

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. เปลือกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทจันทบุรีซีฟู้ดส์ ต. นายายอาม อ. นายายอาม จ. จันทบุรี
2. แก่นหมึก (*Loligo lessoniana*) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยยูเนียนโพรเซ่นโปรดักส์ จำกัด (มหาชน) ต. ท่าทราย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร
3. เปลือกปู (*Portunus pelagicus*) ได้รับความอนุเคราะห์จากหมู่บ้านชาวประมงบางพระ ต. บางพระ อ. ศรีราชา จ. ชลบุรี

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Vibrio paraheamolyticus*
2. *Vibrio cholerae*
3. *Escherichia coli*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Listeria monocytogenes*

ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องชั่งหยาบ (AC211S, Sartorius, Germany)
2. เครื่องชั่งละเอียด (AC2115-00MS, Sartorius, Germany)
3. เครื่องวัดพีเอช (Cyberscan pH1000, Cybertetics, Eutech, USA)
4. เครื่องนับโคโลนี (Colony Counter) (Stuart Scientific, UK)
5. เครื่องผสม (Vortex Mixer)(Relax 2000, Heidolph, Germany)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (RC-5C Plus, Sorvall Centrifuge, USA)
7. เครื่องปั่นผสมอาหาร (K5 SS, Kitchen Aid)
8. เครื่องวัดค่าสี (Colorimeter) (Model BYK; Gardner, Germany)

9. เครื่องวิเคราะห์ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (600-717-996, Water, USA)

10. เครื่อง GPC (Gel Permeation Chromatography) (รุ่น PL-GPC 110, USA)
11. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic Genesys 5, Spectronic, USA)
12. เครื่องวิเคราะห์โปรตีนและไนโตรเจน (B-323 Distillation Unit, Buchi, USA)
13. เครื่องบ่มเขย่า (Shaker Incubator) (Innova 2000, New Brunswick Scientific, USA)
14. เครื่องบดหยาบ (Dietz, Restsch Muhle, Germany)
15. เครื่องบดละเอียด (Centrifugal Mill) (ZM 1000, Restsch, Singapore)
16. เครื่องกลั่นน้ำ (Optima Plus 30, Elga, USA)
17. เครื่องกวนแม่เหล็ก (M21/1, Framo-Geraterachnik, France)
18. เครื่องศึกษาตั้งปฏิกิริยาเคมี (Chemical Reactir Taching Equipment) (CE6/7/8,

Leyblod Didactic, Germany)

19. เครื่องวัดความหนืด (DV-III, Brookfield , U.S.A)
20. ปั๊มดูดจ่ายของเหลว (Peristaltic Pump) (WAT010.0521.00E , Watson Marlow, USA)
21. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (BE 600, Memmert, Germany)
22. ตู้อบ (ULE600, Memmert, USA)
23. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)(1350FX, Shel Lab, USA)
24. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (N003, Permat, Germany)
25. ตู้แช่เย็น (รุ่น SR-44NMB, Sumsung)
26. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (DT-1, Heto, Denmark)
27. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) (HV-85, Hirayama, Japan)
28. ปั๊มสุญญากาศ (Suction Pump) (0322-V4-G 21 DX, GAST, USA)
29. ไมโครปิเปต (Pipetman, Gilson SAS, France)
30. โถดูดความชื้น (Desiccator)
31. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
32. บุษเนอร์ฟันเนล (Buchner Funnel)
33. เครื่องแก้ววัดความหนืด (Cole-Parmer Ubbelohde Viscometer ขนาด 0B)
34. ขวดพลาสติกปากกว้างขนาด 1000 มิลลิลิตร (Plastic Bottle Wide Mouth)
35. ขวดแก้วปากกว้างขนาด 500 มิลลิลิตร

36. Cryo Box และ Cryo Vial (Labfree™, Mylab SeouLin Bioscience Co., Ltd., Korca)
37. แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร (MA01730, Millipore Coporation, Bedford, USA)
38. Ultrafiltration Membranc 10 kDa (MidGee Cross Flow Cartridges Laboratory-Scale 10 kDa, GE Healthcare Bio-Sciences, UK)
39. Ultrafiltration Membrane 1 kDa (MidGee Hoop cross flow cartridges Laboratory-scale 1 kDa, GE Healthcare Bio-Sciences, UK)
40. กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 3 (Whatman No. 3)
41. เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดปริมาตร ขวดรูปชมพู่ ปิเปต บิวเรต กระบอกตวง จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง เทอร์โมมิเตอร์ หลอดหยด กรวยกรอง แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์

สารเคมี

1. 1 n-Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate (CPC) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
2. 1,4-Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
3. 2-Thiobarbituric Acid (TBA; $C_4H_4N_2O_2S$) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
4. N/400 Potassium Polyvinyl Sulfate (PVSK) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
5. p-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
6. กรดอะซิติก (Acetic Acid; CH_3COOH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
7. อะซิโตรไนไทรล์ (Acetonitrile ; CH_3CN) (HPLC Grade, Scharlau Chemie, Spain)
8. กรดบอริก (Boric Acid; H_3BO_4) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
9. กรดซิตริก (Citric Acid; CH_3CH_2COOH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
10. ดีกลูโคซามีน (D-glucosamine) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
11. ไดโพแทสเซียมเตตระโบรไรต์ (Dipotassiumtetraborate; $K_2B_4O_7$) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
12. เอทานอล (Ethanol) (Commercial Grade, Merck Darmstadt, Germany)
13. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid; HCl) (AR Grade, Fisher Scientific, UK, Commercial Grade, Merck Darmstadt, Germany)
14. เมทิล เรด (Methyl Red; $C_{15}H_{15}N_3O_2$) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)

15. เมธิลีน บลู (Methylene Blue; $C_{16}H_{18}N_3ClS$) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
16. เอ็น- อะซีติล ดีกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
17. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric Acid; H_3PO_4) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
18. โพแทสเซียมฟอสเฟต (Potassium Phosphate; K_2HPO_4) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
19. กรดซัลฟูริก (Sulfuric Acid; H_2SO_4) (AR Grade, Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) (Commercial Grade, Merck Darmstadt, Germany)
21. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
22. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate; Na_2CO_3) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
23. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium Hydrogen Phosphate ; Na_2HPO_4) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
24. โซเดียมอะซิเตต (Sodium Acetate; CH_3COONa) (AR Grade, Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)
25. โทลูไดอิน บลู (Toluiden Blue) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
26. น้ำกลั่น (จากเครื่อง Optima Plus 30, Elga, USA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Broth (NB) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
2. Potato Dextrose Agar (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
3. Plate Count Agar (AR Grade, Biomark Laboratories, India)
4. Trypticase Soy Broth (TSB) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)

เอนไซม์

1. เอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อ *Trichoderma reesei* 840 EGU/ml (Endo-Glucose Units/ml) (Cellulase 1.5L) (Food Grade, Novozyme, USA)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมไคติน ไคโตซานจากเปลือกกุ้ง เปลือกปูและแกนหมึก

การเตรียมไคติน ไคโตซานจากเปลือกกุ้งและเปลือกปู เตรียมโดยวิธีของ นันทิยา เจริญแหลม (2548) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-1 และ ก-2 การเตรียมไคติน ไคโตซานจากแกนหมึก เตรียมโดยวิธีของ Chandumpai, Singhpibulporn, Faroongsarng, and Somprasit (2004) รายละเอียดแสดงได้ดังภาคผนวก ก-3 และ ก-4

1.1 การเตรียมไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และเปลือกปู

1.1.1 การเตรียมไคตินจากเปลือกกุ้ง และเปลือกปู

เตรียมไคตินจากเปลือกกุ้งและเปลือกปู โดยนำเปลือกกุ้งและเปลือกปูแห้งมากำจัดแร่ธาตุ (Demineralization) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อัตราส่วนเปลือกกุ้งและเปลือกปูต่อสารละลายกรด (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1 : 20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดโปรตีนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งและเปลือกปูต่อสารละลายด่าง (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1 : 20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง อบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก

1.1.2 การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งและเปลือกปู

การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้งและเปลือกปู นำไคตินที่เตรียมได้จากข้อ 1.1.1 มาเตรียมไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่าง ๆ กัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิในการให้ความร้อนและเวลาต่าง ๆ กัน แสดงได้ดังตารางที่ 3-1 นำไคโตซานที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (ภาคผนวก ก-5) และน้ำหนักโมเลกุล (ภาคผนวก ก-6)

ตารางที่ 3-1 อุณหภูมิ เวลาและจำนวนซ้ำที่ใช้ในการเตรียมไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่าง ๆ กัน (นันทิยา เจริญแหลม, 2548)

ชนิดของไคโตซาน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนรอบการสกัด (รอบ)	ระดับการกำจัด หมู่อะซิติล
DD1	110	1	1	77
DD2	120	2	1	85
DD3	120	3	3	95

1.2 การเตรียมไคตินและไคโตซานจากแกนหมึก

1.2.1 การเตรียมไคตินจากแกนหมึก

การเตรียมไคตินจากแกนหมึก โดยนำแกนหมึกแห้งมากำจัดโปรตีนด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ใช้อัตราส่วนแกนหมึก ต่อสารละลายด่าง (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1 : 20 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดค่าด่าง อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และชั่งน้ำ (ภาคผนวก ก-3)

1.2.2 การเตรียมไคโตซานจากแกนหมึก

การเตรียมไคโตซานจากแกนหมึกโดยนำไคตินที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 มาเตรียมไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่าง ๆ กัน โดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิในการให้ความร้อนและเวลาต่าง ๆ กัน (ภาคผนวก ก-4) แสดงได้ดังตารางที่ 3-2 นำไคโตซานที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (ภาคผนวก ก-5) และน้ำหนักโมเลกุล (ภาคผนวก ก-6)

ตารางที่ 3-2 อุณหภูมิ เวลาและจำนวนซ้ำที่ใช้ในการเตรียมไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลต่าง ๆ กัน (Chandumpai et al., 2004)

ชนิดของไคโตซาน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนรอบการสกัด (รอบ)	ระดับการกำจัด หมู่อะซิติล
DD1	100	2	1	77
DD2	100	4	1	85
DD3	100	6	1	95

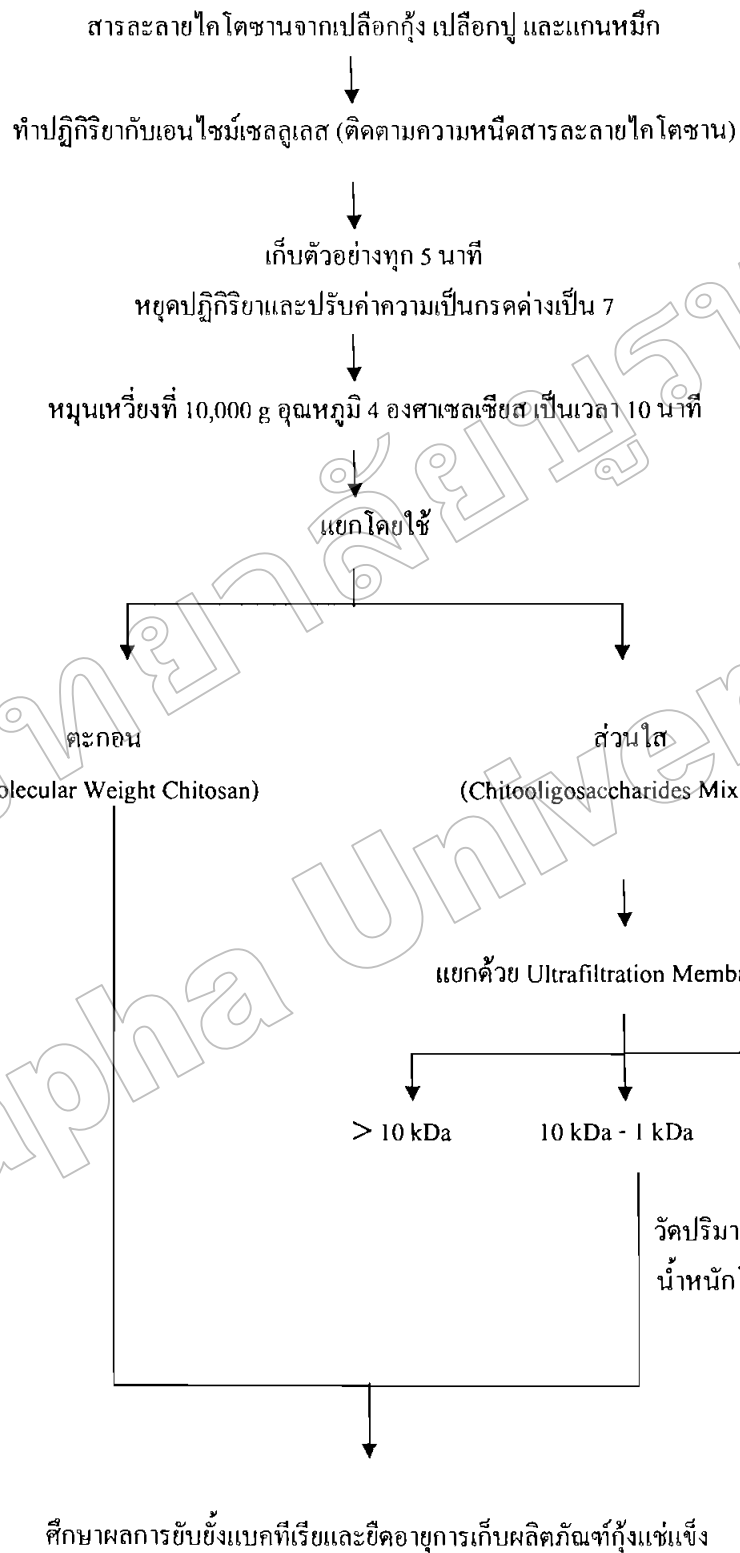
2. การศึกษาสมบัติของไคโตซานที่ผลิตจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึกในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

ศึกษาสมบัติของไคโตซานที่ผลิตจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึกในการผลิตสารผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า ดังนี้

เตรียมสารละลายไคโตซานจากเปลือกกุ้ง เปลือกปูและแกนหมึก 1 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลของไคโตซานในช่วง 77-95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3-2 ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็นค่าที่ 6.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 0.1

เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เก็บตัวอย่าง ทุก 5 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล จนได้ค่าความเป็นกรดค่า 7.0 นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ติดตามความหนืดสารละลายโคโคซาน (ภาคผนวก ข-1) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนหยุดปฏิกิริยา นำ ส่วนใสแยกด้วย Ultrafiltration Membrane ที่มี Molecular Weight Cut Off ที่ 10 kDa และ 1 kDa แยก สารผสมโคโคอิลิโกแซคคาไรด์เป็นกลุ่มแสดงได้ดังตารางที่ 3-2 วัดปริมาณโคโคซานที่เหลืออยู่ (ภาคผนวก ข-2) ส่วนที่เหลือเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่แข็ง เพื่อนำมา วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (ภาคผนวก ข-3) และระดับชั้นพอลิเมอร์น้ำตาลในสารผสม โคโคอิลิโกแซคคาไรด์ (ภาคผนวก ข-4) และวิเคราะห์ปริมาณสารผสมโคโคอิลิโกแซคคาไรด์ (ภาคผนวก ข-5) แสดงได้ดังภาพที่ 3-2

วางแผนการทดลองแบบ 3×3 Factorial Experiment in Completely Randomized Design ปัจจัยที่ศึกษา คือ ชนิดของวัตถุดิบที่ผลิตโคโคซาน คือ เปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก และสมบัติ ของโคโคซานจากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 11.01 (Statistical Package for the Social Sciences, Technology Services UT Austin, USA) (จริญ จันทลักษณ์, 2540)



ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการผลิตสารผสมไคโต โอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกกุ้ง เปลือกปู และแกนหมึก

3. การศึกษาสมบัติของสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

ศึกษาสมบัติของสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดยนำสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3 แสดงได้ดังตารางที่ 3-2, 3-3 และ 3-4 มาเตรียมเป็นสารละลายสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ความเข้มข้น 100, 250, 500, 1,000 และ 2,000 ppm (0.01, 0.025, 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น และกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปศึกษาผลของสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา คือ *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *S. aureus* ดังนี้

วางแผนการทดลองแบบแบบ Completely Randomized Design ปัจจัยที่ศึกษา คือ ระดับความเข้มข้นของสารผสมโคโคโพลิโกลิโกแซคคาไรด์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 11.01 (Statistical Package for the Social Sciences, Technology Services UT Austin, USA) (จรัญ จันทลักษณ์, 2540)