกรณีของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ทั้งที่ไม่มีและมีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 ซึ่งยืนยันได้ว่าฟอสเฟตมีผลเชิงลบต่อคุณลักษณะเนื้อสัมผัสของกุ้ง อย่างไรก็ตามตัวอย่างกุ้งไม่ผ่านการทรีทหรือการแช่สารมีค่าแรงเฉือนของสูงที่สุดหรือลักษณะเนื้อสัมผัสที่ต่ำสุด (เนื้อแน่น)





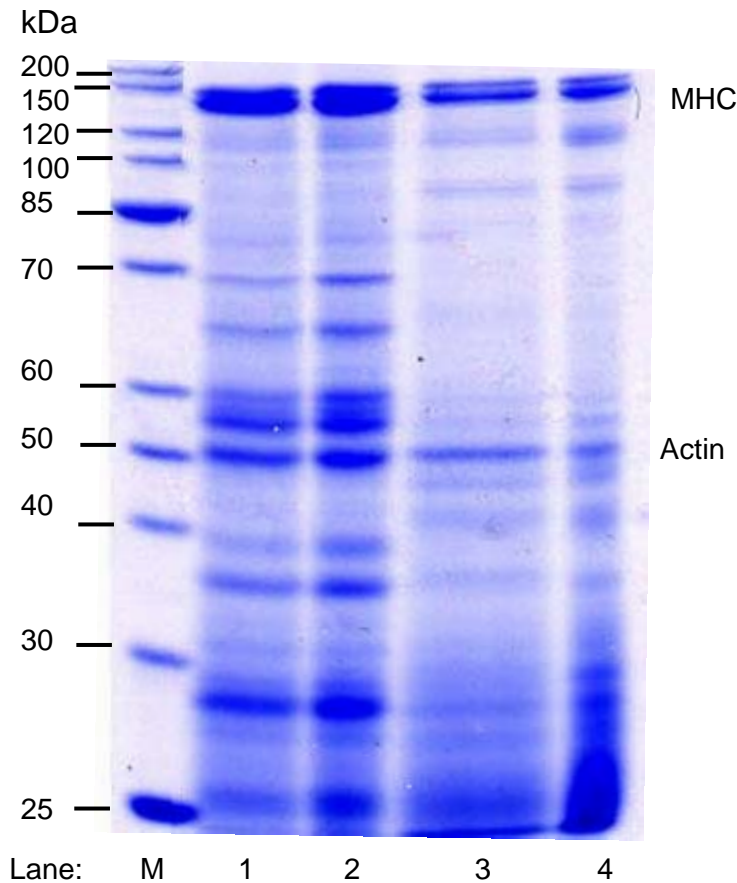
รูปที่ 8.11 (a) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (b) น้ำหนักที่สูญเสียหลังผ่านความร้อน (cooking loss) และ (c) น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (cooking yield) ของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 8.12 ค่าแรงเลื่อนของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=5$) ตัวอักษรที่แตกต่างกันระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

โครงสร้างของโปรตีนในตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ที่มีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 ถูกศึกษาเปรียบเทียบกับโครงสร้างของโปรตีนในตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ทั้งที่ไม่มีและมีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 โครงสร้างของโปรตีนวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการแยกสารแบบอิเล็กโตรโฟเรซิส เมื่อนำสารแช่ชนิดต่างๆมาหยดบนเจลพบว่าให้ผลดังแสดงในรูปที่ 8.13 ค่าความเข้มของแถบโปรตีน (band intensity) ค่อนข้างสูงสำหรับสารแช่ตัวอย่างกุ้งชุดควบคุม ได้แก่ สารแช่โซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ทั้งที่ไม่มีและมีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 (เลนที่ 1 และ 2) แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายและหลุดออกมาจากตัวอย่างกุ้งมีค่ามาก ในทางกลับกันความเข้มของแถบโปรตีนของสารแช่ฟอสเฟตผสม (เลนที่ 3) และสารแช่ระบบสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตและมีการปรับพีเอชเท่ากับ 8 (เลนที่ 4) มีค่าน้อยลงหรืออาจลง ซึ่งให้เห็นว่าสารละลายฟอสเฟตผสมและสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตและมีการปรับพีเอชเท่ากับ 8 สามารถป้องกันการสูญเสียโปรตีนได้ โดยค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 200 kDa และ 50 kDa

เป็นตำแหน่งที่แสดงถึงโปรตีนไมโอซินเส้นใยชนิดหนัก (myosin heavy chain, MHC) และโปรตีนแอคติน (actin) ตามลำดับ การวิเคราะห์เชิงปริมาณของโปรตีนสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ความหนาแน่น (densitometry scan) เพื่อแปลงข้อมูลจากความเข้มของแถบโปรตีน เมื่อพิจารณาแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 200 kDa พบว่าจำนวนพิกเซลของแถบโปรตีนสำหรับ เลนที่ 1 เลนที่ 2 เลนที่ 3 และเลนที่ 4 เท่ากับ 121 418, 107 281, 77 662 และ 55 849 พิกเซล ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคิดเป็นอัตราส่วนจะได้ 0.34: 0.30: 0.21: 0.15

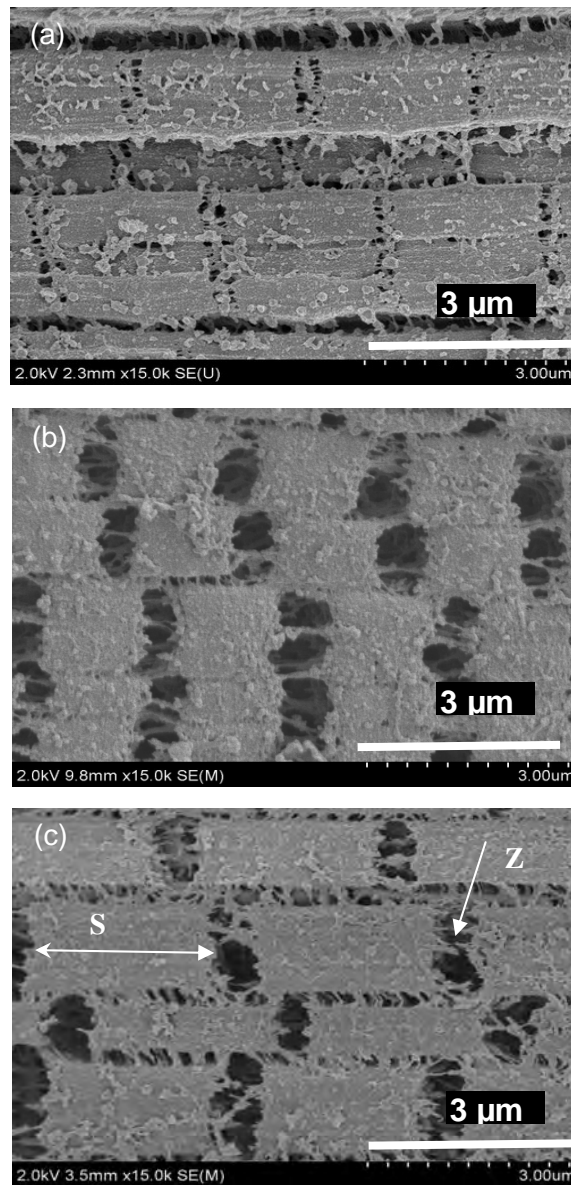


รูปที่ 8.13 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนในสารแช่ตัวอย่างกึ่งชนิดต่างๆ: M: Standard marker
 แถบที่1: โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% แถบที่2: โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ที่มีการปรับพีเอช = 8
 แถบที่3: กลีโกลิโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และสารละลายฟอสเฟตผสม (3.5% w/v) และ
 แถบที่4: สารแขวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ (0.25 % w/v) ที่มีกลีโกลิโซเดียมคลอไรด์(2.5% w/v)
 โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% และมีการปรับพีเอช = 8

นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนพิกเซลของแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 50 kDa สำหรับเลนที่ 1 เลนที่ 2 เลนที่ 3 และเลนที่ 4 เท่ากับ 56 373, 28 930, 9 202 และ 3675 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคิดเป็น

อัตราส่วนจะได้ 0.57: 0.29: 0.09: 0.04 จากผลการทดลองข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีเกลือและโซเดียมไบคาร์บอเนตสามารถป้องกันการสูญเสียของโปรตีนในตัวอย่างกุ้งได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น

นอกจากนี้โครงการวิจัยฯ ยังศึกษาโครงสร้างจุลภาคในทิศทางตามยาวของกล้ามเนื้อกุ้งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และโซเดียมไบคาร์บอเนต (1% w/v) ที่มีการปรับพีเอชของระบบเท่ากับ 8 เปรียบเทียบกับโครงสร้างของกล้ามเนื้อกุ้งที่ผ่านการแช่สารละลายฟอสเฟตผสม จากรูปที่ 8.14 พบว่าโครงสร้างของตัวอย่างกุ้งชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารมีการจัดเรียงตัวที่แน่นอนของเส้นใยไมโอไฟบริล หรือซาโครเมียร์ (myofibril units, sarcomeres) และ Z line (เส้นกั้นแบ่งระหว่างซาโครเมียร์) (รูปที่ 8.14(a)) อย่างไรก็ตามเมื่อตัวอย่างกุ้งถูกแช่ในสารละลายฟอสเฟตผสม โครงสร้างจุลภาคภายในของกล้ามเนื้อกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน กล่าวคือ เส้นใยไมโอไฟบริลมีลักษณะบวมตัวและมีการหดในแนวยาวของเส้นใย Z line ส่งผลให้เกิดช่องว่างขึ้นในโครงสร้าง (รูปที่ 8.14(b)) ในขณะที่กล้ามเนื้อของตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการแช่สารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ในระบบที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตและเกลือ มีการบวมของตัวเส้นใยไมโอไฟบริล หรือ ซาโครเมียร์อย่างเห็นได้ชัดเช่นกัน แต่เส้นใย Z line มีการหดตัวเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 8.14(c)) ซึ่งยังคงสภาพภายในได้ใกล้เคียงกับตัวอย่างกุ้งชุดควบคุม จากผลการทดลองนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าไคโตซานวิสเกอร์เป็นสารเติมแต่งที่ช่วยป้องกันการสูญเสียโปรตีนไมโอไฟบริล และสามารถเก็บกักน้ำภายในโครงสร้างของโปรตีนซึ่งส่งผลต่อน้ำหนักของตัวอย่างกุ้งโดยตรง



รูปที่ 8.14 ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวอย่างกล้ามเนื้อในทิศทางตามยาวของกึ่งที่ผ่านการให้ความร้อน โดยตัวอย่างที่นำมาส่องกล้องได้ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ: (a) ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่สาร (b) ตัวอย่างที่ผ่านการแช่เกลือ โซเดียมคลอไรด์ (2.5% w/v) และสารละลายฟอสเฟตผสม (3.5% w/v) และ (c) ตัวอย่างที่ผ่านการแช่สารแวนลอยโคโคซานวิสเกอร์ (0.25% w/v) และ โซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% ที่มีการปรับพีเอช = 8 (S = Sarcomere, Z = Z line)

8.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยในบทนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สารไคติน-ไคโตซาน หรืออนุพันธ์ไคติน-ไคโตซานที่มีขนาดในระดับนาโนเมตรในรูปแบบสารแขวนลอยในน้ำ ได้แก่ ไคตินวิสเกอร์ ไคโตซานวิสเกอร์ และอลิโกไคโตซาน เพื่อเป็นสารเติมแต่งในอาหารทะเล โดยใช้ กุ้งขาวเป็นอาหารทะเล ต้นแบบ ระบบสารแช่ที่ประกอบด้วยสารแขวนลอยไคโตซานวิสเกอร์ เกลือโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 1% (w/v) มีประสิทธิภาพในการเพิ่ม น้ำหนักสุทธิหลังผ่านความร้อน (ประมาณ 24%) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของตัวอย่างกุ้ง (ประมาณ 14%) นอกจากนี้ยังสามารถลดการสูญเสียน้ำหนักหลังผ่านความร้อนของตัวอย่างกุ้งได้อีกด้วย อีกทั้งยังสามารถคงสภาพเนื้อสัมผัสของกุ้ง (ซึ่งพิจารณาจากค่าแรงเฉือน (83%)) ได้ใกล้เคียงกับ ตัวอย่างกุ้งที่ไม่ได้ผ่านการแช่มากที่สุด ไคโตซานวิสเกอร์ยังสามารถแพร่ผ่านและกระจายตัวได้ดี ในโครงสร้างกล้ามเนื้อโปรตีนกุ้ง และช่วยเพิ่มการบวมตัวของเส้นใยไมโอไฟบริลหรือซาโครเมียร์ ซึ่งสามารถคงสภาพภายในได้ใกล้เคียงกับกุ้งธรรมชาติ (กุ้งที่ไม่ผ่านการทรีทหรือการแช่สาร) มากที่สุด นอกจากนี้ยังรักษาโปรตีนไมโอซินและแอกตินของกุ้งได้ดีอีกด้วย

8.5 เอกสารอ้างอิง

1. No, H.K.; Meyers, S.P.; Prinyawiwatkul, W.; and Xu, Z. *Journal of Food Science* 2007, 72, 87-100.
2. Yoon, K.S. *Poultry Science* 2002, 81, 1910-1915.
3. Gonçalves, A.A.; and Ribeiro, J.L.D. *Food Science and Technology* 2009, 42, 1435-1438.
4. Li, Q.; Dunn, E.T.; Grandmaison E.W.; and Goosen, M.F.A. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 1992, 7, 370-397.
5. Wang, G. H. *Journal of Food Protection* 1992, 55, 916-919
6. Tsai, G.J.; Su, W.H.; Chen, H.C.; and Pan, C.L. *Fisheries Science* 2002, 68, 170-77.
7. Soultos, N.; Tzikas, Z.; Abraham, A.; Georgantelis, D.; and Ambrosiadis, I. *Meat Science* 2008, 80, 1150-1156.
8. Chen, X.G.; and Park. H.J. *Carbohydrate Polymers* 2003, 53, 355-359.
9. Chirachanchai, S.; Lertworasirikul. A.; and Tachaboonyakiat, W. *Carbohydrate Polymers* 2001, 46, 19-27.
10. Rúnarsson, Ö.V.; Malainer, C.; Holappa, J.; Sigurdsson, S.T.; and Másson, Már. *Carbohydrate Research* 2008, 343, 2576-2582.
11. Phongying, S., Aiba, S., and Chirachanchai, S. *Biopolymers* 2006, 83, 280-288.
12. Nair, K.G.; and Dufresne, A. *Biomacromolecules* 2003, 4, 657-665.

13. Bourne, M.C. Food Technology 1978, 32, 62-72.
14. Laemmli, U.K. Nature 1970, 277, 680-685.
15. Xiong, Y.L.; Mullins, O.E.; Stika, J.F.; Chen, J.; Blanchard, S.P.; and Moody, W.G. Meat Science 2007, 77, 105-113.
16. Sathivel, S. Journal of Food Science 2005, 70, 455-459.
17. Lonergan, E.H.; and Lonergan S.M. Meat Science 2005, 71, 194-204.
18. Aaslyng, M.D.; Bejerholm, C.; Ertbjerg, P.; Bertram, H.C.; and Andersen, H.J Food Quality and Preference 2003, 14, 277-288.
19. Offer, G.; and Trinick, J. Meat Science 1983, 8, 245-281.
20. Sims, T. J.; and Bailey, A. J. Developments in meat science 1981, Vol. 2, pp. 29-59, London: Applied Science Publishers Ltd.
21. Gonçalves, A.A.; and Ribeiro, J.L.D. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 2008, 3, 237-247.
22. Wyneene, E.J.; Bowker, B.C.; Grant, A.L.; Lamkey, J.W.; Fennewald, K.J.; Henson, L.; and Gerrard, D.E. Journal of Food Science 2001, 66, 886-891.
23. Lopkulkiaert, W.; Prapatsornwattana, K.; and Rungsardthong, V. Food Science and Technology 2009, 42, 768-776.

บทที่ 9

สารยับยั้งจุลินทรีย์อนุภาคนาโนไคโตซานสำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาหมูบด

Chitosan nanoparticles as antimicrobial agent for minced pork shelf life extension

9.1 บทนำ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยพันธะ (1,4)-linked 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose และ 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose ไคโตซานผลิตได้จากกระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) ของไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกกุ้ง กระจดองปู และแกนปลาหมึก ไคโตซานมีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญ เช่น หมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หมู่ไฮดรอกซิลปฐมภูมิและทุติยภูมิ ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และ 3 ตามลำดับ¹ ประจุบวกของหมู่อะมิโนที่ถูกโปรโตเนท (NH_3^+) บนโครงสร้างของโมเลกุลไคโตซานสามารถเกิดอันตรกิริยากับประจุลบบนเมมเบรนของเซลล์จุลินทรีย์ได้ ส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลและจุลินทรีย์ตายในที่สุด² จากกลไกดังกล่าวทำให้ไคโตซานมีสมบัติพิเศษ เช่น ไม่มีพิษ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ สามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต³ และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์⁴

ปัจจุบันผู้บริโภคมีแนวโน้มในการเลือกผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากสารเคมีแต่งสีแต่งกลิ่น และให้ความสำคัญผลิตภัณฑ์ที่เติมสารเคมีแต่งสีที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น ไคโตซานเป็นสารสกัดจากธรรมชาติประเภทหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจมากในขณะนี้ อย่างไรก็ตามไคโตซานมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลเดียวกันและระหว่างโมเลกุล ส่งผลให้โครงสร้างโมเลกุลไคโตซานมีลักษณะแข็งแรง และเป็นสาเหตุทำให้ไคโตซานไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั่วไป ไคโตซานสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายกรดอินทรีย์ เช่น กรดแอสซิดิก กรดซัคซินิก และกรดแลคติก เป็นต้น⁵ เพื่อปรับปรุงสมบัติการละลายของไคโตซาน จึงได้มีการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ อาทิเช่น ควอเทอร์ไนซ์คาร์บอกซี เมทิลไคโตซาน (quaternized carboxymethyl chitosan)⁶

จากการสืบค้นเอกสารที่ผ่านมามีการรายงานการใช้ไคโตซานเป็นสารเคมีแต่งสีในอาหาร อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้จากการตัดแปรรูปโครงสร้างทางเคมีอาจมีผลกระทบต่อค่าของสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี โครงการวิจัยนี้จึงพัฒนาอนุภาคนาโนไคโตซานที่สามารถละลายหรือกระจายตัวในน้ำ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์⁷ และกรด^{8,9} เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร

เนื้อหางานวิจัยในบทนี้เน้นถึงการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนไคติน-ไคโตซานที่สามารถละลายหรือกระจายตัวในน้ำและมีโครงสร้างออสติฐานที่แตกต่างกัน เป็นสารต้านจุลินทรีย์สำหรับอาหารประเภทเนื้อสัตว์สด อาหารต้นแบบที่ใช้ในงานวิจัยบทนี้คือเนื้อหมูบด เนื้องานวิจัยจะ

ครอบคลุมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสด

9.2 วิธีการทดลอง

9.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ไคตินวิสเกอร์ (CTWK) ไคโตซานวิสเกอร์ (CSWK) และออลิโกไคโตซาน (OligoCS) ถูกล้างโดยผ่านเยื่อกั้น (dialyzed) เพื่อกำจัดเกลือที่ตกค้าง และปรับค่าพีเอชให้เป็นกลาง จากนั้นทำให้แห้งโดยการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ตัวอย่างเนื้อหมูปอดเตรียมได้จากเนื้อหมูสัน ในการผสมหมูปอดและสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆทำโดยใช้เครื่องบดความเร็วสูง และเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ความเข้มข้นของสารไคติน-ไคโตซานที่ใช้ในการทดลองเพื่อเลือกชนิดของสารไคติน-ไคโตซานที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์สูงที่สุดเท่ากับ 0.25% (w/w) สำหรับการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารไคติน-ไคโตซานต่อประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ทำได้โดยผสมเนื้อหมูปอดกับตัวอย่างไคโตซานวิสเกอร์และออลิโกไคโตซานที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1 %, 0.2 %, และ 0.4 % (w/w) ตัวอย่างเนื้อหมูปอดถูกเก็บภายในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์

9.2.2 การตรวจสอบศักย์ซีต้า (Zeta-potential)

ประจุบนพื้นผิวของสารไคติน-ไคโตซานชนิดต่างๆที่แขวนลอยในน้ำ สามารถตรวจสอบได้โดยเครื่องวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (Malvern Zetasizer Nano Series, Malvern Instruments, Ltd.) โดยใช้มุมตรวจวิเคราะห์ที่ 173°

9.2.3 การตรวจสอบพื้นที่ผิวของสารไคติน-ไคโตซานโดยใช้เทคนิคบรูเนอร์-เอลเมท-เทลเลอร์ (Brunauer-Emmett-Teller, BET)

พื้นที่ผิวของอนุภาคไคติน-ไคโตซาน สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยเครื่อง Autosorp-1 gas sorption (Quantachrome Corporation) ตัวอย่างถูกให้ความร้อนเริ่มต้นและถูกกำจัดแก๊สโดยวางภายใต้บรรยากาศแก๊สไนโตรเจน นาน 3-4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 150 °C ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์

9.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

นำตัวอย่างเนื้อหมูปอดปริมาณ 10 กรัม ผสมกับน้ำเปปโตน (peptone water) เข้มข้น 0.1 % ปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อเป็นเวลา 2 นาที ผสมโดยใช้เครื่อง Stomacher (Seward model 400, West Sussex, England) และทำการเจือจางตัวอย่าง 10 เท่า (ten fold serial dilution) เพื่อให้จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่มีในตัวอย่างอยู่ในช่วงที่สามารถวิเคราะห์ได้ จากนั้น

ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์จากตัวอย่างโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ภายใต้สภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน

เชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อหมูที่ทำการวิเคราะห์มีดังนี้ Total Viable Bacteria counts (TVB), Lactic acid bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* counts, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* counts และจุลินทรีย์อื่นๆ เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์จำนวนโดยใช้เทคนิค spread plate การทดลองทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำวิเคราะห์ 2 ครั้ง จำนวนจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้รายงานค่าในรูปของ colony-forming units (log CFU)/g การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดทำได้ดังนี้ การเพาะเลี้ยง Total Viable Bacteria counts (TVB) ทำในอาหาร Plate Count Agar (PCA, Difco[®]) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ Lactic acid bacteria (LAB) ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร deMan Rogosa Sharpe agar (MRS, Difco[®]) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยง *Enterobacteriaceae* counts ทำในอาหาร MacCONKEY agar (Oxoid) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์จำนวนโคโลนีของ *Salmonella* spp. และจุลินทรีย์อื่นๆที่สามารถเจริญได้บนจานเพาะเชื้อ XLD agar (Difco[®]) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม total XLD count สามารถวิเคราะห์ได้จากความแตกต่างของสี กล่าวคือโคโลนีของ *Salmonella* spp. จะมีลักษณะกลม สีแดงและมีจุดศูนย์กลางเป็นสีดำ ในขณะที่โคโลนีที่เหลือบนเพลทเป็น total XLD count ในกรณีของ *Staphylococcus* counts ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร Baird Parker agar supplement with egg yolk tellurite (Merck) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

9.2.5 การวิเคราะห์ไบโอเจนิกอามีน (Biogenic Amine)

เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วยทริปตามีน (Tryptamine, TRYP) บี-ฟีนิลอลานีน (phenylethylamine, PHE) พิวเทรสซีน (putrescine, PUT) คาดาเวอรีน (cadaverine, CAD) ฮิสตามีน (Histamine, HIS) ไทราซีน (tyramine, TY) สเปออร์มิดีน (spermidine, SPD) และสเปออร์มิน (spermine, SPM) ซึ่งคาดว่าจะพบในเนื้อหมู และ 1,7- ไดอะมิโนเฮปแทน (diaminoheptane) ซึ่งใช้เป็น internal standard (IS) โดยละลายในตัวทำละลาย HClO₄ เข้มข้น 0.4 M สารละลายผสมที่เตรียมได้ต้องปราศจากเบสเพื่อใช้เป็นสารละลายสต็อก สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน Calibration standards (0-200 ppm)

ตัวอย่างเตรียมได้โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Herna'ndez-Jover et al.¹⁰ ไบโอเจนิกอามีนสามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC (Alliance 2690 HPLC system, Waters, Milford, MA, USA) ที่มีคอลัมน์ Hypersil BDS C18 column, 4.6 x 200 mm, 5 μm (Thermo, Bellefonte, PA, USA) ในการแยกสาร และดีเทคเตอร์ชนิด Photo diode array detector (model 996, Waters, MA,

USA) ในการจับสัญญาณ ในช่วงความยาวคลื่นบริเวณ 254 นาโนเมตร ความเข้มข้นของไบโอเจนิค เอมีนสามารถคำนวณและเทียบได้จากความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

9.2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไขมันโดยใช้เทคนิค thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

TBARS ในตัวอย่างเนื้อหมูปกติวิเคราะห์โดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีที่รายงานโดย Benjakul และ Nirmal (2010)¹¹ ปั่นตัวอย่างหมูปกติ 1 กรัม กับสารละลายผสมของ HCl เข้มข้น 0.25 N ในระบบที่มี thiobarbituric acid เข้มข้น 0.375% และ Trichloroacetic acid เข้มข้น 15% จนเป็นเนื้ออิมัลชัน จากนั้นนำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายตัวอย่าง เปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง ทำการแยกตัวอย่างผสมโดยการหมุนแยกสาร (4000 g เป็นเวลา 20 min) นำสารส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นบริเวณ 532 nm โดยเครื่อง UV-spectrophotometer ความเข้มข้นของ TBARS สามารถคำนวณและเทียบได้จากกราฟมาตรฐานของ malonaldehyde (0–2 ppm) ผลที่ได้รายงานค่าในรูปของ mg malonaldehyde/kg ของตัวอย่างเนื้อหมูปกติ

9.2.7 การวิเคราะห์ออกซิเดชันของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE of myofibrillar proteins

โครงสร้างของโปรตีนไมโอไฟบริลถูกวิเคราะห์โดยเทคนิคการแยกสารแบบอเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) ตามที่รายงานโดย Laemmli (1970) การสกัดโปรตีนทั้งหมดที่มีในตัวอย่างทำได้โดยการปั่นตัวอย่างหมูปริมาณ 3 กรัม ในสารละลาย SDS เข้มข้น 5% w/v ปริมาตร 27 มิลลิลิตร โดยใช้ homogenizer ด้วยความเร็วรอบ 13500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จนได้สารผสมที่เป็นเนื้ออิมัลชัน จากนั้นละลายโปรตีนในตัวอย่างโดยต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิประมาณ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 3500 g เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นโหลดสารละลายโปรตีนปริมาณ 40 ไมโครกรัมต่อเลน ลงบน SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย stacking gel เข้มข้น 4% และ separating gel เข้มข้น 5 % ภายใต้สภาวะกระแสคงที่ที่ 20 มิลลิแอมแปร์ต่อเจลหนึ่งแผ่น หลังจากแยกสารโดยใช้กระแสไฟฟ้าแล้ว โปรตีนบนแผ่นเจลถูกย้อมโดยการแช่ในสารละลายผสมของ Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.02% (w/v) เมทาโทลเข้มข้น 50% (v/v) และกรดอะซิติกเข้มข้น 7.5% (v/v)

อย่างไรก็ตามโปรตีนไมโอซินเส้นใยชนิดหนัก (myosin heavy chain, MHC) ซึ่งปรากฏที่บริเวณ 200 kDa สามารถถูกออกซิไดซ์และเปลี่ยนเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (heavier protein) ได้ โดยการสร้างพันธะเชื่อมโยงไดซัลไฟด์ (disulfide-crosslinked MHC) โปรตีนไมโอซินเส้นใยชนิดหนักที่ถูกออกซิไดซ์และเปลี่ยนเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะปรากฏแถบโปรตีนที่บริเวณ

สูงสุดของแผ่นเจล สำหรับการวิเคราะห์จำนวน MHC ทั้งหมดจะเปรียบเทียบผลที่ได้จากสภาวะ non-reducing และ reducing เนื่องจากพันธะเชื่อมโยงไดซัลไฟด์สามารถถูกทำลายได้ภายใต้สภาวะ reducing โดยใช้ β -mercaptoethanol

9.2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยของผลการทดลองคำนวณได้จาก 3 ซ้ำ การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยใช้โปรแกรม SPSS 11.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., and U.S.A) การทดสอบความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และการเปรียบเทียบค่าระหว่างประชากรใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torries 1980)¹³

9.3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

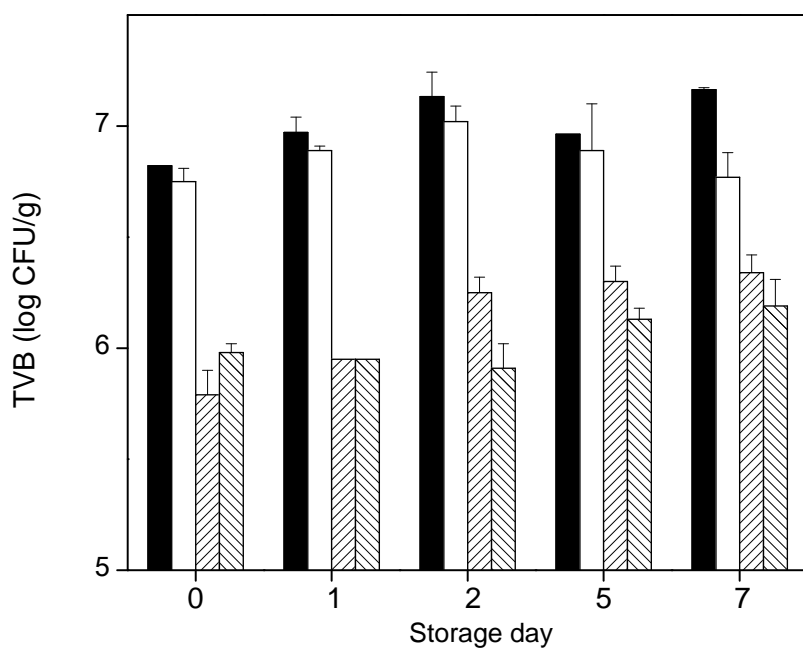
9.3.1 การต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อหมูปด ของสารโคโคซานรูปแบบต่างๆ

จุดประสงค์ของงานวิจัยในบทนี้ คือ การประยุกต์ใช้สารโคโคซานเพื่อเป็นสารเติมแต่งอาหารสำหรับต้านเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโคโคซาน คือ ความหนาแน่นของประจุบวกที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของมอนอเมอร์กลูโคซามีบนสายโซ่โมเลกุลโคโคซานเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ความหนาแน่นของประจุบวกขึ้นกับระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (degree of deacylation, DD) ดังนั้นเพื่อศึกษาปัจจัยทางด้านโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของสารตัวอย่างโคโคซานต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ DD ของสารตัวอย่างโคโคซานทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองจึงควบคุมให้มีค่าเท่ากัน (DD = 0.91)

การนำเสียดภายใต้สภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน โดยแบคทีเรียที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ กลิ่น และรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ สามารถตรวจสอบได้จากปริมาณของ Total viable bacteria Total viable bacteria เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารที่อุณหภูมิ 4 °C รูปที่ 9.1 และ 9.2 แสดงผลของชนิดของตัวอย่างโคโคซานต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย

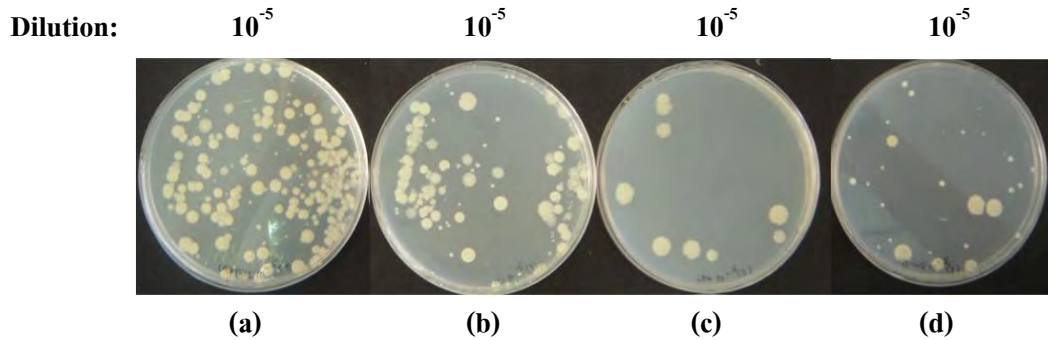
จากการทดลองพบว่าตัวอย่างเนื้อหมูปดสดควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียในวันที่ 0 ประมาณ 6.8 log CFU/g และปริมาณแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็น 7 log CFU/g – 7.2 log CFU/g เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมโคโคซานน้ำหนักโมเลกุลสูงเข้มข้น 0.25% (w/w) พบว่ามีจำนวนน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับกรณีที่พบในตัวอย่างสดควบคุม ตลอดระยะเวลาการทดลอง 7 วัน แสดงให้เห็นว่าโคโคซานน้ำหนักโมเลกุลสูงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ค่อนข้างต่ำ สำหรับปริมาณแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมโคโคซานวิสเกอร์และอลิโกโคโคซานเข้มข้น 0.25% (w/w) มีค่าประมาณ 6 log CFU/g ในวันแรกของการทดลอง และปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้ม

เพิ่มขึ้นเช่นกันเมื่อเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมไคโตซานวิสเกอร์และออลิโกไคโตซานมีค่าใกล้เคียงกัน และน้อยกว่าปริมาณแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งให้เห็นว่าไคโตซานวิสเกอร์และออลิโกไคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียใกล้เคียงกันและดีกว่าไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง หรืออาจกล่าวได้ว่าไคโตซานวิสเกอร์และออลิโกไคโตซานสามารถยับยั้งและหน่วงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากข้อมูลในการทดลองเบื้องต้นดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานขึ้นกับปัจจัยด้านโครงสร้างทางกายภาพ เช่น สัณฐานวิทยา และขนาดของโมเลกุล ไคโตซานที่มีโมเลกุลขนาดเล็กให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าไคโตซานที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไคโตซานและผนังเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างไคโตซานในรูปแบบอนุภาคให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าตัวอย่างไคโตซานในรูปแบบเส้นใยอีกด้วย

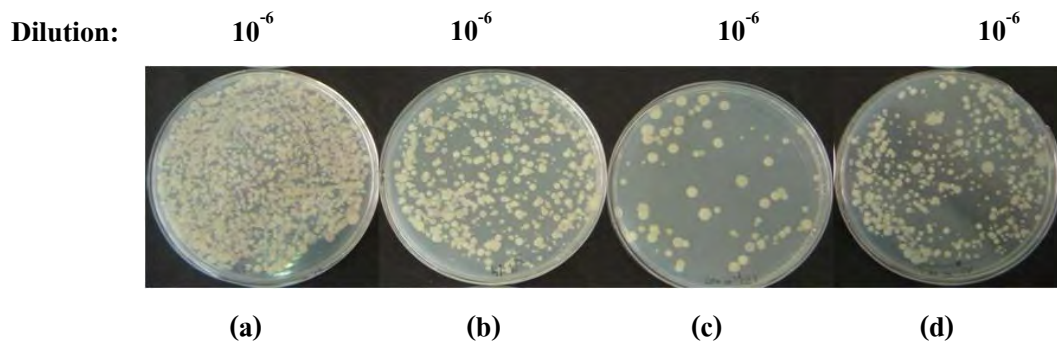


รูปที่ 9.1 Total Viable Bacteria counts (log CFU/g) ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมสารตัวอย่างไคโตซานชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้น 0.25% (w/w) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C: ■:ตัวอย่างควบคุม □:ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง ▨:ไคโตซานวิสเกอร์ และ ▩:ออลิโกไคโตซาน

Day 1



Day 4

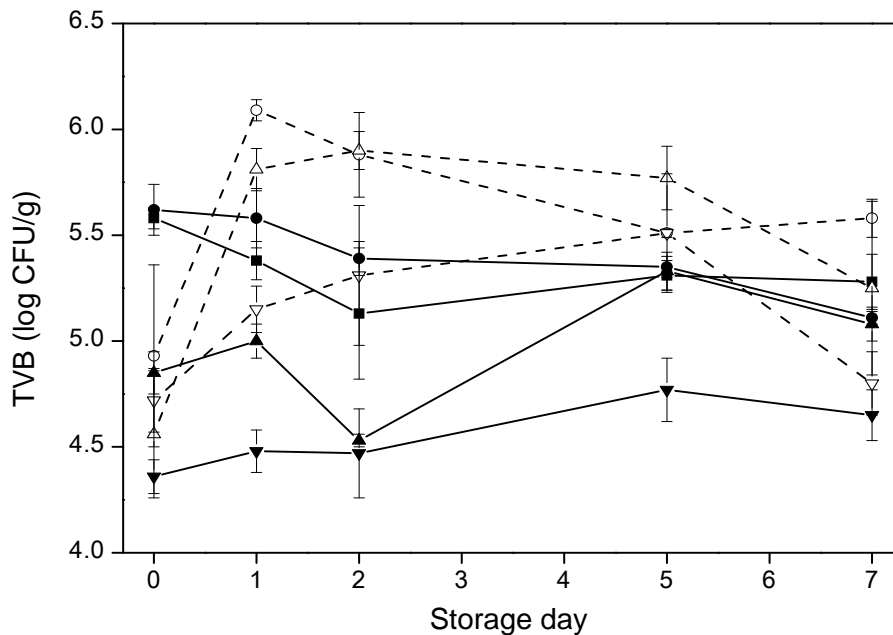


รูปที่ 9.2 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญในเนื้อหมูปด ภายหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ของตัวอย่างเนื้อหมูปดควบคุมและชุดที่มีการเติมสารตัวอย่างโคโคโตซานชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.25% (w/w) ภายใต้อุณหภูมิที่มีก๊าซออกซิเจน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C : (a) ตัวอย่างควบคุม (b) โคโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (c) ออลิโกโคโคโตซาน และ (d) โคโคโตซานวิสเกอร์

สำหรับอิทธิพลของโครงสร้างทางกายภาพ เช่น สัณฐานวิทยา และขนาดของโมเลกุลของสารตัวอย่างโคโคโตซาน (โคโคโตซานวิสเกอร์และออลิโกโคโคโตซาน) และความเข้มข้นของสารตัวอย่างโคโคโตซาน (0.1% 0.2% และ 0.4% (w/w)) ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable bacteria) ในเนื้อหมูปด แสดงในรูปที่ 9.3

จากรูปที่ 9.3 พบว่า total viable bacterial counts ของตัวอย่างชุดควบคุมในวันแรกของการทดลอง มีค่าประมาณ 5.5 log CFU/g ปริมาณแบคทีเรียในวันแรกของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมออลิโกโคโคโตซานเข้มข้น 0.1% (w/w) มีค่าใกล้เคียงกับกรณีของตัวอย่างชุดควบคุม ปริมาณแบคทีเรียหรือ total viable bacterial counts ลดลงอย่างเห็นได้ชัดประมาณ 0.5 และ 1 log CFU/g ($p < 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของออลิโกโคโคโตซานเพิ่มขึ้นเป็น 0.2% และ 0.4% (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมโคโคโตซานวิสเกอร์ก็มีค่า total viable bacterial counts ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารโคโคโตซานวิสเกอร์เพิ่มขึ้นเช่นกัน ในระหว่างการเก็บรักษา ค่า total viable bacterial

counts ของทุกตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4% (w/w) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานไม่เพียงแต่ขึ้นกับโครงสร้างทางกายภาพ เช่น สัณฐานวิทยา และขนาดของโมเลกุลของสารแต่ยังขึ้นกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างอีกด้วย



รูปที่ 9.3 Total Viable Bacteria Counts (log CFU/g) ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมสารตัวอย่างไคโตซานที่มีการผันแปรชนิดและความเข้มข้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C: ■: ตัวอย่างควบคุม ●: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.1% ▲: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% ▼: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4% ○: ไคโตซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.1% △: ไคโตซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.2% และ ▽: ไคโตซานวิสเกอร์เข้มข้น 0.4%

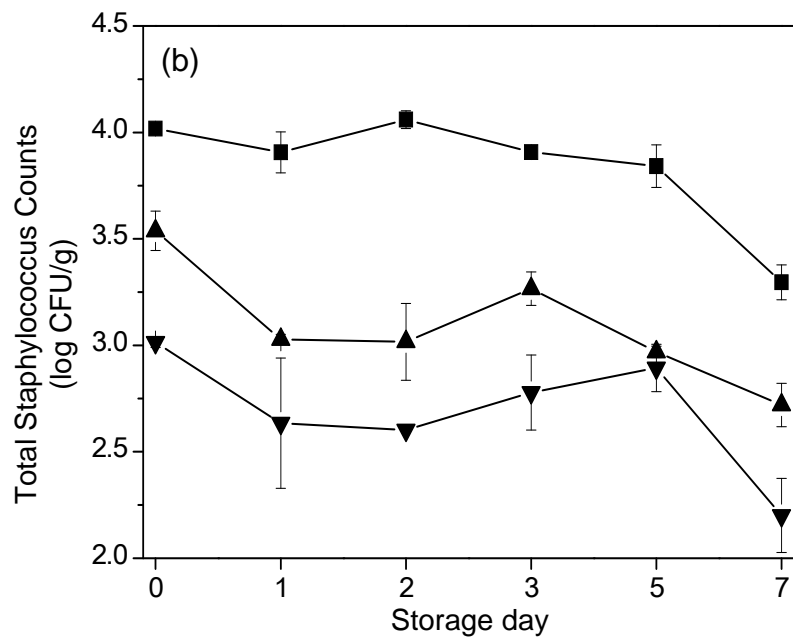
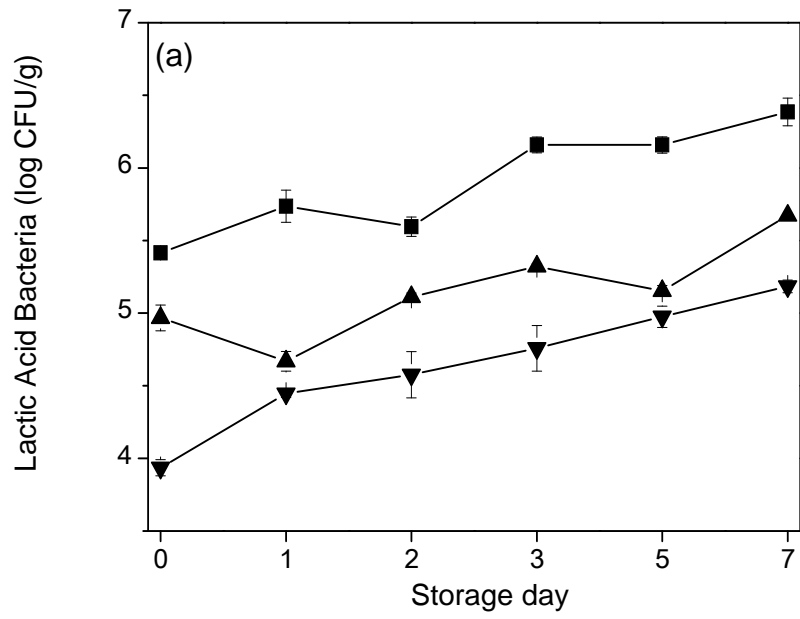
นอกจากนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นออลิโกไคโตซานที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2% และ 0.4% (w/w) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียจากผลการทดลองข้างต้น จึงถูกเลือกเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ lactic Acid Bacteria (LAB) count ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบในอาหารประเภทหมัก จากรูปที่ 9.4(a) และ 9.5(a) พบว่า LAB counts ของตัวอย่างเนื้อหมูปดควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 5.5 log CFU/g ในวันแรกของการทดลอง เป็น 6.5 log CFU/g ในวันที่ 7 สำหรับตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% (w/w) มีการเจริญเติบโตของ LAB ที่ช้าลงเมื่อเทียบกับกรณีชุดควบคุม กล่าวคือ LAB counts มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 5 log CFU/g ในวันแรกของการทดลอง เป็น 5.5 log CFU/g ในวันที่ 7 นอกจากนี้

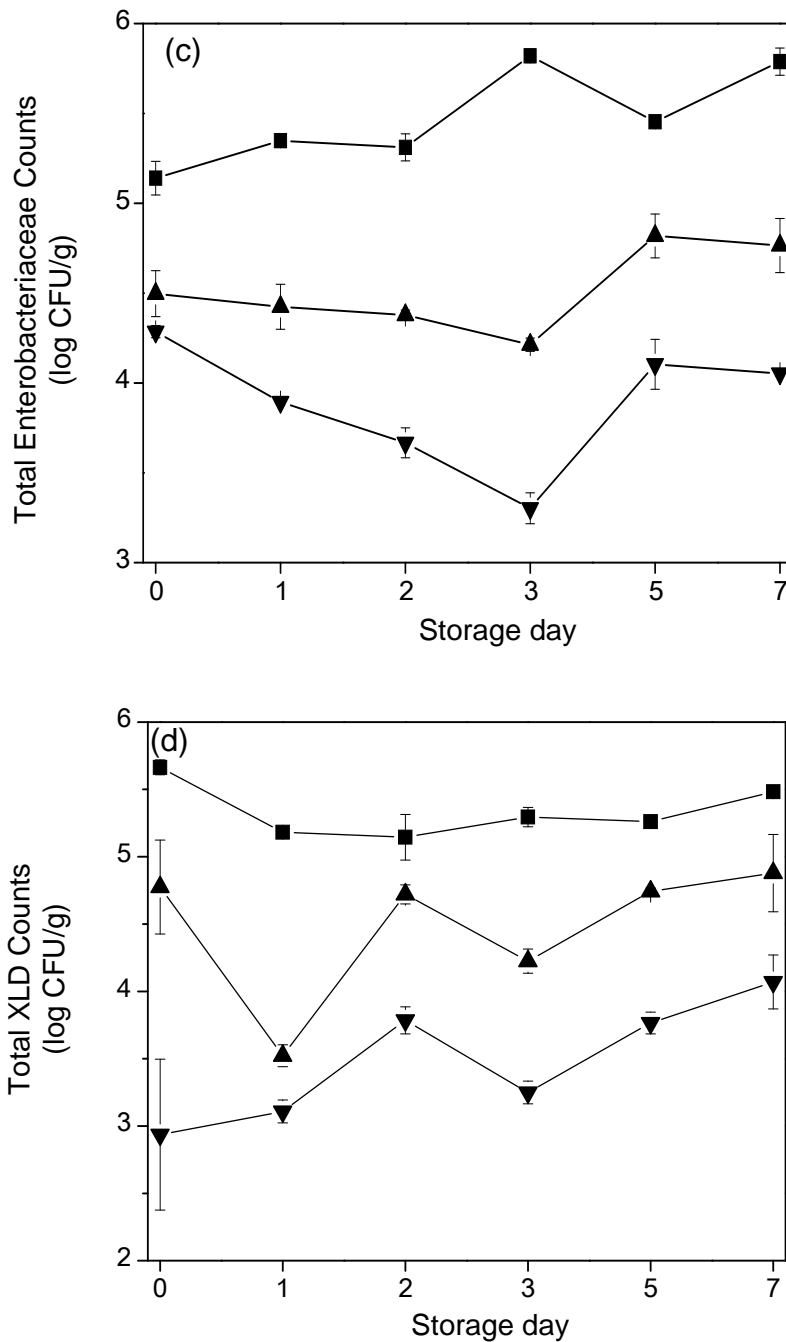
ความเข้มข้นสูงสุดของออลิโกไคโตซาน (0.4% (w/w)) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดย LAB counts มีค่า $\sim 5 \log \text{CFU/g}$ ในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 7) ($p < 0.05$)

งานวิจัยนี้ยังศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียตระกูล *Staphylococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกที่มักพบจากการปนเปื้อนของเชื้อโรคในดินหรือในกระบวนการผลิตเนื้อ ซึ่งเชื้อโรคนี้นำไปทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังหรือเนื้อเยื่อของมนุษย์ จากรูปที่ 9.4(b) และ 9.5(b) พบว่าออลิโกไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.4% (w/w) สามารถลดการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus* ได้ถึง 0.5 และ 1 log CFU/g ตามลำดับ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของออลิโกไคโตซานต่อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เช่น *Enterobacteriaceae* ที่มักพบในลำไส้ของมนุษย์หรือสัตว์หรือจากของเสีย พบว่าออลิโกไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.2% และ 0.4% (w/w) สามารถลดการเจริญเติบโตของ *Enterobacteriaceae* ในเนื้อหมูปดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ได้ถึง 1 และ 2 log CFU/g ตามลำดับ ($p < 0.05$) (รูปที่ 9.4(c) และ 9.5(c))

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของออลิโกไคโตซานในการต้าน *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มักปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดโรคท้องร่วงและอาเจียนอย่างรุนแรง การทดสอบทำโดยใช้อาหารจำเพาะ (XLD) ในการแยกเชื้อ *Salmonella* spp. ออกจากเชื้อชนิดอื่น ซึ่งเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย *Salmonella* spp. คือ มีจุดศูนย์กลางสีดำ รูปร่างกลมเงา ดังรูปที่ 9.5(d) จากการทดลองพบว่า *Salmonella* spp. สามารถเจริญเติบโตในตัวอย่างเนื้อหมูปดชุดควบคุมได้ดี โดยปริมาณ *Salmonella* spp. ที่พบอยู่ในช่วง 2-3 log CFU/g (ข้อมูลไม่แสดง) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเติมออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% (w/w) ลงในตัวอย่างเนื้อหมูปดพบว่าไม่มีเชื้อ *Salmonella* spp. เติบโตประมาณ 2 log CFU/g ในวันแรกของการทดลอง อย่างไรก็ตามภายหลังการเก็บรักษา 1 วัน พบว่าไม่พบเชื้อแบคทีเรีย (ข้อมูลไม่แสดง) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มปริมาณออลิโกไคโตซานเป็น 0.4% พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella* spp. ได้ตั้งแต่วันแรกของการทดลอง (ข้อมูลไม่แสดง) สำหรับแบคทีเรียประเภทอื่นที่เจริญบนอาหาร XLD สามารถทำการตรวจนับเป็น total XLD counts ซึ่งระบุถึงแบคทีเรียตระกูล *Enterobacteriaceae* จากการตรวจนับ total XLD counts พบว่าสารออลิโกไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียตระกูล *Enterobacteriaceae* เมื่อเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุมเช่นกัน (รูปที่ 9.4(d))





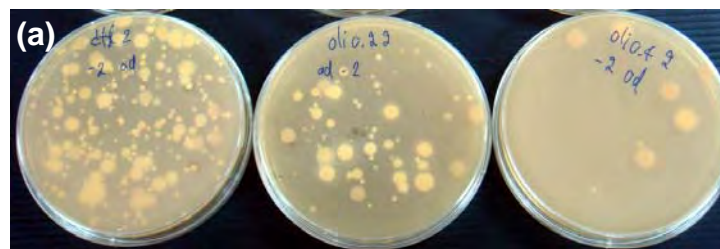
รูปที่ 9.4 Microbial counts (log CFU/g) ชนิดต่างๆ: (a) Lactic acid bacteria (b) total *Staphylococcus* counts (c) total *Enterobacteriaceae* counts และ (d) total XLD counts ของตัวอย่างเนื้อหมูบดที่ผสมออลิโกไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C : ■:ตัวอย่างควบคุม ▲:ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ ▼:ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4%

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ของออลิโกไคโตซานขึ้นกับความเข้มข้นของสารออลิโกไคโตซานที่เติมลงไป ซึ่งสอดคล้อง

กับการรายงานของคณะวิจัย Youn¹⁴ ที่กล่าวว่าสารละลายไคโตซานเข้มข้น 1% ในกรดแลคติก (120 kDa, DD 85%) สามารถยับยั้งการเติบโตของ total bacterial counts ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 วันได้ ถึงแม้ว่าไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่กลไกในการยับยั้งยังถูกเสนอหลากหลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามก็คิดกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุบวกของหมู่อะมิโนที่ถูกโปรโตเนตบนสายโซ่โพลีเมอร์ของไคโตซานและประจุลบของผนังเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เป็นกลไกหนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย การเกิดอันตรกิริยาดังกล่าวเป็นสาเหตุให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนและสารภายในเซลล์¹⁵ นอกจากนี้ยังมีผลงานวิจัยจำนวนมากที่ระบุว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซานขึ้นกับความหนาแน่นของประจุบวกซึ่งนำไปสู่อันตรกิริยาทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) ประจุบวกของไคโตซานขึ้นกับระดับการจำกัดหมู่อะซิลาตซึ่งได้กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยทั่วไปไคโตซานจะแสดงประจุบวกเมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกรด อย่างไรก็ตามก็อาจมีข้อยกเว้นไคโตซานที่ใช้ในการทดลองนี้รวมทั้งออลิโกไคโตซานอยู่ในรูปอนุภาคซึ่งเป็นของแข็ง ดังนั้นจึงต้องมีการพิสูจน์ว่าสารดังกล่าวแสดงประจุบวกหรือไม่

Day0

Dilution: 10^{-2} 10^{-2} 10^{-2}



Day5

Dilution: 10^{-3} 10^{-2} 10^{-2}



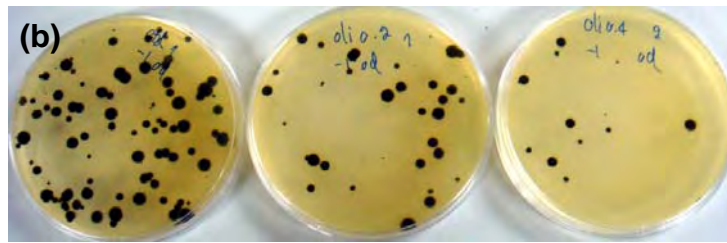
(1)

(2)

(3)

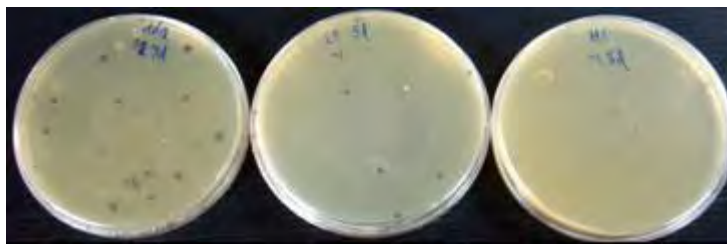
Day0

Dilution: 10^{-1} 10^{-1} 10^{-1}



Day5

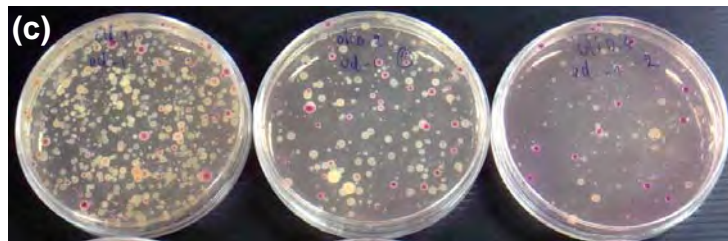
Dilution: 10^{-1} 10^{-1} 10^{-1}



(1) (2) (3)

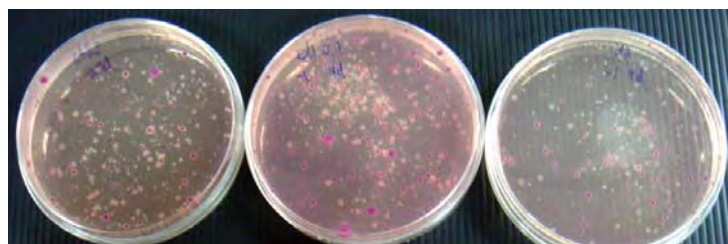
Day0

Dilution: 10^{-1} 10^{-1} 10^{-1}



Day7

Dilution: 10^{-2} 10^{-1} 10^{-1}

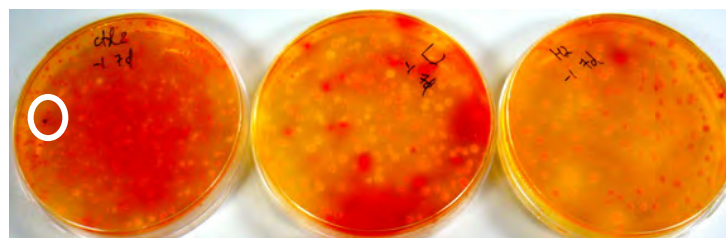


(1) (2) (3)

Day0

Dilution: 10^{-1} 10^{-1} 10^{-1} 

Day7

Dilution: 10^{-2} 10^{-1} 10^{-1} 

(1)

(2)

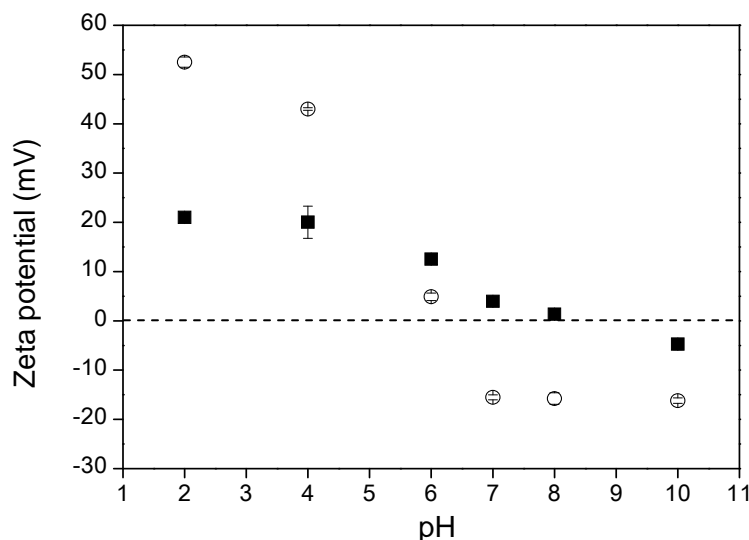
(3)

รูปที่ 9.5 Microbial counts (log CFU/g) ชนิดต่างๆ: (a) Lactic acid bacteria (b) total *Staphylococcus* counts (c) total *Enterobacteriaceae* counts และ (d) total XLD counts ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมอลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ 0.4% (w/w) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C : (1) ตัวอย่างควบคุม (2):อลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% และ (3):อลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4%

9.3.2 ค่าศักยภาพชี้ตัวของสารไลโคซานรูปแบบต่างๆ

การวิเคราะห์ค่าของศักยภาพชี้ตัวของไลโคซานมีความสำคัญต่อการศึกษาดังกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์และความสัมพันธ์ระหว่างประจุบนพื้นผิวของอนุภาคสารตัวอย่างและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ ค่าศักยภาพชี้ตัวที่วิเคราะห์ได้ไม่เพียงแต่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับประจุบนพื้นผิวของอนุภาคสารตัวอย่าง แต่ยังให้ข้อมูลด้านความเสถียรของสารตัวอย่างในตัวกลางที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ด้วย สารตัวอย่างไลโคซานที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ อลิโกไคโตซานและไลโคซานวิสเกอร์ซึ่งกระจายตัวในน้ำที่มีค่าพีเอชตั้งแต่ 2 ถึง 10 (ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกในการปรับค่าพีเอชของตัวกลางให้ได้ตามที่ต้องการ) รูปที่ 9.6 แสดงให้เห็นว่าค่าศักยภาพชี้ตัวหรือประจุบนพื้นผิวของไลโคซานวิสเกอร์และอลิโกไคโตซานเป็นบวกที่พีเอชต่ำกว่า 6 และ 8 ตามลำดับ ไลโคซานวิสเกอร์แสดงค่าศักยภาพชี้ตัวอยู่ในช่วง 40-50 เมื่อพีเอชของตัวกลางอยู่ในช่วง 2-4 บ่งบอกถึงความเสถียรในการกระจายตัวของสารสูงเมื่อเปรียบเทียบกับอลิโกไคโตซานในตัวกลางที่มีพีเอชเดียวกัน ผลการทดลองนี้สะท้อนให้เห็นว่าแรงผลักระหว่างประจุเป็นบวกบนโมเลกุลไลโค

โคซานวิสเกอร์เด่นกว่ากรณีของออลิโกโคโคซาน อย่างไรก็ตามความแรงของประจุบวกของโคโคซานวิสเกอร์และออลิโกโคโคซานลดลงเมื่อพีเอชของตัวกลางเพิ่มขึ้น ศักย์ซีต้าของโคโคซานวิสเกอร์มีค่าเป็นบวกน้อยมากหรือแทบไม่แสดงประจุเมื่อพีเอชของตัวกลางเท่ากับ 6 และมีค่าต่ำกว่ากรณีของออลิโกโคโคซาน แสดงให้เห็นว่าโคโคซานวิสเกอร์สูญเสียประจุบวกและความเสถียรในตัวกลางที่มีพีเอชเท่ากับ 6 ในขณะที่ออลิโกโคโคซานยังคงแสดงประจุบวกบนพื้นผิวและความเสถียรในการกระจายตัวระดับหนึ่ง เมื่อค่าพีเอชของตัวกลางเพิ่มขึ้นมากกว่า 7 จะเห็นได้ว่าค่าศักย์ซีต้าของโคโคซานวิสเกอร์เป็นลบ (~ -18 mV) ในขณะที่ค่าศักย์ซีต้าของออลิโกโคโคซานเข้าใกล้ 0 หรือมีค่าเป็นบวกหรือลบน้อยๆ ส่งผลให้ความเสถียรของออลิโกโคโคซานในตัวกลางที่มีค่าพีเอชมากกว่า 7 มีแนวโน้มลดลง จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการใช้งานของโคโคซานวิสเกอร์ คือ ต่ำกว่า 6 ในขณะที่ออลิโกโคโคซานมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการใช้งานต่ำกว่า 7 ข้อมูลดังกล่าวยืนยันได้ว่าสารโคโคซานทั้งสองรูปแบบมีประจุบนพื้นผิวเป็นบวก และออลิโกโคโคซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่าโคโคซานวิสเกอร์ เนื่องจากค่าพีเอชของตัวอย่างเนื้อหมูปอยู่ในช่วง 5.8-6.1 ซึ่งเป็นช่วงที่ออลิโกโคโคซานมีค่าศักย์ซีต้าที่มีความแรงของประจุบวกหรือความหนาแน่นของประจุบวกมากกว่าโคโคซานวิสเกอร์

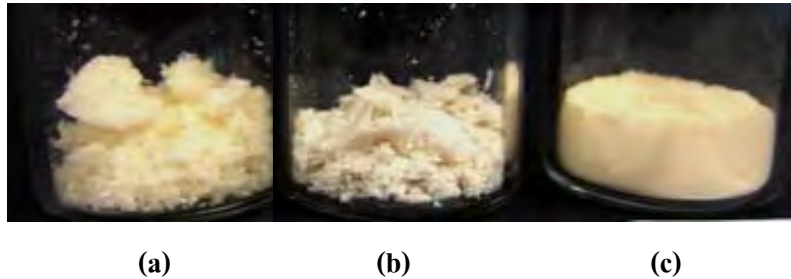


รูปที่ 9.6 ศักย์ซีต้าของสารตัวอย่างโคโคซานชนิดต่างๆ: ○:โคโคซานวิสเกอร์ และ ■:ออลิโกโคโคซาน ในสารตัวกลางที่มีการผันแปรค่าพีเอช

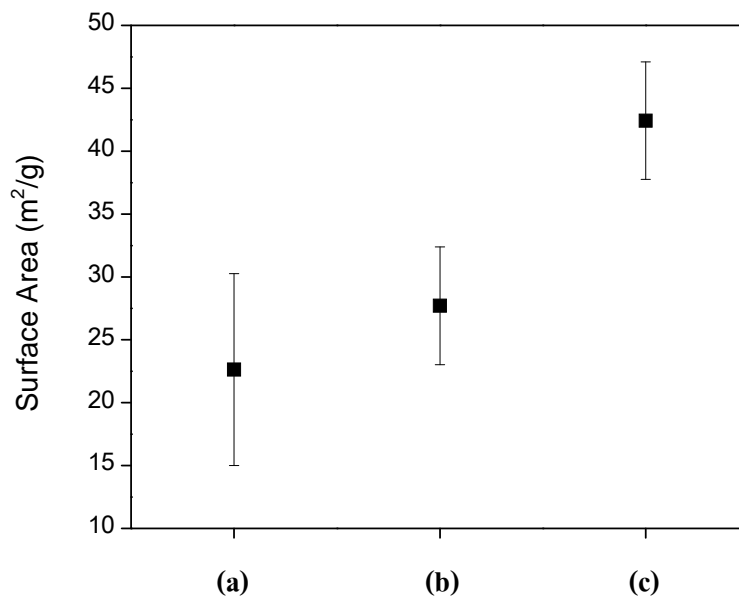
9.3.3 ลักษณะทางกายภาพและพื้นที่ผิวของสารโคโคซานรูปแบบต่างๆ

โดยทั่วไปลักษณะทางกายภาพและพื้นที่ผิวของสารจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้งานด้านอาหารและการกระจายตัวในอาหารของสารนั้นๆ ดังนั้นสารโคโคซานรูปแบบต่างๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ต้องผ่านการกำจัดน้ำโดยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) ลักษณะ

ทางกายภาพของสารโคโตซานรูปแบบต่างๆ แสดงดังรูปที่ 9.7 โคโตซานวิสเกอร์มีลักษณะคล้ายสำลีและมีการเกาะกลุ่มกันบางส่วนของอนุภาค โดยการเกาะกลุ่มเกิดขึ้นอย่างหลวมๆเมื่อเปรียบเทียบกับโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง และอนุภาคมีขนาดเล็กกว่า สำหรับออลิโกโคโตซานพบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นผงละเอียด



รูปที่ 9.7 ลักษณะทางกายภาพของสารตัวอย่างโคโตซานชนิดต่างๆ: (a) โคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (b) โคโตซานวิสเกอร์ และ (c) ออลิโกโคโตซาน



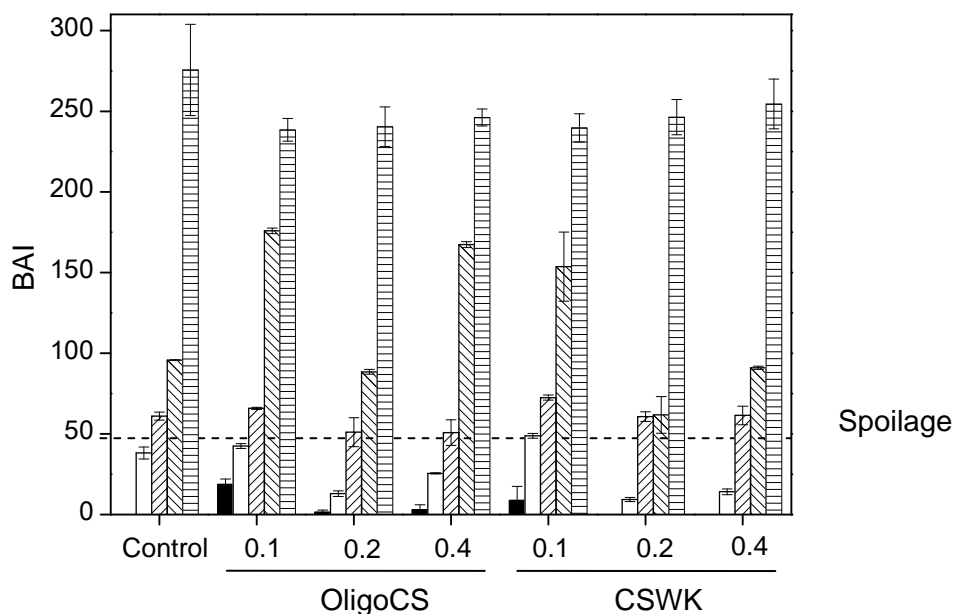
รูปที่ 9.8 พื้นที่ผิวของสารตัวอย่างโคโตซานชนิดต่างๆ: (a) โคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (b) โคโตซานวิสเกอร์ และ (c) ออลิโกโคโตซาน

นอกจากนี้ในการทดลองยังใช้เทคนิค BET ในการวิเคราะห์พื้นที่ผิวของสาร การวิเคราะห์ทำโดยการดูดซับโมเลกุลของแก๊สบนพื้นผิวของสารซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างโคโตซานและแบคทีเรีย จากรูปที่ 9.8 พบว่าออลิโกโคโตซานมีพื้นที่ผิวสูงที่สุด (~ 43 m²/g) รองลงมาคือโคโตซานวิสเกอร์ (~ 28 m²/g) และโคโตซานน้ำหนักโมเลกุลสูง (~ 22 m²/g)

ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าทั้งออลิโกไคโตซานและไคโตซานวิสเกอร์สามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของอาหารประเภทเนื้อหมูปกติ และออลิโกไคโตซานให้ผลดีที่สุด

9.3.4 ปริมาณไบโอเจนิคเอมีนในเนื้อหมูปกติผ่านการทรีตด้วยสารไคโตซานรูปแบบต่างๆ

ไบโอเจนิคเอมีน คือ สารประกอบไนโตรเจนที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ มักพบในอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง¹⁶ ไบโอเจนิคเอมีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของอาหาร¹⁷ อย่างไรก็ตามไบโอเจนิคเอมีนอาจเกิดจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียหรือจากจุลินทรีย์ทั่วไป ไบโอเจนิคเอมีนมีหลายรูปแบบทั้งแบบโซ่ตรง (putrescine, cadaverine, spermine, spermidine) แบบวง (histamine, tryptamine) หรือแบบอโรมาติก (tyramine, phenylethylamine) คณะวิจัยของ Santos¹⁸ และ Hernández-Jover¹⁹ ได้เสนอเกี่ยวกับการใช้ค่าไบโอเจนิคเอมีน (BAI = cadaverine + putrescine + tyramine + histamine) เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพอาหาร ดังนี้ ค่า BAI < 5 mg/kg หมายถึงเนื้อสด BAI = 5-20 mg/kg หมายถึงเนื้อยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้แต่เริ่มมีการเสื่อมเสีย BAI = 20-50 mg/kg หมายถึงเนื้อมีคุณภาพต่ำ และ BAI > 50 mg/kg หมายถึงเนื้อเน่าเสีย



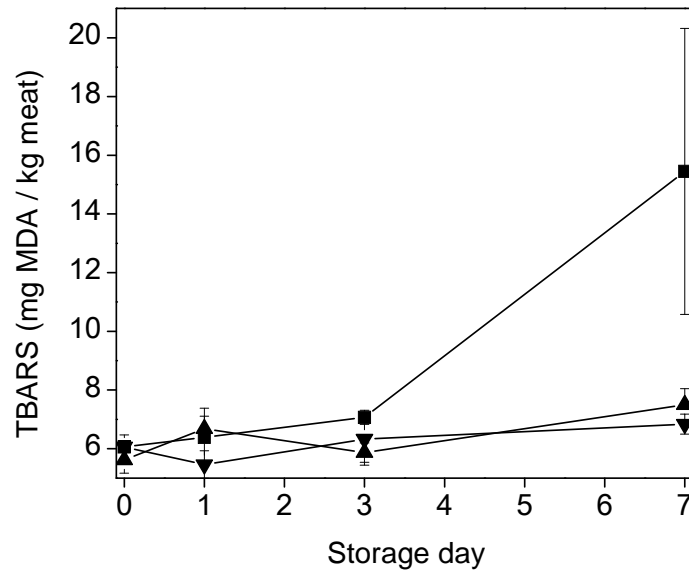
รูปที่ 9.9 BAI ของตัวอย่างเนื้อหมูปกติที่ผสมสารตัวอย่างไคโตซานที่มีการผันแปรชนิดและความเข้มข้น และผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ: ■:0 วัน □:1 วัน ▨:2 วัน ▩:3 วัน และ ▭:7 วัน

รูปที่ 9.9 แสดงค่าไบโอเจนิคเอมีน (BAI) ของตัวอย่างเนื้อหมูปดในระหว่างการเก็บรักษา ในช่วง 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า BAI มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งให้เห็นว่าคุณภาพของเนื้อหมูปดลดลง ภายหลังจากการเก็บรักษา 1 วัน พบว่าตัวอย่างที่ผสมอลิโกไคโตซานและไคโตซานวิสเกอร์ความเข้มข้น 0.2% ขึ้นไปมีค่า BAI อยู่ในช่วง 5-20 ซึ่งเป็นช่วงที่เนื้อยังมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.2% ให้ค่า BAI อยู่ในช่วง 20-50 ซึ่งแสดงถึงเนื้อที่มีคุณภาพต่ำ และภาพหลังการเก็บรักษา 2 วัน พบว่าค่า BAI ที่ตรวจพบสูงเกินค่าที่ยอมรับได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งอลิโกไคโตซานและไคโตซานวิสเกอร์ไม่มียผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ในตระกูลที่สามารถผลิตไบโอเจนิคเอมีนได้

9.3.5 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไขมันในเนื้อหมูปดที่ผ่านการทรีตด้วยสารไคโตซานรูปแบบต่างๆ

ออกซิเดชันของไขมันเป็นตัวแปรหนึ่งที่สำคัญในการบ่งชี้การเน่าเสียของอาหาร โดยทั่วไปไขมันในอาหารสามารถเกิดออกซิเดชันได้ง่ายในสถานะที่มีตัวเร่ง เช่น แสง ความร้อน และ เอนไซม์ เป็นต้น ออกซิเดชันของไขมันมักพบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่อยู่ในระหว่างการเก็บรักษา มากกว่าผลิตภัณฑ์เนื้อสด²⁰ โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิที่เกิดจากออกซิเดชันของไขมันคือไฮโดรเปอร์ออกไซด์ซึ่งสลายตัวอย่างรวดเร็ว และสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ เช่น สารประกอบอัลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิที่เกิดจากออกซิเดชันของไขมัน โดยใช้เทคนิค TBARS²¹

ในการทดลองนี้ได้เลือกเนื้อหมูปดที่ผ่านการทรีตด้วยอลิโกไคโตซานมาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของไขมัน เนื่องจากอลิโกไคโตซานมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด รูปที่ 9.10 แสดงค่า TBARS ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมอลิโกไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ โดยวันแรกของการเก็บรักษาพบว่า TBARS มีค่าประมาณ 5-7 mg MDA / kg of meat ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน พบว่า TBARS ของตัวอย่างชุดควบคุมมีค่าสูงกว่า TBARS ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมอลิโกไคโตซาน และค่า TBARS ของตัวอย่างเนื้อหมูปดที่ผสมอลิโกไคโตซานต่ำกว่ากรณีของตัวอย่างชุดควบคุมอย่างชัดเจนในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา ($p < 0.05$) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอลิโกไคโตซานสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อหมูปดได้ ซึ่งอาจมาจากเหตุผลที่ว่าไคโตซานมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของอนุพันธ์ไขมันได้^{22, 23, 24}



รูปที่ 9.10 TBARS ของตัวอย่างเนื้อหมูบดที่ผสมออริกาโนไลโคโตซานความเข้มข้นต่างๆ และผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ■: control ▲: ออริกาโนไลโคโตซานเข้มข้น 0.2% และ ▼: ออริกาโนไลโคโตซานเข้มข้น 0.4%

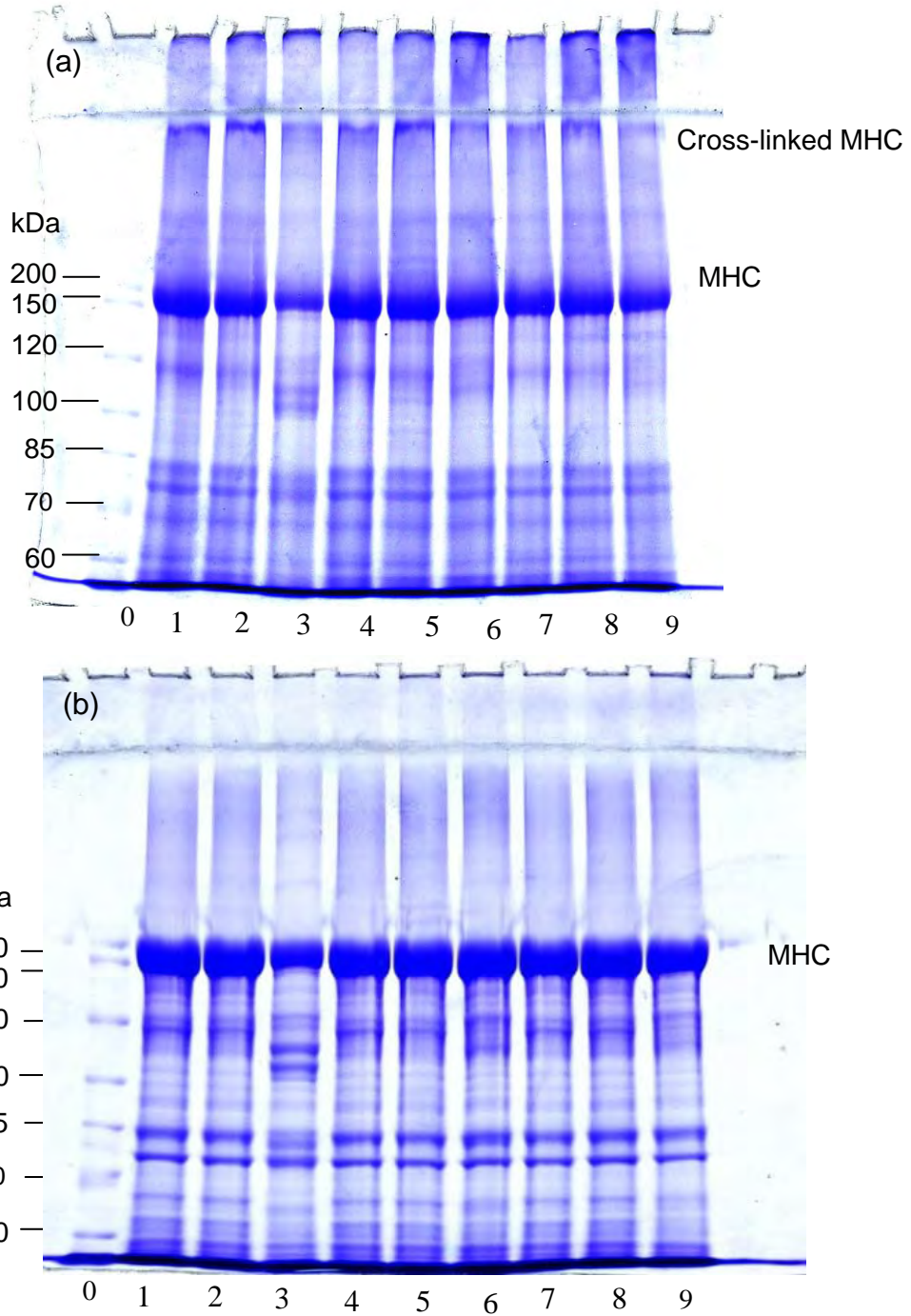
9.3.6 การวิเคราะห์ห่ออกซิเดชันของโปรตีนในเนื้อหมูบด โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE of myofibrillar proteins

นอกจากปัจจัยเกี่ยวกับการออกซิเดชันของไขมันแล้ว การออกซิเดชันของโปรตีนยังเป็นสาเหตุหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของอาหาร เนื่องจากโปรตีนสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนได้ ดังนั้นการออกซิเดชันของโปรตีนในกล้ามเนื้อของสัตว์จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ (WHC) และเกิดการเปลี่ยนแปลงความเสถียรของโปรตีน^{25, 26} คณะวิจัยของ Davies ได้รายงานว่าการออกซิเดชันของโปรตีนสามารถเกิดผ่านกลไกปฏิกิริยาลูกลูโซ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะเปปไทด์ การเปลี่ยนแปลงหมู่อะมิโนที่โซ่กิ่ง และการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของโปรตีนซึ่งเกิดได้โดยผ่านกลไกของการเกิดการออกซิเดชันของหมู่ cysteine thiol ทำให้เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ การเกิด dityrosine และการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลในโปรตีนและหมู่อะมิโนของ lysine²⁷

SDS-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อหมูบดภายใต้สภาวะที่มีและไม่มี β-mercaptoethanol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น reducing agent แสดงดังรูปที่ 9.11 เทคนิคนี้ใช้เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไมโอไฟบริลซึ่งเป็นโปรตีนไมโอซินเส้นใยชนิดหนัก (myosin heavy chain, MHC) ที่ว่องไวต่อการออกซิไดซ์ ภายใต้สภาวะที่ปราศจาก reducing agent ดังรูปที่ 9.11 (a) แถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 200 kDa (cross-linked MHC) ถูกพบที่ตำแหน่งบนสุดของเจล

ซึ่งโปรตีนนี้อาจเกิดจากการเชื่อมต่อของพันธะไดซัลไฟด์ หรืออาจเป็นพันธะอื่นๆ อาทิเช่น ditryptophan และ dityrosine cross-linked protein²⁸ เนื้อหุบคุดควบคุมที่ผ่านการเก็บรักษา 0 และ 3 วัน แสดงแถบของโปรตีน cross-linked MHC ชัดเจนที่สุดเมื่อเทียบกับกรณีของตัวอย่างเนื้อหุบคุดที่ผสมอลิโกไคโตซาน อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของตัวอย่างเนื้อหุบคุดที่ผสมอลิโกไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่างกัน ไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาเนื้อหุบคุดที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน พบว่าแถบของ cross-linked MHC และแถบของ MHC ของตัวอย่างเนื้อหุบคุดควบคุมจางลง และมีแถบโปรตีนตำแหน่งใหม่ปรากฏที่บริเวณมวลโมเลกุลช่วง 97 ถึง 105 kDa ซึ่งต่ำกว่าแถบของ cross-linked MHC และ MHC ซึ่งให้เห็นว่าการออกซิเดชันของโปรตีนนำไปสู่การแตกของพันธะโปรตีน

สำหรับผลการทดสอบภายใต้สภาวะที่มี reducing agent แสดงดังรูปที่ 9.11 (b) ซึ่งพบว่าแถบโปรตีน cross-linked MHC ไม่ปรากฏบน SDS-PAGE บ่งบอกถึงการเชื่อมโยงของโปรตีนเกิดจากการเชื่อมต่อของพันธะไดซัลไฟด์ นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษาเนื้อหุบคุดนาน 3 วัน จนถึงสิ้นสุดการทดลอง อย่างไรก็ตามพบการแตกของพันธะโปรตีน MHC ของตัวอย่างเนื้อหุบคุดควบคุม ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกันกับการทดลองในสภาวะที่ไม่มี reducing agent สาเหตุหลักของการสลายพันธะโปรตีน MHC อาจมาจากการออกซิเดชันของโปรตีน²⁹ การย่อยภายในเซลล์ของกล้ามเนื้อโปรตีน หรือเอนไซม์ของโปรตีน³⁰ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอลิโกไคโตซานสามารถช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของโปรตีนในเนื้อสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 9.11 SDS-PAGE patterns ของโปรตีนที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อหมูปอดในระหว่างการเก็บรักษา (a) ภายใต้สภาวะที่ไม่มี β -mercaptoethanol (b) ภายใต้สภาวะที่มี β -mercaptoethanol: แถบที่ 0: protein marker; แถบที่ 1-3: ตัวอย่างควบคุม; แถบที่ 4-6: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.2% ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 3 และ 7 วัน; แถบ 7-9: ออลิโกไคโตซานเข้มข้น 0.4 % ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 3 และ 7 วัน; MHC: myosin heavy chain

9.4 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยในบทนี้ได้ศึกษาการใช้สารโคโคซานในรูปแบบต่างๆ เช่น ออลิโกโคโคซาน และโคโคซานวิสเกอร์ ในการต้านจุลินทรีย์ในอาหารต้นแบบประเภทเนื้อหมูด โดยพบว่าออลิโกโคโคซานในรูปแบบอนุภาคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบในเนื้อหมูดมากที่สุด ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของสารออลิโกโคโคซานขึ้นกับความหนาแน่นของประจุบวกบนโมเลกุล พื้นที่ผิว รูปร่าง และปริมาณของสาร นอกจากนี้ออลิโกโคโคซานยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูดได้โดยผ่านกลไกการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น ออกซิเดชันของไขมันหรือโปรตีนของเนื้อสัตว์ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามตัวอย่างเนื้อหมูดที่ผสมออลิโกโคโคซานยังคงมีปริมาณไบโอเจนิคเอมีนสูง อาจเนื่องมาจากออลิโกโคโคซานไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในตระกูลที่สามารถผลิตไบโอเจนิคเอมีนได้

9.5 เอกสารอ้างอิง

1. Majeti, N.V.; and Kumar, R. Reaction and Functional Polymer 2000, 46, 1-27.
2. Sagoo, S.; Board, R.; and Roller, S. Food Microbiology 2002, 19, 175-182.
3. Tokura, S.; Miuray, Y.; Johmen, M.; Nishi, N.; and Nishimura, S. I. Journal of Control Release 1994, 28, 235-241.
4. No, H.K.; Meyers, S.P.; Prinyawiwatkul, W.; and Xu, Z. International Journal of Food, 2007, 72, 87-100.
5. Fan, L.; Du, Y.; Zhang, B.; Yang, J.; Zhou, J.; and Kennedy, J.F. Carbohydrate Polymer 2006, 65, 447-452.
6. Sun, L.; Du, Y.; Fan, L.; Chen, X.; and Yang, J. Polymer 2006, 47, 1796-1804
7. Kim, S.K.; and Rajapakse, N. Carbohydrate Polymer 2005, 62, 357-368.
8. Nair, K.G.; and Dufresne, A. Biomacromolecules 2003, 4, 657-665.
9. Phongying, S., Aiba, S., and Chirachanchai, S. Biopolymer 2006, 83, 280-288.
10. Herná'ndez-Jover, T.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogue's, M.T.; and Vidal-Carou, C.M. Food Chemistry 1996, 44, 3097-3101
11. Nirmal, N.P.; and Benjakul, S. Food Control 2010, 21, 1263-1271.
12. Laemmli, U.K. Nature 1970, 227, 680-685.
13. Steel, R.G.D.; and Torries, J.H. 2nd Edn, McGraw-Hill, New York, USA 1970.
14. Youn, S.K.; Her, J.H.; Kim, Y.J.; Choi, J.S.; Park, S.M.; and Ahn, D.H. Journal of Korean Social Food Science Nutrition 2004, 33, 207-211.
15. Sudharshan, N.R.; Hoover, D.G.; and Knorr, D. Food Biotechnology 1992, 6, 257-272.

16. Vinci, G.; and Antonelli, M.L. B. *Food Control* 2002, 13, 519-524.
17. Yano, Y.; Kataho, N.; Watanabe, M.; and Nakamura, T. *Food Chemistry* 1995, 54, 155-159.
18. Silla Santos, M.H. *International Journal of Food Microbiology* 1996, 29, 213-231
19. Herná'ndez-Jover, T.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogue's, M.T.; and Vidal-Carou, C.M. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 1996, 44, 3097-3101
20. Hansen, E.; Juncher, D.; Henckel, P.; Karlsson, A.; Bertelsen, G.; and Skibsted, L. *Meat Science* 2004, 68, 479-484.
21. Kamal-Eldin, A.; Makinen, M.; and Lampi, A. M. AOCS Press, Champaign, Illinois 2003, 1-36.
22. Park, P. J.; Je, J. Y.; and Kim S. K. *Carbohydrate Polymer* 2004, 55, 17-22.
23. Wenjiao, F.; Junxiu, S.; Yunchuan, C.; Jian, Q.; Yan Z.; and Yuanlong, C. *Food Chemistry* 2009, 115, 66-70.
24. Cho, Y.S.; Kim, S.K.; and Je, J.Y. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter* 2011, 21, 3070-3073.
25. Xiong, Y. L.; Decker, E.; and Faustman, C. Wiley 2000, 85-111.
26. Davies, M. J.; and Dean, R. T. Oxford Science Publications 2003, Oxford.
27. Marianne, N.; Lund, Rene.; Lametsch, Marchen.; Hviid, S.; Jensen, O.N.; and Skibsted, L.H. *Meat Science* 2007, 77, 295-30
28. Park, D.; Xiong, Y.L.; and Alderton, A.L. *Carbohydrate Polymer* 2011, 101, 1239-1246.
29. Martinaud, A.; Mercier, Y.; Marinova, P.; Tassy, C.; Gatellier, P.; and Renerre, M. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 1997, 45, 2481-2487.
30. Masniyom, P.; Benjakul, S.; and Visessanguan, W. *Journal of Food Biochemistry* 2004, 28, 43-60.