บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ ใช้เปลือกส่วนหัวของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากบริษัทปิติซีฟู้ด จำกัด
2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก)
   - *Escherichia coli*
   - *Staphylococcus aureus*
   - *Bacillus cereus*
   - *Salmonella* sp.
   - *Lactobacillus* sp.
   - *Pseudomonas fluorescens*
   - *Aspergillus niger*
   - *Candida albicans*
   - *Penicillium* sp.
3. เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง
   - Lysozyme (EC3.2.1.17) from chicken egg white, Sigma; USA
   - Chitinase (EC3.2.1.14) from *Streptomyces griseus*, Sigma; USA
   - Papain (food grade) from *Carica papaya*; Nagass, Kyoto and Imano, Nagoya; Japan
4. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/เกรด
Acetic acid (CH_3COOH)	LAB-SCAN/ Analyzed
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck/ Analyzed
Ferric chloride anhydrous ($FeCl_3$)	Fluka/ Analyzed
Formic acid (HCOOH)	CARLO ERBA/ Analyzed
Hydrochloric acid (HCl)	Merck/ Analyzed
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Vidhyasom/ Analyzed
Lactic acid ($CH_3CHOHCOOH$)	Merck/ Analyzed
Mueller Hinton Broth (MHB)	Difco/ Analyzed
Methyl red	Fluka/ Analyzed
N/400 potassium polyvinyl sulfate solution (PVSK)	Wako/ Analyzed
Potassium chloride (KCl)	CARLO ERBA/ Analyzed
Potato Dextrose Broth (PDB)	Difco/ Analyzed
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck/ Analyzed
Nutrient Agar (NA)	Merck/ Analyzed
Propylene glycol	Vidhyasom/ Analyzed
Phenolphthalein	CARLO ERBA/ Analyzed
Sodium hydroxide (NaOH)	BDH/ Com. Grade 98%
1% toluidine blue indicator	Wako/ Analyzed
Chitosan 70%DD	KATOKICHI/ Com. Grade
Chitosan 80%DD	KATOKICHI/ Com. Grade
Chitosan 90%DD	KATOKICHI/ Com. Grade
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GibcoBRL/Analyzed
Antibiotic-Antimycotic	GibcoBRL/Analyzed

อุปกรณ์

ตารางที่ 4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
ขวด 3 คอ (flask F/B 2 L)	SCHOTT DURAN
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Satoriusรุ่น BP2100S	S.V. Medico, Thailand
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Satoriusรุ่น BP221S	S.V. Medico, Thailand
เครื่องบดลดขนาด (2.0-4.0 mm)	-
เครื่องบดลดขนาดละเอียด (1.0 mm) Polymix	-
เครื่องวัดความหนืด (Viscometer Ubbelohde No. 200, M.548)	Cannon, U.S.A.
ซินเทอร์เกรส (Sinter glass ASTM 40-60C)	Kimex, U.S.A.
เดซิเคเตอร์ (Desicator)	-
ตะแกรง (2.0-4.0 mm)	Endecotts Ltd, England
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	BecthaiBKK, Thailand
ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042,41,62,61 class II type A)	Scientific promotion, Philadelphia
ตู้อบลมร้อน (Air dry) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UM 600	BecthaiBKK, Thailand
ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS- 325	Thai Victory, Thailand
ถาดบ่มเชื้อ 96 หลุม (Microtiter plat 96 flat bottom WI)	NUNC™, Denmark
พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo, Thailand
ไมโครปิเปต (ขนาด 1000 & 200 µl)	Eppendorf Research, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	BecthaiBKK, Thailand
Microplate Reader	EL_x 808 Bio-TEX,Belgium
Moisture can	-
Sinter glass ASTM 40-60C	Kimex, U.S.A.

วิธีการ

2.1 การศึกษาผลของกรรมวิธีการเตรียมไคโตแซนจากหัวกุ้งกุลาดำต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำหัวกุ้งกุลาดำมาแยกเอาเนื้อและอวัยวะภายในออกและล้างส่วนเปลือกให้สะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดลดขนาด ใช้ตะแกรงร่อนเพื่อแยกขนาดหัวกุ้งกุลาดำให้ได้ขนาด 2.0-4.0 มิลลิเมตร

2.1.2 การเตรียมไคติน มี 2 ขั้นตอน

2.1.2.1 กำจัดโปรตีนจากหัวกุ้งกุลาดำโดยแช่หัวกุ้งกุลาดำบดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5% (น.น. /ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างหัวกุ้งบดและสารละลายด่างเท่ากับ 1:10 (น.น. / ปริมาตร) แล้วล้างด้วยน้ำกรองให้หมดด่างจนเป็นกลาง

2.1.2.2 กำจัดแร่ธาตุโดยแช่หัวกุ้งกุลาดำที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.0 นอร์มอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างหัวกุ้งบดที่กำจัดโปรตีนแล้วและสารละลายกรดเท่ากับ 1:10 (น.น. /ปริมาตร) ล้างด้วยน้ำกรองให้หมดกรดจนเป็นกลางแล้วอบหัวกุ้งกุลาดำในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า “ไคติน”

2.1.3 การเตรียมไคโตแซน

2.1.3.1 **ศึกษาผลของสภาพบรรยากาศและระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดหมู่อะซิติลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน**

นำไคตินที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.2 มากำจัดหมู่อะซิติลโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (น.น. /ปริมาตร) อัตราส่วนระหว่างไคตินและสารละลายด่างเท่ากับ 1:15 (น.น. /ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะบรรยากาศต่างๆ เป็นเวลาต่างกันดังนี้ คือ

- สภาวะบรรยากาศ (สภาพสุญญากาศ และบรรยากาศปกติ)
- เวลา (0.5, 1 และ 2 ชั่วโมง)

แล้วล้างด้วยน้ำกรองจนหมดด่างให้เป็นกลาง อบไคโตแซนในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บไคโตแซนที่ได้ไว้ในขวดและที่มืด (สุทธวัฒน์ เบญจกุล และ ไพรัตน์ โสภโณดร, 2533) แล้ววิเคราะห์ผลผลิต (yield) และต้นทุนในการผลิต

2.1.3.2 **การวิเคราะห์คุณสมบัติของไคโตแซน** (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ข)

- ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล ใช้วิธีการไตเตรตหาสารแขวนลอย (colloid titration method; Toei and Kohara, 1976)
- น้ำหนักโมเลกุล ใช้เครื่องมือวัดความหนืด Capillary viscometer (Chen and Hwa, 1996)

2.1.3.3 **การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน** (No *et al.*,, 2002)

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*

การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เริ่มต้นโดยเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บ stock ไว้ มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) MHB หรือ PDB 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่บ่มไว้มา 10 % ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญอยู่ในระยะช่วง log phase นำเชื้อในระยะนี้มาใช้ทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อสุดท้าย 10^5 CFU/ml

การเตรียมสารละลายไคโตแซนที่ใช้ทดสอบ

ชั่งไคโตแซนมา 200 มิลลิกรัม ละลายใน 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก 10 มิลลิลิตร จะได้ stock chitosan solution เข้มข้นเป็น 20 มก/มล จากนั้นนำสารละลายไคโตแซนที่ได้มาเจือจางครั้งละ 2 เท่า (two-fold dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton Broth (MHB) สำหรับเชื้อแบคทีเรียหรือเจือจางในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับเชื้อราและยีสต์ โดยให้มีความเข้มข้นของไคโตแซนเป็น

2.50, 1.25, 0.625, 0.313, 0.150 และ 0.078 มก/มล นำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดย วิธี Microdilution test

วิธีการทดสอบ

ใช้วิธี Microdilution test ทำใน microtiter plate โดยดูดสารละลายไคโตแซนที่เตรียมไว้แล้วมา ใช้ความเข้มข้นละ 0.1 มล (100 µl) ใส่ลงในหลุม แล้วเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบลงไปอีก 0.1 มล (100 µl) โดยปรับขนาดเชื้อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เท่ากัน คือ 10^5 CFU/ml หลังจากเติมสารทุกอย่างครบ ความเข้มข้นของไคโตแซนสุดท้าย (final chitosan concentrations) จะเป็น 1.25, 0.625, 0.313, 0.150, 0.078 และ 0.039 มก/มล มีชุดควบคุม (control) ซึ่งเป็น positive control ที่เป็นอาหารเหลวที่ไม่มีไคโตแซนแต่มีกรดอะซิติกในปริมาณเดียวกับชุดที่มีไคโตแซน และ negative control ที่มีองค์ประกอบทุกอย่างเหมือนกันแต่ไม่มีการเติมเชื้อ ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรของส่วนผสมระหว่างสารละลายไคโตแซนและจุลินทรีย์ทดสอบสุทธิ 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยจะทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 nm ทุก 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การอ่านผล

หลุมทดลองหลุมใดที่ไคโตแซนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์หรือทำลายจุลินทรีย์ได้หลุมนั้นจะใสโดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 nm เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ อ่านค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตแซนที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกไคโตแซนที่มีค่าการยับยั้งสูงสุด คือ ให้ค่า MIC ต่ำสุดมาทำการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่อไป

	← *E. coli* →				← *S. aureus* →				← *C. albicans* →			
	1ไม่มีไคโตแซน	2	3	4	5ไม่มีไคโตแซน	6	7	8	9ไม่มีไคโตแซน	10	11	12
A negative control ไม่เติมเชื้อ	0.125% acetic acid in MHB 200 ul	0.125% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 2500 ppm 100 ul	0.0625% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 1250 ppm 100 ul	0.0313% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 650 ppm 100 ul	0.125% acetic acid in MHB 200 ul	0.0156% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 313 ppm 100 ul	0.0078% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 150 ppm 100 ul	0.0039% acetic acid in MHB 100 ul + chitosan 78 ppm 100 ul	0.125% acetic acid in PDB 200 ul	0.125% acetic acid in PDB 100 ul + chitosan 2500 ppm 100 ul	0.0625% acetic acid in PDB 100 ul + chitosan 1250 ppm 100 ul	0.0313% acetic acid in PDB 100 ul + chitosan 650 ppm 100 ul
B positive cotrol	0.125% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.125% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.125% acetic acid in PDB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul + CA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul
C final chitosan solution 1250 ppm	0.125% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.125% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.125% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul + CA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul + CA 100 ul	chitosan 2500 ppm 100 ul + CA 100 ul
D final chitosan solution 625 ppm	0.0625% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.0625% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.0625% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 1250 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul
E final chitosan solution 312.5ppm	0.0313% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.0313% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.0313% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 625 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul
F final chitosan solution 156.25 ppm	0.0156% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.0156% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.0156% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 312.5 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul
G final chitosan solution 78.125 ppm	0.0078% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.0078% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.0078% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 156.25 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul
H final chitosan solution 39.0625 ppm	0.0039% acetic acid in MHB 100 ul + EC 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ EC 100 ul	0.0039% acetic acid in MHB 100 ul + SA 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ SA 100 ul	0.0039% acetic acid in PDB 100 ul + CA 100 ul	chitosan 78.125ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul	chitosan 78.125 ppm 100 ul 1+ CA 100 ul

รูปที่ 5 อัตราส่วนของสารละลายผสมที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนใน microplate 96 หลุม

2.2 การศึกษาผลของการลดขนาดโมเลกุลของไคโตแซนโดยวิธีต่างๆ ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

2.2.1 วิธีทางเคมี: ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเหล็กไอออน (Rhoades and Roller, 2000)

นำไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มา 20 กรัม ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 ลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของไคโตแซนเป็น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 20,000 พีพีเอ็ม) แล้วดูดสารละลายไคโตแซนที่ได้มา 8.5 มิลลิลิตร ผสมกับเฟอริกคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 1.0 มิลลิลิตร เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น 0, 5, 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นปรับปริมาตรของส่วนผสมทุกความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ ภายใน 24 ชั่วโมง

2.2.2 วิธีการใช้เอนไซม์

2.2.2.1 เอนไซม์ไลโซไซม์ (EC 3.2.1.17 from chicken egg white)

(Rhoades and Roller, 2000)

การใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ย่อยไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 เริ่มจากเตรียมสารละลายไคโตแซนเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 1% acetic acid/ 0.2 M sodium acetate buffer pH 5.0 แล้วเติมเอนไซม์ไลโซไซม์ที่มีกิจกรรม 58,100 ยูนิต/ มิลลิกรัม ลงไปย่อยโดยใช้เอนไซม์ร้อยละ 0.05 (นน. /ปริมาตร) คนสารละลายอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาและเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 30 นาที, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายไคโตแซนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์และวัดความหนืดเพื่อวิเคราะห์หาค่า intrinsic viscosity เปรียบเทียบผลการยับยั้งของไคโตแซนที่ถูกย่อยที่เวลาต่างๆ

2.2.2.2 เอนไซม์ไคติเนส (EC3.2.1.14 from *Streptomyces griseus*) (Ilyina *et al.*, 1999)

การใช้เอนไซม์ไคติเนสย่อยไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 โดยการละลายไคโตแซนเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 1% acetic acid/ 0.2 M sodium acetate buffer pH 5.0 แล้วเติมเอนไซม์ไคติเนสลงไปให้มีค่ากิจกรรมสุดท้าย 0.02 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ผ่านไป 0, 5, 10, 30 นาที 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายไคโตแซนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์และวัดความหนืดเพื่อวิเคราะห์หาค่า intrinsic viscosity เปรียบเทียบผลการยับยั้งของไคโตแซนที่ถูกย่อยที่เวลาต่างๆ

2.2.2.3 เอนไซม์ปาเปน (food grade; EC 3.4.22.2)(Muzzarelli *et al.*,1994)

วิธีการที่ 1 การใช้เอนไซม์ปาเปนย่อยไคโตแซนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 โดยการละลายไคโตแซนเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 1% acetic acid/ 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.5 เติมเอนไซม์ปาเปนลงไปให้มีค่ากิจกรรมสุดท้าย 15,000 ยูนิต/มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม L- cysteine ลงไปเพื่อช่วยเร่งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ปาเปนโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ L- cysteine เป็น 5 mM เก็บตัวอย่างที่ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ผ่านไป 0, 5, 10, 30 นาที, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายไคโตแซนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์และวัดความหนืดเพื่อวิเคราะห์หาค่า intrinsic viscosity เปรียบเทียบผลการยับยั้งของไคโตแซนที่ถูกย่อยที่เวลาต่างๆ

วิธีการที่ 2 ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับวิธีการที่ 1 แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก1% acetic acid/ 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.5 เป็น 1% acetic acid/ 0.2 M sodium acetate buffer pH 5.0

2.3 การศึกษาการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (เหมือนข้อ 2.1.3.3)

ตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบ

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

วิธีการทดสอบ

ใช้วิธี "Microdilution test" (วิธีการเดียวกับข้อ 2.1.3.3 แต่เปลี่ยนชนิดตัวทำละลาย) มีชุดควบคุมซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่ไม่เติมไคโตแซนด้วย

2.4 การศึกษาปัจจัยต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

2.4.1 ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

ใช้วิธีการ Microdilution test (วิธีการเดียวกับข้อ 2.1.3.3) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ PDB ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ คือ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 นำมาเจือจางกับสารละลายไคโตแซนที่ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 2.3 โดยใช้สัดส่วนเช่นเดียวกันกับการทดลองข้อ 2.1.3.3 จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบลงไปในปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 x 10^5 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยจะทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 nm ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.4.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

นำไคโตแซนที่เตรียมได้ด้วยกรรมวิธีที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุดจากข้อ 2.1-2.2 มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 2.3 ให้มีความเข้มข้น 20 มก/มล แล้วนำสารละลายไคโตแซนที่ได้ไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (pasteurization) 15 นาที, 100 องศาเซลเซียส (boiling) 15 นาทีและ 121 องศาเซลเซียส (sterilization) 15 นาที แล้วจุ่มในน้ำแข็งทันที นำไคโตแซนที่ผ่านความ

ร้อนแล้วและที่ยังไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม)ไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Microdilution test (วิธีการเหมือนข้อ 2.1.3.3) โดยเจือจางสารละลายไคโตแซนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ PDB ที่เตรียมด้วยซิเตทบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการยับยั้งจุลินทรีย์จาก ข้อ 2.4.1 เติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบลงไปในปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยจะทำการวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 nm ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.5 การศึกษาผลของไคโตแซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหารเปรียบเทียบกับไคโตแซนทางการค้า

เป็นการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนที่ผลิตจากกรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุด (ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด(MIC ต่ำสุด)) ต่อเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *B. cereus*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.1 – 2.4 โดยวิธี Microdilution test (เหมือนข้อ 2.1.3.3) โดยเปรียบเทียบกับไคโตแซนชนิดต่างๆ ที่มีขายทางการค้า สุดท้ายเลือกจุลินทรีย์ 3 ชนิดมาศึกษาโดยการนับด้วยวิธี plate count เพื่อดูอัตราการตายของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยว่าไคโตแซนสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ช้าเร็วแค่ไหน แล้วทำ transmission electron microscopy (TEM) ของเซลล์จุลินทรีย์กรัมลบ *E. coli* ก่อนและหลังการเติมไคโตแซนเพื่อดูกลไกการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของไคโตแซน พร้อมทั้งศึกษาดูความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งของสารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วย