บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

- เปลือกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากบริษัทแปะแซสงขลา จำกัด

2. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการผลิตไคโตแซน คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (commercial grade) และกรดไฮโดรคลอริก (analytical grade)
- สารเคมีที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ไคโตแซน คือ กรดไฮโดรคลอริก (analytical grade)
- สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า HLB คือ tween 80, span 20, span 60, gum arabic และ potassium oleate (analytical grade)

อุปกรณ์

- ตู้อบลมร้อนแบบถาด
- เครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transfer Infrared Spectrometer, FTIR) ยี่ห้อ Bruker รุ่น Vector 33
- เครื่องโฮโมจิไนส์เซอร์ ยี่ห้อ Ultra turrax รุ่น T25B
- เครื่องกวน (Magnetic Stirrer) ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น LR 49683C
- เครื่อง vortex mixer ยี่ห้อ IKA รุ่น MS1
- เครื่องเหวี่ยงแยก ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC 5B plus
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-530
- เครื่อง Texture Analyser ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA-XT2i
- เครื่องวัดความหนืด Brookfield Viscometer (รุ่น MODEL DV II+)
- เครื่องวัดความหนืด Capillary Viscometer ยี่ห้อ Schott
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W350 ยี่ห้อ Memmert
- เครื่องปั่นผสม ยี่ห้อ National รุ่น MX-T2G
- Laser Scanning Confocal Microscope ยี่ห้อ Olympus รุ่น Fluoview FV300
- นาฬิกาจับเวลา

วิธีการ

1. การผลิตไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำ

ทำการกำจัดโปรตีน (deproteinization) โดยนำเปลือกกุ้งกุลาดำที่ผ่านการล้างทำความสะอาด และสะเด็ดน้ำออกแล้วมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 4.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งกุลาดำต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 1:6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำจนกระทั่งมีสภาพเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัสหรือสารละลายฟีนอฟทาลีน) แล้วสะเด็ดน้ำ (วันทนา ปิติ, 2545)

หลังจากนั้นนำไปกำจัดแร่ธาตุ (demineralization) โดยแช่เปลือกกุ้งกุลาดำในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 6.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนเปลือก กุ้งกุลาดำที่ผ่านการกำจัดโปรตีนต่อสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1:6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำจนมีสภาพเป็นกลาง แล้วสะเด็ดน้ำ ได้เป็นไคติน (วันทนา ปิติ, 2545)

ทำการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) โดยกำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดหมู่อะซิทิลแตกต่างกัน เพื่อทำการผลิตไคโตแซนให้มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (degree of deacetylation) ที่แตกต่างกัน โดยนำไคตินแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วนไคตินต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 8 9 10 11 12 13 14 15 และ16 วัน (วันทนา ปิติ, 2545) จากนั้นทำการล้างด่างออกด้วยน้ำจนมีสภาพเป็นกลาง แล้วนำไคโตแซนที่ได้อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บดตัวอย่างไคโตแซน แล้วร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 2 มิลลิเมตร วิเคราะห์ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลของไคโตแซนที่ผลิตได้ซึ่งพบว่าไคโตแซนที่ได้มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลไม่อยู่ในช่วงที่กำหนด ดังนั้นจึงเลือกไคโตแซนที่ผ่านการกำจัดหมู่อะซิทิลเป็นระยะเวลา 10 วัน มาผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะซิทิลซ้ำอีกครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาแตกต่างกันคือ 1 2 และ 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล โดยผลิตฟิล์มไคโตแซนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 1650 cm^{-1} และ 3450 cm^{-1} โดยเครื่อง FTIR spectrometer (Baxter *et al.,* 1992)

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

จัดแบ่งไคโตแซนที่ได้ตามระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 75-80
- ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 81-85
- ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 86-90

นำไคโตแซนซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลแตกต่างกัน 3 กลุ่ม มาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของไคโตแซน ดังนี้

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยนำไคโตแซนละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลายไคโตแซนมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดความหนืดโดยใช้ Brookfield Viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

2) ค่าความสามารถในการจับน้ำ (water binding capacity) และความสามารถในการจับไขมัน (fat binding capacity) ของไคโตแซน โดยนำไคโตแซน 0.5 กรัม ผสมกับน้ำหรือไขมัน 10 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านเครื่องเหวี่ยงแยก หาปริมาณน้ำหรือไขมันที่จับกับ ไคโตแซน ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

3) ค่าสมดุลของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ชอบไขมัน (hydrophilic lipophilic balance, HLB) โดยหาค่า HLB จากสมการของกราฟมาตรฐาน ตามวิธีของ Rodriquez และคณะ (2002)

2. การผลิตไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันโดยการไฮโดรไลส์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

2.1 คัดเลือกสภาวะที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ไคโตแซน

คัดเลือกสภาวะในการไฮโดรไลส์ไคโตแซนเพื่อให้ได้ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 3 ระดับคือ low molecular weight (100-500 กิโลดาลตัน) medium molecular weight (600-1000 กิโลดาลตัน) และ high molecular weight (1100-1500 กิโลดาลตัน) โดยเลือกใช้ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 75-80 มาเป็นตัวแทนของไคโตแซนกลุ่มอื่นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลส์ ภายใต้สภาวะในการไฮโดรไลส์ต่างกัน ดังนี้

- ระยะเวลาในการไฮโดรไลส์ คือ 0.5 และ 1 ชั่วโมง
- อุณหภูมิในการไฮโดรไลส์ คือ อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) และ 60 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (2x2) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

นำไคโตแซนที่ผลิตได้จากข้อ 1 ที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 75-80 แช่ลงในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล อัตราส่วนระหว่างไคโตแซนต่อสารละลายกรดไฮโดรคลอริกคือ 1 :10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วน ส่วนที่ 1 และ 2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนที่ 3 และ4 แช่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างเป็น 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านการล้างด้วยน้ำจนมีสภาพเป็นกลางแล้วอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นำไคโตแซนที่ผ่านการไฮโดรไลส์มาวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของไคโตแซนโดยวิธี Viscometric molecular mass (Robert and Domszy, 1982) คัดเลือกสภาวะที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ไคโตแซน เพื่อให้ได้ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (Lin and Chao, 2001)

- low molecular weight (100-500 กิโลดาลตัน)
- medium molecular weight (600-1000 กิโลดาลตัน)
- high molecular weight (1100-1500 กิโลดาลตัน)

2.2 ไฮโดรไลส์ไคโตแซนภายใต้สภาวะที่ผ่านการคัดเลือก

หลังจากคัดเลือกสภาวะในการไฮโดรไลส์ไคโตแซนที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผลิตไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจากไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 81-85 และ 86-90 ภายใต้สภาวะในการไฮโดรไลส์ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2.1 ทำให้ได้ไคโตแซนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สมบัติของไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำที่ผลิตในงานวิจัย

Table 4. Properties of chitosan from Black Tiger shrimp shell in this study

Type of chitosan	Degree of deacetylation (%)	Molecular weight (KDa)
1	75-80	100-500
2	75-80	600-1000
3	75-80	1100-1500
4	81-85	100-500
5	81-85	600-1000
6	81-85	1100-1500
7	86-90	100-500
8	86-90	600-1000
9	86-90	1100-1500

ทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของไคโตแซนที่ผ่านการไฮโดรไลส์ทั้ง 9 ตัวอย่างประกอบด้วย

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยนำไคโตแซนละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลายไคโตแซนมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดความหนืดโดยใช้ Brookfield Viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

2) ค่าความสามารถในการจับน้ำ (water binding capacity) และความสามารถในการจับไขมัน (fat binding capacity) ของไคโตแซน โดยนำไคโตแซน 0.5 กรัม ผสมกับน้ำหรือไขมัน 10 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านเครื่องเหวี่ยงแยก หาปริมาณน้ำหรือไขมันที่จับกับ ไคโตแซน ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

3) ค่าสมดุลของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ชอบไขมัน (hydrophilic lipophilic balance, HLB) โดยหาค่า HLB จากสมการของกราฟมาตรฐาน ตามวิธีของ Rodriquez และคณะ (2002)

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

3. การศึกษาผลของไคโตแซนต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน

3.1 ผลของปริมาณไคโตแซนต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน

ศึกษาผลของปริมาณไคโตแซนที่ใช้ในการผลิตอิมัลชันต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน โดยเลือกใช้ไคโตแซนจากตารางที่ 4 (ตัวอย่างที่ 3) ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลร้อยละ 75-80 และมีน้ำหนักโมเลกุล 1100-1500 กิโลดาลตัน เป็นตัวแทน โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

1) ความเข้มข้นของไคโตแซนร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2) อัตราส่วนระหว่างสารละลายไคโตแซนต่อน้ำมันพืช 9:1 8:2 7:3 และ 6:4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (4x4) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

ทำการเตรียมอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jumaa และ Muller (1999) โดยนำไคโตแซนละลายในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นของไคโตแซนร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนผสมด้วยเครื่องกวน (Magnetic stirrer) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายไคโตแซนผสมกับน้ำมันพืชในอัตราส่วน 9:1 8:2 7:3 และ 6:4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปั่นผสมโดยใช้ homogenizer รุ่น Ultra-Turrax T25B ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 นาที แล้ววิเคราะห์สมบัติของอิมัลชันประกอบด้วย

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้ Brookfield viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)
2) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion activity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) ดัดแปลงจากวิธีของ Ogawa และคณะ (2003)

คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอิมัลชันจากตัวอย่างอิมัลชันที่มีค่าความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด เพื่อใช้เป็นสภาวะในการเตรียมอิมัลชันในการทดลองข้อ 3.2 ต่อไป

3.2 ผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน

นำไคโตแซนจากตารางที่ 4 ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิลและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมาใช้ในการผลิตอิมัลชันภายใต้สภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.1 แล้ววิเคราะห์สมบัติของอิมัลชันประกอบด้วย

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้ Brookfield viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)
2) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion activity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) ดัดแปลงจากวิธีของ Ogawa และคณะ (2003)

เปรียบเทียบผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของเม็ดไขมัน โดยวิธี Laser Scanning Confocal Microscope (Srinivasan *et al.,* 2001) และนำไคโตแซนดังกล่าวมาศึกษาผลของไคโตแซนเปรียบเทียบกับไข่แดงต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำสลัดในการทดลองข้อ 4 ต่อไป วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

4. การประยุกต์ใช้ไคโตแซนทดแทนไข่แดงในการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

นำไคโตแซนที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2 ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีความคงตัวของอิมัลชันสูงที่สุด มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัดชนิดข้นเปรียบเทียบกับการใช้ไข่แดง โดยน้ำสลัดสูตรควบคุมประกอบด้วย น้ำมันพืชร้อยละ 68 ไข่แดงร้อยละ 10 น้ำตาลทราย ร้อยละ 8 น้ำส้มสายชูร้อยละ 5 น้ำมะนาวร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 4 กำหนดอัตราส่วนของตัวทำอิมัลชันที่ผสมลงในน้ำสลัดแตกต่างกัน แบ่งได้ 3 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 มีไข่แดงผสมในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด สูตรนี้ใช้เป็นสูตรควบคุม

สูตรที่ 2 มีไข่แดงผสมในปริมาณร้อยละ5 สารละลายไคโตแซนในปริมาณร้อยละ 0.5 และน้ำในปริมาณร้อยละ 4.5 ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด

สูตรที่ 3 ไม่มีไข่แดง ใช้เฉพาะสารละลายไคโตแซนในปริมาณร้อยละ 1 และน้ำในปริมาณร้อยละ 9 ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด

ทำการเตรียมน้ำสลัด โดยดัดแปลงจากวิธีของ ศรีสมร คงพันธุ์ และ มณี สุวรรณผ่อง (2538) โดยผสมน้ำส้มสายชู น้ำมะนาว น้ำตาลทราย และเกลือ กวนผสมด้วยเครื่องกวน (Magnetic stirrer) เป็น

ระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (เรียกว่าส่วนผสมน้ำส้มสายชู) ปั่นผสมไข่แดงให้ขึ้นฟู โดยใช้ homogenizer รุ่น Ultra Turrax T25 B ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 วินาที ใส่น้ำมันพืชทีละน้อยลงในไข่แดง ปั่นผสมให้เข้ากัน ใส่น้ำมันทีละน้อยสลับกับสารละลายไคโตแซน หลังจากนั้นใส่น้ำมันพืชทีละน้อย สลับกับส่วนผสมน้ำส้มสายชูที่เตรียมไว้ ทำการปั่นผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้ววิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของน้ำสลัดประกอบด้วย

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้ Brookfield viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)
2) พฤติกรรมการไหลของน้ำสลัด โดยวัดค่าแรงเค้นเฉือน (shear stress) และอัตราเฉือน (shear rate) ด้วยเครื่อง Texture Analyser พร้อมทั้งศึกษาค่าแรงเค้นเฉือนที่ทำให้น้ำสลัดเกิดการเคลื่อนที่ (yield stress) ดัดแปลงจากวิธีของ Ma และ Barbosa-Canovas (1995)
3) ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของเม็ดไขมันโดยวิธี Laser Scanning Confocal Microscope (Srinivasan *et al.,* 2001)

เปรียบเทียบผลของไคโตแซนกับไข่แดงต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำสลัด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง