ภาคผนวก ก

1. ชนิดและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (นรีกุล สุระพัฒน์, 2536: นันทนา อรุณฤกษ์, 2537: วราวุฒิ ครูส่ง, 2538)

1.1 ***Escherichia coli***

เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่งตรง (rod shape) ติดสีกรัมลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) เคลื่อนที่ได้โดยใช้ peritrichous flagella ขึ้นได้บนอาหารง่ายๆ โคโลนีบนอาหาร NA (Nutrient agar) ผิวเรียบ ชื้น ผิวมัน สีเทา โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบาง serotype ที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ คือ โรคอุจจาระร่วง (diarrheal diseases) ตามปกติถูกใช้เป็นเชื้อที่บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนที่เกี่ยวเนื่องกับระบบขับถ่าย (อุจจาระ) ในอาหารและเครื่องดื่ม

1.2 ***Staphylococcus aureus***

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม (cocci) มักอยู่เป็นกลุ่มๆ คล้ายพวงองุ่น ติดสีกรัมบวก เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิดที่มีพีเอช ระหว่าง 4.8-7.4 โคโลนีบนอาหารวุ้นมีลักษณะ กลม นูน เป็นมันเงา สีเหลืองทอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เป็นสาเหตุทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งเรียกว่า food poisoning เพราะแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างสารพิษขึ้นในอาหารได้ และสร้างปฏิกิริยา coagulase-positive แต่ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้

1.3 ***Candida albicans***

เป็นยีสต์ในกลุ่ม Asporogenous yeast หรือ false yeast เซลล์มีรูปร่างกลม (globose) ติดสีกรัมบวก สืบพันธุ์ด้วยการแตกหน่อแบบ multipolar budding เซลล์แม่จะเริ่มแตกหน่อที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งของเซลล์ ให้เซลล์ลูกซึ่งมีขนาดเล็กกว่า เซลล์ลูกจะติดกับเซลล์แม่จนมีขนาดพอสมควรจึงจะหลุดแยกออกจากกันและทำหน้าที่เป็นเซลล์แม่อีก

1.4 ***Pseudomonas fluorescens***

เป็นแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว เป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อยแต่ไม่เป็นเกลียว ติดสีกรัม

ลบ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา 3-6 เส้นที่ปลายขั้วด้านหนึ่ง (polar flagella) เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีออกซิเจนเท่านั้น มีเมแทบอลิซึมในการหายใจ แต่ไม่มีการหมัก ไม่สร้าง pyocyanin พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และพืช ในสภาพแวดล้อม อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง น้ำยาฆ่าเชื้อ เครื่องมือแพทย์ และเลือดที่เก็บไว้ให้ผู้ป่วย ลักษณะการก่อโรคเป็นแบบฉวยโอกาส (opportunists)

1.5 ***Bacillus cereus***

เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง เซลล์มักเรียงเป็นลูกโซ่ ติดสีกรัมบวก สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ รูปร่างโคโลนีมีการสร้างสาร hemolysin toxin lytic enzyme ปล่อยออกสู่นอกเซลล์ ทำให้เกิดโรค food poisoning ซึ่งมีระยะพักของโรคสั้นมาก มักจะปนเปื้อนกับข้าวผัดที่เก็บทิ้งไว้ในที่อบอุ่น แบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตท็อกซิน พบในอาหารกระป๋อง พวกถั่ว พบอยู่ตามธรรมชาติในดิน น้ำ และอากาศ

1.6 ***Lactobacillus*** **spp.**

เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง มักก่อโรครุนแรงในคน รูปร่างลักษณะเป็น coccobacillus เป็นเกลียวต่อกันเป็นสายโซ่ ติดสีกรัมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เมแทบอลึซึมเป็นแบบ fermentation เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ (optimum temperature) 30-40 องศาเซลเซียส ชอบ pH 5.5-5.8 หรือน้อยกว่า ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น นมและผลิตภัณฑ์นม ไส้กรอก เบคอน แฮม และผัก

1.7 ***Salmonella*** **sp.**

เป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคภายหลังบริโภคอาหารเข้าไปที่เรียกว่า food infection เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น MacConkey, EMB, SS และ DCA agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ เป็นมัน ไม่มีสี (ไม่หมักย่อยน้ำตาลแลกโตส)ไม่ทึบแต่ไม่โปร่งแสง บางสายพันธุ์มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ บางชนิดมีแคปซูล บางชนิดมีชีวิตอยู่ในอาหารแห้งได้นาน เช่น ในนมผง มะพร้าวแห้ง ไข่ เชื้อถูกทำลายเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.8 ***Aspergillus niger***

เป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะดังนี้

1.8.1 conidiophores มีลักษณะตั้งตรงขึ้น บริเวณตรงปลายขยายออกมา มีรูปร่างค่อนข้างกลม บริเวณดังกล่าวจะมีโครงสร้างซึ่งเป็นฐานของ conidia เรียกว่า phialides

1.8.2 conidia มีรูปร่างกลม สีดำ

1.8.3 บริเวณตรงฐานของ conidiophores มีเซลล์พิเศษเรียกว่า foot cells ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่ใช้ในการสังเกต

1.8.4 ส่วนใหญ่จัดเป็น saprophytic mold

1.9 ***Penicillium* sp.**

เป็นเชื้อราที่มีลักษณะดังนี้

1.9.1 conidiophores ตั้งตรงขึ้นมาจากฐาน บริเวณเกือบถึงยอดจะมีการแตกแขนงออกมาในลักษณะคล้ายไม้กวาด (brush- like) เพื่อเป็นฐานรองรับ conidia ที่จะถูกสร้างอยู่บน phialides

1.9.2 conidia ไม่มีสีหรืออาจมีสีที่ค่อนข้างสดใส รูปร่างกลมหรือรูปไข่

1.9.3 จัดเป็นทั้ง parasitic (ก่อให้เกิดโรคเน่าในพืชโดยเฉพาะบริเวณส่วนอ่อน) และ saprophytic molds

1.9.4 ไม่มี foot cells

ภาคผนวก ข

1. วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติของไคโตแซน

1.1 **ความชื้น** (A.O.A.C., 1990)

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

- ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
- ตู้อบไฟฟ้า
- โถดูดความชื้น
- เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

วิธีวิเคราะห์

- อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 $^{\circ}$C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
- กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว
- นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 $^{\circ}$C นาน 5-6 ชั่วโมง
- นำออกจากตู้อบไฟฟ้าใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
- อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาทีและกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
- คำนวณหาความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

1.2 **น้ำหนักโมเลกุล** (Chen and Hwa, 1996)

วิธีการ

ชั่งไคโตแซนมา 0.20 กรัม

⇓

ละลายใน 1% กรดอะซิติก 100 ml

⇓

กวนให้ละลายด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

⇓

กรองผ่านซินเทอร์แกรส

⇓

เจือจางสารละลายไคโตแซนด้วย 1% กรดอะซิติก ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.20%, 0.10%, 0.05%, 0.025% และ 0.01% (w/v) ตามลำดับ

⇓

วัดความหนืดของสารละลายที่อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้ Ubbelohde viscometer นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณน้ำหนักโมเลกุล แต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณ

η_{rel} = relative viscosity = t/t_0 ; เมื่อ t = เวลาที่สารตัวอย่างใช้ในการเคลื่อนที่

t_0 = เวลาที่ตัวทำละลายใช้ในการเคลื่อนที่

η_{sp} = specific viscosity = $(t/t_0)/ t_0$

= $\eta_{rel} - 1$

η_{sp}/C = specific viscosity per concentration ; เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลาย (g/ 100 ml)

ln η_{rel} = ln relative viscosity

ln η_{rel}/C = ln relative viscosity per concentration

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง η_{sp}/C กับ C และ ค่า ln η_{rel}/C กับ C

ค่า intrinsic viscosity (η) ได้จากค่า η_{sp}/C ที่มีความเข้มข้นเป็นศูนย์ การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน ใช้สมการ

$$\log [\eta] = \log K + a \log M \quad \text{หรือ} \quad [\eta] = KM^a$$

เมื่อ $K = 8.93 \times 10^{-4}$

$a = 0.71$

M = viscosity average- molecular weight

1.3 **ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล**

ตรวจสอบ degree of deacetylation of chitosan โดยวิธี colliod titration method (Chen and Hwa, 1996)

สารเคมี

- 5% (v/v) acetic acid
- toluidine blue (indicator)
- n/400 PVSK (potassium polyvinylsulfate) 0.0025 N

วิธีการ

- ละลายไคโตแซน 0.5 g ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 5% (v/v) 100 ml
- 1.0 g ของ (chitosan/acetic acid) ผสมกับน้ำกลั่น 30 ml
- เติม indicator (TBO)
- ไตเตรตด้วย 0.0025 N PVSK จนถึงจุดยุติ (end-point) ที่มีสีชมพู

<u>การคำนวณ</u>

$$\%DD = \left(\frac{x/161}{x/161+y/203} \right) * 100$$

เมื่อ $x = 1/400 * 1/100 * f * 161 * V$

$y = 0.5*1/100 - x$

V = ปริมาตรที่ใช้ไตเตรต f = factor ของ n/400 (ข้างขวด)

2. การถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน (Transmission electron microscope) (Johannessen, 1981)

1. เตรียมตัวอย่าง โดยหมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ 1,000xg เป็นเวลา 5 นาที
2. การตรึงขั้นต้น ตรึงด้วย 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2-7.3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง
3. การตรึงขั้นที่ 2 ตรึงด้วย 1% ออสเมียมเตตรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
4. การย้อมสี โดยใช้ 2% ยูรานิลอะซิเตต เป็นเวลา 20 นาที
5. การดึงน้ำออก ทำเป็นขั้นตอน ดังนี้

   70% เอธานอล 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

   80% เอธานอล 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

   90% เอธานอล 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

   100% เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที
6. การแทรกซึม

   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที

   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ : อีพอกซีเรซิน, (1:1) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

   ใช้โพรพิลีนออกไซด์ : อีพอกซีเรซิน, (1:2) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

   ใช้อีพอกซีเรซินบริสุทธิ์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
7. การฝังตัวอย่าง โดยฝังในแคปซูลแบบปลายแหลม อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส
8. การตัดตัวอย่าง โดยใช้อุลตราไมโครโทม (ultramicrotome) ตัดแต่งตัวอย่างบนกริดทองแดงให้เป็นรูปพีระมิดขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน หลังจากนั้นย้อมด้วยสีโทลูดีนบลู
9. การย้อมสี ใช้ 5% ยูรานิลอะซิเตตที่จะเพาะกับกรดนิลคลิอิกและลีดซิเตรทที่จำเพาะกับองค์ประกอบเซลล์
10. การดูตัวอย่าง ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชันที่ 80 กิโลโวลต์

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic assay) (Skehan และคณะ, 1995)

นำเซลล์มะเร็งชนิด HT-29 human colon adenocarcinoma cell line มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 3 วัน เตรียมเซลล์ suspension เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับ viable cell ด้วย haematocytometer (trypan blue exclusion) แล้วนำเซลล์ลงเลี้ยงใน 96- well plate หลุมละ 100 µl (3,000 cell/well) นำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะเป็น monolayer หลังจากนั้นใส่สารละลายไคโตแซนทดสอบที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 mg/ml ลงไปโดยเติมหลุมละ 100 µl ทำซ้ำความเข้มข้นละ 8 หลุม ในชุดควบคุมจะใส่เฉพาะตัวทำละลาย เลี้ยงใน CO_2 incubator 96 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงหาจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยวิธี Sulphorhodamine B assay (SRB assay) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ 40% trichloroacetic acid (TCA) ที่ละลายด้วย 1% acetic acid เติมลงไปใน 96-well plate เพื่อทำการ fixed เซลล์ไว้ วาง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นและย้อมสีเซลล์ด้วย SRB stain (สีม่วง) 30 นาที เมื่อครบเวลาใช้น้ำกลั่นล้างสี SRB ออก เซลล์ที่ตายแล้วจะหลุดออกมา ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะถูก fixed ติดอยู่ที่ก้น plate หลังจากวาง plate ไว้จนแห้งแล้ว เติมสารละลาย 10 mM Tris-Base ลงไปใน 96- well plate หลุมละ 200 µl เขย่า plate ด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% survival) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบ

4. ศึกษาผลของตัวทำละลายต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans)*

ตัวทำละลายที่ใช้

- Acetic acid
- Lactic acid
- Formic acid
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- Propylene glycol

วิธีการ เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นเอียงมา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10 ml

⇓

บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

ถ่ายเชื้อม10 % ใส่ลงในอาหารเหลวใหม่ (10 ml)

⇓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

⇓

เจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวให้ได้ขนาดเชื้อ 10^6 CFU/ml

⇓

เติมเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีตัวทำละลายความเข้มข้นต่างๆ กัน 7 ระดับ คือ 0 และ 1-0.03% (2-fold dilution)ให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^5 CFU/ml

⇓

บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

วัดค่าความขุ่นดูการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm

⇓

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวทำละลายกับค่า OD 660 nm

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 18 ค่าความชื้นของไคโตแซนที่เตรียมจากเปลือกส่วนหัวกุ้งกุลาดำภายใต้สภาวะต่างๆ

Table 18 Moisture content of chitosan prepared under various conditions

Deacetylation conditions	Time (h)	Moisture content*
atmosphere	0.5	8.84 ± 0.06^{C}
	1.0	10.93 ± 0.05^{B}
	2.0	11.78 ± 0.49^{A}
vaccum	0.5	11.62 ± 0.07^{A}
	1.0	10.95 ± 0.57^{B}
	2.0	8.51 ± 0.05^{C}

$^{A-C}$ Means with different superscripts within the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

* Mean ±SD from triplicate determinations.

ตารางที่ 19 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ *E.coil* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 19 Total plate count of *E.coil* with and without chitosan solution; log CFU/ml

Time (h)	log CFU/ml				
	0 ppm	1250 ppm	625 ppm	312.5 ppm	156.25 ppm
0	5.32	5.294	5.322	5.352	5.272
1	5.845	4.636	4	4.397	4.462
3	6.053	2.602	2	2.397	2.447
6	6.832	0	0	0	1.041
9	7.23	0	0	0	0.477
12	8.685	0	0	0	0
24	9.357	0	0	0	0
48	9.756	0	0	2.322	2.544
72	10.498	2.326	2.278	4.462	4.778

ตารางที่ 20 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ *S. aureus* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 20 Total plate count of *S. aureus* with and without chitosan solution; log CFU/ml

Time (h)	log CFU/ml				
	0 ppm	1250 ppm	625 ppm	312.5 ppm	156.25 ppm
0	5.354	5.415	5.509	5.375	5.447
1	5.522	3.301	3.089	3.146	3.195
3	5.929	0.301	0	1.146	1.342
6	6.346	0	0	0	0.477
9	7.1161	0	0	0	0
12	8.558	0	0	0	0
24	8.767	0	0	0	0
48	9.607	0	0	2.312	2.604
72	10.477	2.301	3.602	4.778	4.845

ตารางที่ 21 จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ *C. albicans* ที่เจริญเติบโตหลังการเติมสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 21 Total plate count of *C. albicans* with and without chitosan solution; log CFU/ml

Time (h)	log CFU/ml				
	0 ppm	1250 ppm	625 ppm	312.5 ppm	156.25 ppm
0	5.53	5.48	5.59	5.49	5.60
1	5.70	1.46	2.01	2.18	2.08
3	5.77	1.04	1.49	1.52	1.41
6	6.22	0	0	0.78	0.9
9	6.60	0	0	0.48	0.602
12	7.32	0	0	0	0
24	8.94	0	0	0	0
48	9.57	0	0	0	0
72	10.15	0	0	0	0

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HT- 29 human colon adenocarcinoma cell lines ของไคโตแซนจากเปลือกหัวกุ้งกุลาดำ

Table 22 Effect of chitosan on the viability of HT- 29 human colon adenocarcinoma cell lines

Native chitosan Conc. (mg/ml)	Optical density of HT 29 cells	% toxicity	% survival
0.1	0.294	-26.092	126.092
	0.333	-45.292	145.292
	0.358	-57.600	157.600
	0.342	-49.723	149.723
	0.345	-51.200	151.200
	0.356	-56.615	156.615
	0.324	-40.862	140.862
	0.294	-26.092	126.092
	average 0.331	average –44.185	average 144.185
0.5	0.281	-19.692	119.692
	0.354	-55.631	155.631
	0.351	-54.154	154.154
	0.365	-61.046	161.046
	0.362	-59.569	159.569
	0.359	-58.092	158.092
	0.333	-45.292	145.292
	0.304	-31.015	131.015
	average 0.338	average –48.062	average 148.062

Native chitosan Conc. (mg/ml)	Optical density of HT 29 cells	% toxicity	% survival
1.0	0.326	-41.846	141.846
	0.365	-61.046	161.046
	0.359	-58.092	158.092
	0.369	-63.015	163.015
	0.367	-62.031	162.031
	0.377	-66.954	166.954
	0.368	-62.523	162.523
	0.314	-35.938	135.938
	average 0.355	average –56.431	average 156.431
1.5	0.350	-53.662	153.662
	0.375	-65.969	165.969
	0.362	-59.569	159.569
	0.347	-52.185	152.185
	0.350	-53.662	153.662
	0.380	-68.431	168.431
	0.358	-57.600	157.600
	0.303	-30.523	130.523
	average 0.353	average –55.200	average 155.200
Control (0.125% acetic acid)	0.315	-36.431	136.431
	0.316	-36.923	136.923
	0.314	-35.938	135.938
	0.315	-36.431	136.431
	0.310	-33.969	133.969
	0.333	-45.292	145.292
	average 0.318	average –37.978	average 137.978

หมายเหตุ

Blank (OD).= 0.038, 0.041, 0.037, 0.037, 0.035, 0.038, 0.037, 0.040,

average =0.037

% survival = 99.938, 98.462, 100.43, 100.43, 101.42, 99.938, 100.43, 98.954

average =100

Optical density of HT 29 cells ที่แท้จริง = ค่าที่วัดได้-0.037

$$\%\text{survival} = \frac{\text{Optical density of HT 29 cells ที่แท้จริง}}{0.281} \times 100$$

ตารางที่ 23ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด HT- 29 human colon adenocarcinoma cell lines ของไคโตแซนทางการค้า (90%DD)

Table 23 Effect of commercial chitosan on the viability of HT- 29 human colon adenocarcinoma cell lines

Commercial chitosan (90%DD) Conc. (mg/ml)	Optical density of HT 29 cells	% toxicity	% survival
0.1	0.264	-11.323	111.323
	0.294	-26.092	126.092
	0.280	-19.200	119.200
	0.290	-24.123	124.123
	0.314	-35.938	135.938
	0.319	-38.400	138.400
	0.291	-24.615	124.615
	0.245	-1.9692	101.9692
	average 0.287	average –22.708	average 122.708

Commercial chitosan (90%DD) Conc. (mg/ml)	Optical density of HT 29 cells	% toxicity	% survival
0.5	0.272	-15.262	115.262
	0.285	-21.662	121.662
	0.318	-37.908	137.908
	0.307	-32.492	132.492
	0.315	-36.431	136.431
	0.317	-37.415	137.415
	0.303	-30.523	130.523
	0.249	-3.9385	103.9385
	average 0.295	average –26.954	average 126.954
1.0	0.311	-34.462	134.462
	0.313	-35.446	135.446
	0.317	-37.415	137.415
	0.336	-46.769	146.769
	0.333	-43.815	143.815
	0.338	-47.754	147.754
	0.323	-40.369	140.369
	0.286	-22.154	122.154
	average 0.319	average –38.523	average 138.523
1.5	0.270	-14.277	114.277
	0.329	-27.077	127.077
	0.293	-25.600	125.600
	0.311	-34.462	134.462
	0.321	-39.385	139.38

Commercial chitosan (90%DD) Conc. (mg/ml)	Optical density of HT 29 cells	% toxicity	% survival
Control (0.125% acetic acid)	0.323	-40.369	140.369
	0.309	-33.477	133.477
	0.293	-25.600	125.600
	average 0.306	average –30.031	average 130.031
	0.259	-8.8615	108.8615
	0.352	-54.646	154.646
	0.343	-50.215	150.215
	0.355	-56.123	156.123
	0.352	-54.646	154.646
	0.370	-63.508	163.508
	0.290	-24.123	124.123
	0.251	-4.9231	104.9231
	average 0.321	average –39.631	average 139.631

หมายเหตุ

Blank (OD).= 0.038, 0.041, 0.037, 0.037, 0.035, 0.038, 0.037, 0.040, average =0.037

% survival = 99.938, 98.462, 100.43, 100.43, 101.42, 99.938, 100.43, 98.954 average =100

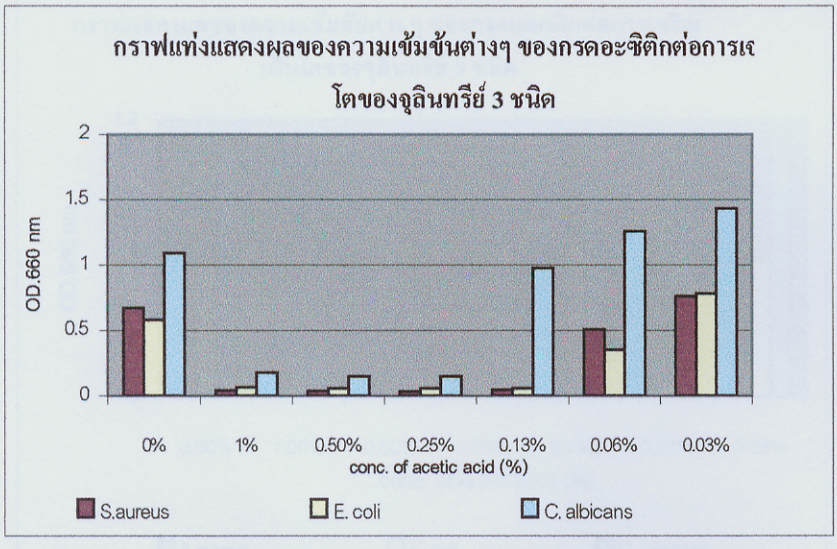
Optical density of HT 29 cells ที่แท้จริง = ค่าที่วัดได้-0.037

$$\%\text{survival} = \frac{\text{Optical density of HT 29 cells ที่แท้จริง}}{0.284} \times 100$$

ตารางที่ 24 ผลของกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans*

Table 24 Effect of acetic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

conc. of Acetic acid	OD.660 nm		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0%	0.5772	0.672	1.089
1%	0.06463	0.04345	0.177
0.50%	0.0585	0.03925	0.1495
0.25%	0.058	0.0336	0.1465
0.13%	0.0578	0.0476	0.9755
0.06%	0.353	0.5048	1.255
0.03%	0.78	0.7608	1.4335



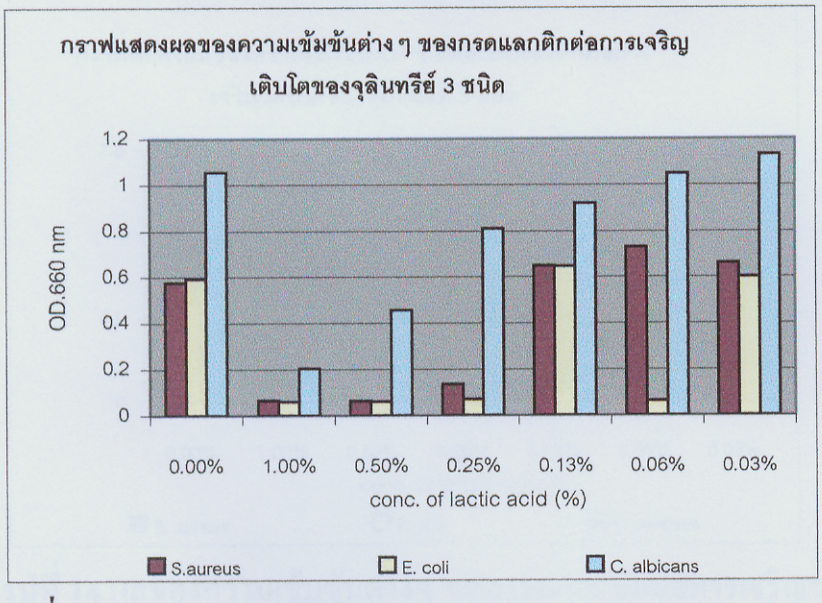
รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดอะซิติกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*

Figure 12 Effect of acetic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

ตารางที่ 25 ผลของกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans*

Table 25 Effect of lactic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

conc. Lactic acid	OD 660 nm		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0%	0.5773	0.5944	1.0550
1%	0.0646	0.0608	0.2061
0.50%	0.0624	0.0613	0.4570
0.25%	0.1348	0.0689	0.8106
0.13%	0.6495	0.6462	0.9209
0.06%	0.7286	0.0625	1.0495
0.03%	0.6598	0.6013	1.1337



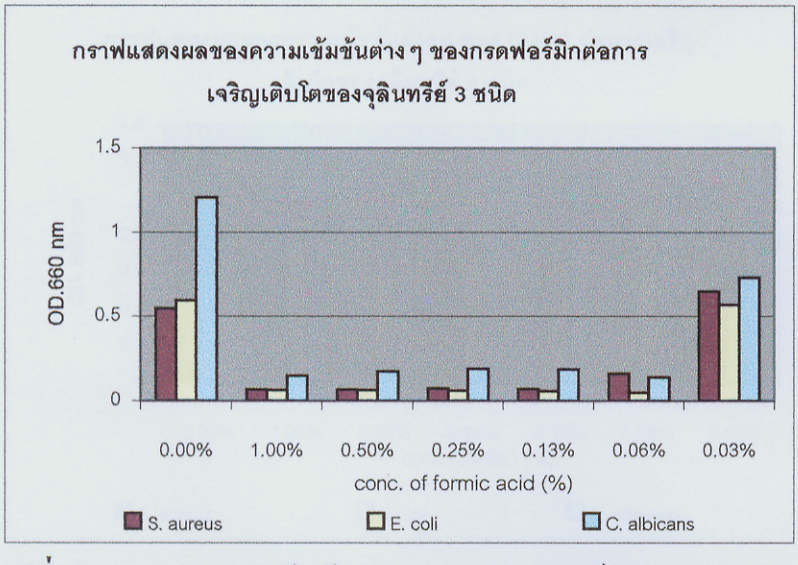
รูปที่ 13 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดแลกติกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*

Figure 13 Effect of lactic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

ตารางที่ 26 ผลของกรดฟอร์มิกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans*

Table 26 Effect of formic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

conc. Formic acid	OD 660 nm		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0%	0.5466	0.5966	1.2050
1%	0.0691	0.0640	0.1492
0.50%	0.0663	0.0629	0.1756
0.25%	0.0721	0.0601	0.1908
0.13%	0.0703	0.0592	0.1851
0.06%	0.1618	0.0497	0.1388
0.03%	0.6502	0.5705	0.7337



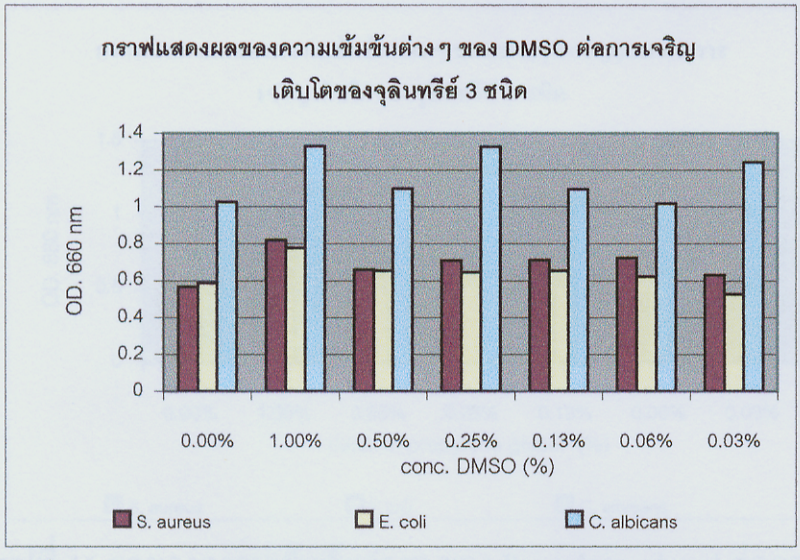
รูปที่ 14 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของกรดฟอร์มิกต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*

Figure 14 Effect of formic acid on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

ตารางที่ 27 ผลของ DMSOที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans*

Table 27 Effect of DMSO on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

conc. DMSO	OD.660 nm		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0%	0.5670	0.5870	1.0250
1%	0.8230	0.7790	1.3310
0.50%	0.6600	0.6520	1.0990
0.25%	0.7080	0.6430	1.3280
0.13%	0.7110	0.6520	1.0960
0.06%	0.7210	0.6210	1.0180
0.03%	0.6300	0.5250	1.2440



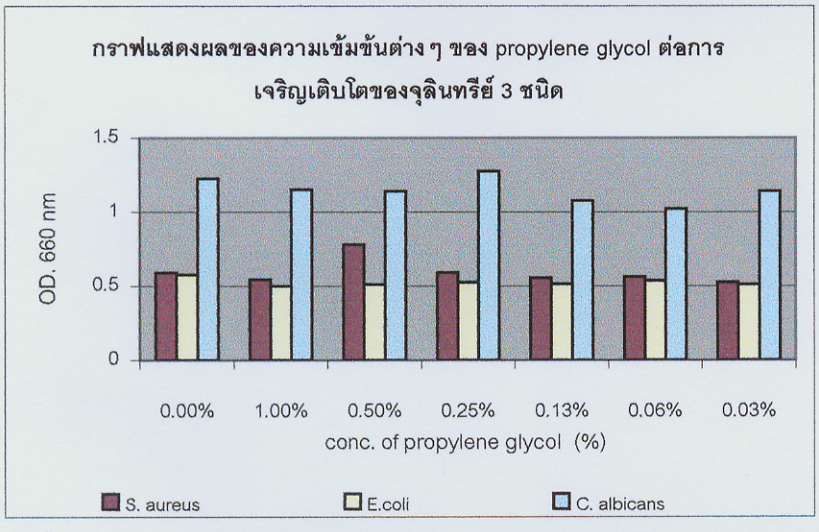
รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ DMSO ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*

Figure 15 Effect of DMSO on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

ตารางที่ 28 ผลของโพรพิลีนไกลคอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *C. albicans*

Table 28 Effect of propylene glycol on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*

conc. Propylene glycol	OD 660 nm		
	E. coli	*S. aureus*	*C. albicans*
0%	0.59	0.576	1.227
1%	0.544	0.499	1.149
0.50%	0.78	0.511	1.14
0.25%	0.591	0.526	1.275
0.13%	0.553	0.515	1.073
0.06%	0.561	0.537	1.022
0.03%	0.525	0.508	1.139



รูปที่ 16 ผลของความเข้มข้นต่างๆ ของ Propylene glycol ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus, E. coli* และ *C. albicans*

Figure 16 Effect of propylene glycol on *E. coli, S. aureus* and *C. albicans*