

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

1. เปลือกกุ้ง (อนุเคราะห์จากโรงงานแช่เยือกแข็งกุ้ง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี)
2. สาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* (อนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. จาร์เทส (Jar test)(FC6S, Velp Scientifica, Italia)
2. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Eutech, Cybernetics, Cyberscan pH1000, USA)
3. เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius, Germany)
4. เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง(Sartorius, Germany)
5. หม้อนึ่งความดัน (H91 LL, Kokusan, Japan)
6. เครื่องบดขนาด (Dietz, Retsch Muhle, Germany)
7. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (1350FX, Shel Lab, USA)
8. ตู้อบลมร้อนแบบลาด (N003, Permat, Germany)
9. ตู้อบ (ULE600, Memmert, USA)
10. แอนดรีแฟล็กโตมิเตอร์ (S-28, Atago, Japan)
11. เครื่องกวนแม่เหล็ก (M21/1, Framo-Geratetechnik, France)
12. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic, Spectronic Genesys 5, USA)
13. เครื่องหมุนเหวี่ยง (RC 5C Plus, Du Pont Company Sorvall, USA)
14. เครื่องสูบลมสุญญากาศ (suction pump)(0322-V4-G 21 DX, GAST, USA)
15. เครื่องวัดความขุ่น (Turbidimeter) (2100N, Hach, USA)
16. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic, Spectronic Genesys5, USA)
17. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge Tube)
18. เครื่องวัดความหนืด (Brocfield, DV-III, USA)
19. เครื่องวัดความหนืด (Cole-Parmer Ubbelohde Viscometer ขนาด 0 B)
20. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
21. เครื่องปั่น (Homogenizer)

22. โถทำแห้ง (desicator)
23. กรวยบุชเนอร์
24. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
25. เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ ขวด Duran กระบอกตวง ปิเปต

แท่งแก้วคนสาร เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) และขวดปริมาตร (Volumetric Flask)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)(Commercial grade, Merck Darmstadt, Germany)
2. ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) (AR grade, Merck, Germany)
3. กรดอะซิติก (acetic acid) (AR grade, Merck, Germany)
4. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)(Commercial grade, Merck Darmstadt, Germany)
5. โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate)
6. กรดซิตริก (citric acid)(AR grade, Merck Darmstadt, Germany)
7. 1-n Hexadecylpyridinium chloride monohydrate
8. สารละลายโพลิไวนิลซัลเฟต (N/400 Potassium Polyvinyl Sulfate, PVSK)(AR Grade, Wako, Japan)
9. อินดิเคเตอร์โทลูไอดีน บลู (toluidine blue) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
10. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) (AR grade, Merck Darmstadt, Germany)
11. สารละลาย BSA (Albumin from Bovine Serum) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
12. โฟลีนรีเอเจนท์ (Folin-Phenol Reagent)(AR Grade, Carlo, Erba, France)
13. 2,6-ไดคลอโรอินโดฟีโนล (2,6-dichloroindophenol)
14. แอสคอร์บิกบริสุทธิ์ (Pure ascorbic acid)
15. กรดเมตาฟอสเฟอริก (metaphosphoric acid)

3.4 ขั้นตอนดำเนินการทดลอง

3.4.1 การเตรียมโคติน

เตรียมโดยใช้วิธีของเยาวภา ไหวพริบ (2534) และเยาวภา ไหวพริบ และคณะ (2534) โดยมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ นำเปลือกกุ้งแห้ง 20 กิโลกรัม มาทำจัดแร่ธาตุ(demineralization) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายกรด (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง และชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการกำจัดโปรตีน (deproteinization) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายด่าง (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 55 ± 2 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง และชั่งน้ำหนัก สุดท้ายจะได้โคติน รูปขั้นตอนการเตรียมโคตินแสดงได้ดังภาพที่ 3-1

เปลือกกุ้งแห้ง 20 กิโลกรัม



กำจัดแร่ธาตุ (demineralization) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายกรด (w/v) เป็น 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด



อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก



กำจัดโปรตีน (deproteinization) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายด่าง (w/v) เป็น 1:20 กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 ± 2 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง



อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก



โคติน

ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมโคติน (เยาวภา ไหวพริบ, 2534; เยาวภา ไหวพริบ และคณะ, 2534)

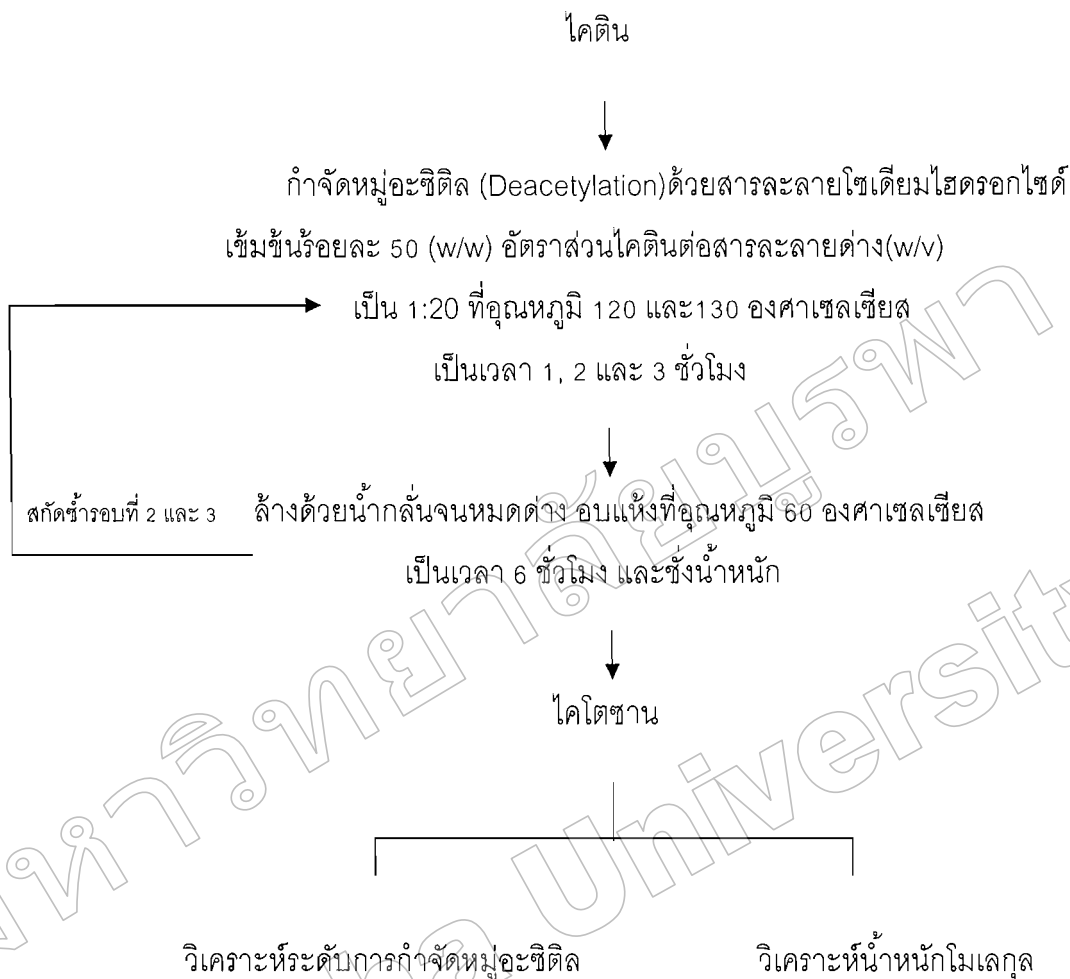
3.4.2 การเตรียมโคโตซาน

เตรียมโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของนันธिया เจียบแหลม (2548) โดยมีขั้นตอนการผลิตดังนี้ นำโคตินที่ได้ มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราส่วนโคตินต่อสารละลายต่าง 1:20 (W/V) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ เวลา และจำนวนซ้ำในการสกัดต่าง ๆ กัน แสดงได้ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนซ้ำที่ใช้ในการผลิตโคโตซาน ที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซีติล และน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา(ชั่วโมง)	จำนวนซ้ำในการสกัด
120	1	1
120	2	1
120	1	2
130	3	2
130	1	3
130	2	3

หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนเป็นกลางและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะแห้ง ได้โคโตซาน สรุปขั้นตอนการเตรียมโคโตซานแสดงได้ดังภาพที่ 3-2 นำไปวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซีติลโดยวิธี Colloid Titration (มงคล สุขวัฒนาสินธุ์, 2544) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Intrinsic Viscosity (วิภาวี โฮვნั่น, 2544) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข้อ ก-1 และ ข้อ ก-2 ตามลำดับ สรุปขั้นตอนการเตรียมโคโตซาน แสดงได้ดังภาพที่ 3-2



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการเตรียมโคโตซาน (นันทิยา ฉะยมแหลม, 2548)

3.4.3 การเตรียมสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans*

สาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี เลี้ยงที่ความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (ppt) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 4,000 ลักซ์ ใช้อาหารสูตรกิลลาร์ด (F/2) (Guillard, 1995) ร่ายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ข ทำการเลี้ยงเริ่มต้นที่ความหนาแน่นของสาหร่าย 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จนสาหร่ายเจริญเติบโตอยู่ในช่วง exponential phase ซึ่งสาหร่ายจะมีความหนาแน่นของเซลล์สูง จึงนำสาหร่ายมาทำการตกตะกอนต่อไป

3.5 ศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติล pH และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans*

ศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซาน pH และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* ดังนี้

3. ปัจจัยที่ศึกษามี 3 ปัจจัยได้แก่

- ระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซาน เป็น 3 ระดับ คือ CS-A (80.58 ± 0.41 %DD), CS-B (83.34 ± 0.38 %DD) และ CS-C (89.95 ± 0.15 %DD)

- ค่า pH เป็น 6.00, 7.00 และ 8.00

- ความเข้มข้นของสารตกตะกอนเป็น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องจาร์เทสต์

โดยเติมสาหร่ายปริมาตร 600 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และปรับ pH เติมสารละลายไคโตซานสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กวนแบบเร็ว โดยตั้งค่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นกวนแบบช้า โดยตั้งค่าความเร็ว 30 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) หยุดเครื่องกวน และเก็บตัวอย่างส่วนใสโดยวัดจากผิวน้ำลงมา 5 เซนติเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทันทีกี่เวลา 0, 15, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของส่วนใสและส่วนตะกอน

3.3 การติดตามผลการตกตะกอน

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง มาวิเคราะห์และติดตามผลการตกตะกอนดังนี้

3.3.1. การวิเคราะห์ส่วนใส

3.3.1.1. ปริมาณของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธีโฟลินหรือลาวรี (Folin or Lowry method) (Copeland, 1993) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก.2-1

3.3.1.2. ความขุ่น

วิเคราะห์ความขุ่นในหน่วย NTU รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก.2-2

3.3.1.3. ค่าของแข็งทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS)

วิเคราะห์โดยวิธีการทำให้แห้งที่ 103-105°C (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย, 2545) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-3

3.3.1.4. ค่าของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids; SS)

วิเคราะห์โดยวิธีการกรองและทำให้แห้งที่ 103-105°C (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย, 2545) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-4

3.3.1.5. ค่า OD₆₀₀ (ประสิทธิภาพในการตกตะกอน)

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรนิค 70 ดัดแปลงจาก Lubian (1989) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-5

3.3.2. การวิเคราะห์ส่วนตะกอน

นำตัวอย่างที่ตกตะกอนได้อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ อุณหภูมิ 60 °C จนมีน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

3.3.2.1. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl Method ตามวิธี AOAC ข้อ 920.105 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-1

3.3.2.2. ปริมาณเถ้า

วิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยวิธีของ AOAC ข้อ 935.42 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-2

3.3.2.3. ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีของ AOAC ข้อ 977.11 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-3

3.4 วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) 3x3x6 โดยมีระดับการ

กำจัดหมู่อะซิติลของโคโคซาน 3 ระดับ ได้แก่ CS-A (80.58±0.41 %DD), CS-B (83.34±0.38 %DD)

และ CS-C (89.95±0.15 %DD) pH 3 ระดับ ได้แก่ 6.00, 7.00 และ 8.00 และความเข้มข้นของ

โคโคซาน 6 ระดับ ได้แก่ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

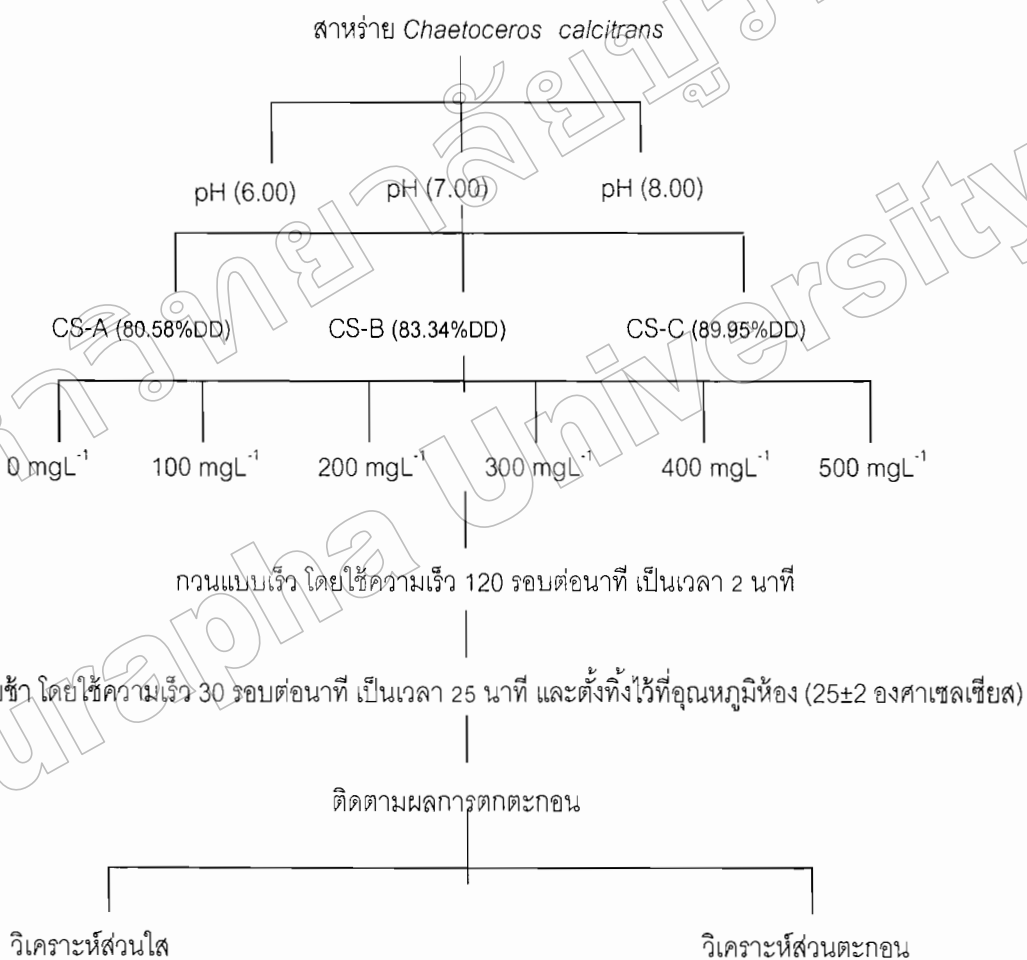
นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab

version 15.0 และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA)

และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5

(SAS Institute Cary North Carolina USA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละทรีตเมนต์ โดยใช้ Duncan's New Multiple Ranges Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (จรัญ จันทลักษณ์, 2540)

สรุปขั้นตอนการศึกษามลของระดับการกำจัดหมู่อะซีติลของโคโคซาน pH และความเข้มข้นของสารตกตะกอนต่อการตกตะกอนสาหร่าย แสดงได้ดังภาพที่ 3-3



ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการศึกษามลของระดับการกำจัดหมู่อะซีติล pH และความเข้มข้นของโคโคซานต่อการตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans*

ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุล pH และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการ

ตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans*

ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน pH และความเข้มข้นของไคโตซานต่อการตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* ดังนี้

1. ปัจจัยที่ศึกษามี 3 ปัจจัยได้แก่

- น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน 3 ชนิด คือ CS-D (3.00×10^5) Da, CS-E (2.00×10^5) Da และ CS-F (1.10×10^5) Da
- ค่า pH เป็น 6.00, 7.00 และ 8.00
- ความเข้มข้นของสารตกตะกอนเป็น 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัม

ต่อลิตร

2. ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องจาร์เทสต์

โดยเติมสาหร่ายปริมาณ 600 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และปรับ pH เติมสารละลายไคโตซานสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร กวนแบบเร็ว โดยตั้งค่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นกวนแบบช้า โดยตั้งค่าความเร็ว 30 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) หยุดเครื่องกวน และเก็บตัวอย่างส่วนใสโดยวัดจากผิวน้ำลงมา 5 เซนติเมตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทันทีกี่เวลา 0, 15, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพของส่วนใสและส่วนตะกอน

3. การติดตามผลการตกตะกอน

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลอง มาวิเคราะห์และติดตามผลการตกตะกอนดังนี้

3.1 การวิเคราะห์ส่วนใส

3.1.1. ความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธีโฟลินหรือลาวรี (Folin or Lowry method) (Copeland, 1993) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก.2-1

3.1.2. ความขุ่น

วิเคราะห์ความขุ่นในหน่วย NTU รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก.2-2

3.1.3. ค่าของแข็งทั้งหมด (Total Suspended Solids; TSS)

วิเคราะห์โดยวิธีการทำให้แห้งที่ 103-105°C (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย, 2545) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-3

3.1.4. ค่าของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids; SS)

วิเคราะห์โดยวิธีการกรองและทำให้แห้งที่ 103-105°C (วิศวกรรมสถานแห่งประเทศไทย, 2545) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-4

3.1.5. ประสิทธิภาพในการตกตะกอน

ทำการวัดค่าการตกตะกอนด้วยเครื่องสเปคโตรนิค 70 ดัดแปลงจาก Lubian (1989) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.2-5

3.2. การวิเคราะห์ส่วนตะกอน

นำตัวอย่างที่ตกตะกอนได้อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ อุณหภูมิ 60 °C จนมีน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

3.2.1. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl Method ตามวิธี AOAC ข้อ 920.105 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-1

3.2.2. ปริมาณเถ้า

วิเคราะห์ปริมาณเถ้า โดยวิธีของ AOAC ข้อ 935.42 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-2

3.2.3. ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธีของ AOAC ข้อ 977.11 (AOAC, 1990) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.3-3

4. วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Design) 3x3x6 โดยมีน้ำหนัก

โมเลกุลของโคโตซาน 3 ระดับ ได้แก่ CS-D (3.00×10^5) Da, CS-E (2.00×10^5) Da และ CS-F (1.10×10^5) Da pH 3 ระดับ ได้แก่ 6.00, 7.00 และ 8.00 และความเข้มข้นของโคโตซาน 6 ระดับ

ได้แก่ 0, 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลมา

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version 15.0

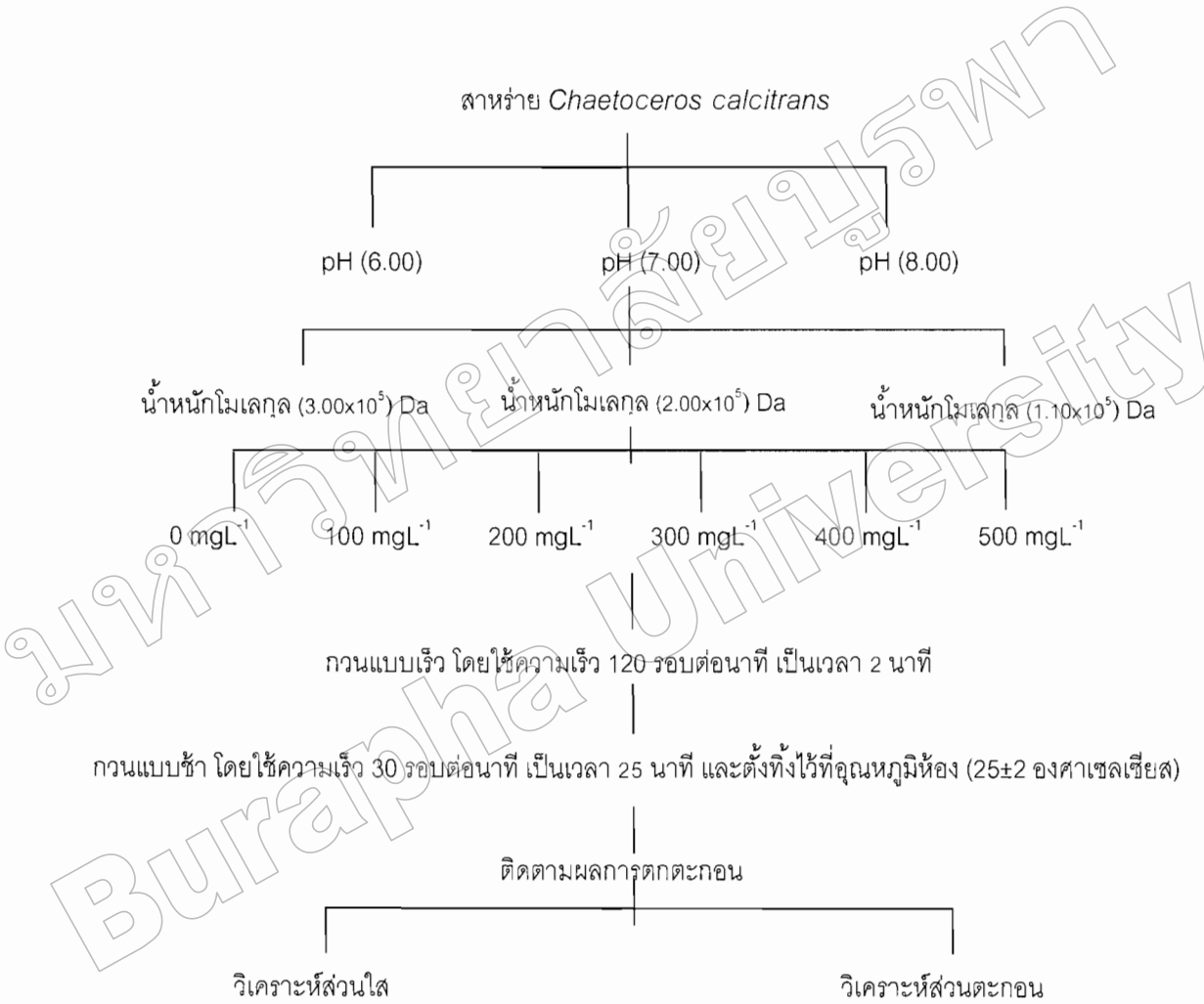
และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 (SAS Institute Cary North Carolina

USA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละ

พรีเทเมนต์ โดยใช้ Duncan's New Multiple Ranges Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (จรัญ จันทลักขณา, 2540)

สรุปขั้นตอนการศึกษามลของน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซาน pH และความเข้มข้นของสารตกตะกอนต่อการตกตะกอนสาหร่าย แสดงได้ดังภาพที่ 3-4



ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการศึกษามลของน้ำหนักโมเลกุล pH และความเข้มข้นของโคโตซานต่อการตกตะกอนสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans*